

SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I SAMOUDRUŽIVANJE MALIH PEPTIDNIH GELATORA TEMELJENIH NA PROTEINU AMILOID- β

Pospišil, Tihomir

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:864317>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)





SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Tihomir Pospišil

**SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I
SAMODRUŽIVANJE MALIH PEPTIDNIH
GELATORA TEMELJENIH NA
PROTEINU AMILOID- β**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2017.



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Tihomir Pospišil

**SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I
SAMOUDRUŽIVANJE MALIH PEPTIDNIH
GELATORA TEMELJENIH NA PROTEINU
AMILOID- β**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Leo Frkanec

Komentor: akademik Mladen Žinić, prof. dr. sc.

Rijeka, 2017.



UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Tihomir Pospišil

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND
SELF-ASSEMBLY OF SMALL PEPTIDIC
GELATORS BASED ON AMYLOID β -
PROTEIN**

DOCTORAL THESIS

Supervisors: Prof. Dr. Leo Frkanec and Fellow of the Croatian
Academy Mladen Žinić, Prof. Dr.

Rijeka, 2017.

Mentor rada: prof. dr. sc. Leo Frkanec, znanstveni savjetnik, redoviti profesor

Komentor rada: akademik Mladen Žinić, prof. dr. sc.

Doktorski rad obranjen je dana 7. travnja 2017. na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Dražen Vikić-Topić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju IRB, redoviti profesor u trajnom zvanju
2. Doc. dr. sc. Karlo Wittine, docent
3. Prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić, izvanredni profesor
4. Prof. dr. sc. Leo Frkanec, znanstveni savjetnik IRB, redoviti profesor
5. Akademik Mladen Žinić, prof. dr. sc.

Ova disertacija je izrađena u Laboratoriju za supramolekularnu kemiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Lea Frkanca i akademika prof. dr. sc. Mladena Žinića u sklopu sveučilišnog doktorskog studija Medicinska kemija pri Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci zbog stjecanja zvanja dr. sc. u Interdisciplinarnom području znanosti, polje Biotehnologija u biomedicini (prirodno područje, biomedicina i zdravstvo, biotehničko područje)

Najljepše zahvaljujem mentorima, prof. dr. sc. Leu Frkancu i akademiku Mladenu Žiniću na izboru teme i na brojnim vrijednim savjetima i velikoj pomoći tijekom izrade doktorskog rada.

Suradnicima iz sobe 7b, dr. sc. Zoranu Džoliću i dr. sc. Tomislavu Portadi zahvaljujem na savjetima koje su mi pružili tijekom izrade rada i ugodnom društvu.

Hvala dr. sc. Vesni Čaplar koja mi je na početku rada puno pomogla oko sinteze i geliranja spojeva. Hvala i suradnicama iz sobe 5b, dr. sc. Janji Makarević te dr. sc. Nataši Šijaković Vujičić na velikoj potpori i pomoći oko pisanja doktorskog rada i ugodnom društvu. Hvala Petri Radošević na suhim i čistim otapalima.

Najljepše zahvaljujem prof. dr. sc. Beatriu Escuder što mi je omogućila vrlo ugodan i produktivan boravak u njezinoj grupi na Sveučilištu Jaume I u Castellonu gdje sam usvojio i proširio znanja iz različitih spektroskopskih metoda i TEM mikroskopije.

Zahvaljujem dipl. ing. Luciji Horvat s Instituta Ruđer Bošković i Marii del Carmen Pedro Alvarez sa Sveučilišta Jaume I u Castellonu na snimanju mnogobrojnih TEM mikrografija.

Svim članovima Centra za NMR zahvaljujem na snimanju spektara, a posebno mr.sc. Željku Mariniću i Nikolini Višić.

Zahvaljujem dr. sc. Mariji Lovrić i dr. sc. Lejli Ferhatović Hamzić na velikoj pomoći i trudu kod in vitro ispitivanja biokompatibilnosti hidrogela.

Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su mi na bilo koji način pomogli i bili mi potpora, a posebno zahvaljujem roditeljima na ljubavi i podršci.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XVII
SUMMARY	XIX
1. UVOD.....	1
1.1. Cilj i svrha rada	2
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Molekularno samoudruživanje	3
2.2. Samoudruživanje peptida	6
2.3. Agregacija peptida i amiloidne bolesti	9
2.4. Mali peptidi kao modeli amiloidne agregacije.....	14
2.5. Mali peptidi kao inhibitori amiloidne agregacije	16
2.6. Supramolekularni gelovi	21
2.7. Supramolekularni peptidni gelovi	25
2.8. Uloga dipeptida Phe-Phe u samoudruživanju kratkih peptida	27
2.9. Primjena hidrogelova u tkivnom inženjerstvu	28
3. EKSPERIMENTALNI DIO	33
3.1. Uvodne napomene	33
3.2. Priprava tripeptidnih derivata	34
3.2.1. Priprava acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA.....	34
3.2.1.1. Boc-Phe-Ala-OMe (1)	34
3.2.1.2. Phe-Ala-OMe (2).....	35
3.2.1.3. Boc-Phe-Ala-OMe (3)	35
3.2.1.4. Phe-Phe-Ala-OMe (4)	36
3.2.1.5. Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (5).....	36
3.2.1.6. Ac-Phe-Phe-Ala-NH ₂ (6).....	37
3.2.2. Priprava acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FAF.....	38
3.2.2.1. Boc-Phe-Ala-OMe (1)	38
3.2.2.2. Boc-Phe-Ala-OH (7)	38
3.2.2.3. Boc-Phe-Ala-Phe-OMe (8)	39
3.2.2.4. Phe-Ala-Phe-OMe (9)	39
3.2.2.5. Ac-Phe-Ala-Phe-OMe (10).....	40
3.2.2.6. Ac-Phe-Ala-Phe-NH ₂ (11).....	40
3.2.3. Priprava acetilnih derivata s aminokiselinskom sekvencom AFF.....	41

3.2.3.1. Boc-Phe-Phe-OMe (12)	41
3.2.3.2. Phe-Phe-OMe (13)	41
3.2.3.3. Boc-Ala-Phe-Phe-OMe (14).....	42
3.2.3.4. Ala-Phe-Phe-OMe (15)	42
3.2.3.5. Ac-Ala-Phe-Phe-OMe (16).....	43
3.2.3.6. Ac-Ala-Phe-Phe-NH ₂ (17).....	43
3.2.4. Priprava butirilnih derivata s aminokiselinskom sekvencom FFA	44
3.2.4.1. CH ₃ (CH ₂) ₂ CO-Phe-OMe (18)	44
3.2.4.2. CH ₃ (CH ₂) ₂ CO-Phe-OH (19).....	44
3.2.4.3. CH ₃ (CH ₂) ₂ CO-Phe-OSu (20)	45
3.2.4.4. CH ₃ (CH ₂) ₂ CO-Phe-Phe-Ala-OMe (21)	45
3.2.4.5. CH ₃ (CH ₂) ₂ CO-Phe-Phe-Ala-OH (22).....	46
3.2.4.6. CH ₃ (CH ₂) ₂ CO-Phe-Phe-Ala-NH ₂ (23).....	47
3.2.5. Priprava derivata tripeptida s benziloksikarbonil (Z,Cbz) zaštitnom grupom	47
3.2.5.1. Z-Phe-OSu (24)	47
3.2.5.2. Z-Phe-Phe-OMe (25)	48
3.2.5.3. Z-Phe-Phe-OH (26).....	48
3.2.5.4. Z-Phe-Phe-Ala-OMe (27).....	49
3.2.5.5. Z-Phe-Phe-Ala-NH ₂ (28).....	49
3.2.5.6. Z-Phe-Ala-OMe (29)	50
3.2.5.7. Z-Phe-Ala-OH (30).....	50
3.2.5.8. Z-Phe-Ala-Phe-OMe (31).....	51
3.2.5.9. Z-Phe-Ala-Phe-NH ₂ (32).....	51
3.2.5.10. Z-Ala-OSu (33).....	52
3.2.5.11. Z-Ala-Phe-OMe (34)	52
3.2.5.12. Z-Ala-Phe-OH (35).....	53
3.2.5.13. Z-Ala-Phe-Phe-OMe (36).....	53
3.2.5.14. Z-Ala-Phe-Phe-NH ₂ (37)	54
3.3. Geliranje tripeptidnih derivata	54
3.4. Eksperimentalno određivanje interakcije tripeptida 6 s amiloidnim bojama.....	55
3.4.1. Fluorescencijska spektroskopija	55
3.4.2. Konfokalna mikroskopija	56
3.5. In vitro ispitivanje biokompatibilnosti hidrogela tripeptida Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂	57
3.5.1. In vitro ispitivanje staničnog preživljenja i proliferacije u tripeptidnom hidrogelu.....	57
3.5.2. Transfekcija stanica	58
3.5.3. Konfokalna mikroskopija stanica.....	58

3.5.4. Reološka mjerenja.....	58
4. REZULTATI I RASPRAVA	59
4.1. Priprava tripeptidnih gelatora.....	59
4.1.1. Priprava acetilnih tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA.....	59
4.1.2. Priprava acetilnih tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FAF.....	60
4.1.3. Priprava acetilnih tripeptida s aminokiselinskom sekvencom AFF.....	61
4.1.4. Priprava butirilnih tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA.....	62
4.1.5. Priprava derivata tripeptida s benziloksikarbonil (Z, Cbz) zaštitnom skupinom.....	63
4.2. Gelirajuća svojstva tripeptidnih derivata.....	64
4.3. Morfologija gelskih niti utvrđena TEM mikroskopijom.....	69
4.3.1. Acetilni derivati tripeptida	69
4.3.2. Butirilni derivati tripeptida.....	79
4.3.3. Z-zaštićeni derivati tripeptida	80
4.4. Reološka mjerenja	88
4.5. Ispitivanje supramolekularnih interakcija u gelovima.....	89
4.5.1. NMR spektroskopija	89
4.5.2. FTIR spektroskopija	103
4.5.3. UV/Vis i CD spektroskopija	120
4.6. Interakcija tripeptidnih gelatora s amiloidnim bojama	124
4.6.1. Interakcija s tioflavinom T	124
4.6.2. Interakcija s kongo-crvenilom	126
4.7. In vitro procjena biokompatibilnosti hidrogela tripeptida Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ – potencijalna primjena u tkivnom inženjerstvu	128
5. ZAKLJUČAK	135
6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	139
7. LITERATURNI IZVORI.....	143
8. DODATAK.....	XXI
9. ŽIVOTOPIS	XXXIII

SAŽETAK

Sinteza, karakterizacija i samoudruživanje malih peptidnih gelatora temeljenih na proteinu amiloid- β

Klasičnim sintetskim metodama peptidne kemije u otopini sintetizirana je serija novih peptidomimetika, tripeptidnih derivata koji u svojoj strukturi sadrže različite kombinacije aminokiselinskih slijedova (FFA, FAF, AFF) i s različitim zaštitnim grupama na *N* i *C* terminalnim završecima. Ispitana su gelirajuća svojstva pripremljenih spojeva u vodi, organskim otapalima i smjesama različitih otapala. Acetilni tripeptidi s aminokiselinskim slijedom FFA (Phe-Phe-Ala) pokazali su se kao dobri gelatori vode i polarnih otapala (**6**), ali i aromatskih otapala (**5**). Acetilni derivati s ostalim aminokiselinskim slijedovima (FAF i AFF) pokazali su izrazito slaba gelirajuća svojstva kao i butirilni tripeptidi sa slijedom FFA. Tripeptidi s benziloksikarbonilom (*Z*) na *N* terminalnoj strani (**28**, **32** i **37**) su jako efikasni gelatori aromatskih otapala (*o*-, *m*- i *p*-ksilena i tetralina) te dekalina. Morfologija gelskih niti određena je transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM). Samoorganizacija molekula i supramolekularne interakcije u novim tripeptidnim gelovima proučavane su različitim spektroskopskim metodama (NMR, FTIR, CD) koje su ukazale na postojanje samoudruživanja molekula, strukture β -nabrane ploče (paralelno ili antiparalelno orijentirane) povezane vodikovim vezama kod **5** i **6** te kod *Z*-zaštićenih tripeptida (**28**, **32** i **37**). UV-Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom te laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom ispitano je vezanje tripeptida **6** na amiloidne boje (tioflavin T i kongo-crvenilo) u fiziološkim uvjetima. Fluorescencijskom titracijom vodene otopine tripeptida **6** s tioflavinom T dolazi do porasta emisije te boje i formiranja kompleksa stehiometrije 1:1 s konstantom stabilnosti $\log K = 2,48$. Kongo-crvenilo s tripeptidom **6** tvori proziran gel u vodi dok sam spoj **6** stvara mutan hidrogel pri čemu dolazi do značajnijeg porasta emisije fluorescencije spoja kongo-crvenilo u gelu u odnosu na otopinu gdje je neznatan porast emisije. Hidrogel kongo-crvenila i tripeptida **6** čine tanke niti promjera 10-15 nm dok TEM samog hidrogela **6** prikazuje prisutnost ravnih traka promjera 50-500 nm što ukazuje na promjenu morfologije gelova. Laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom pokazano je da se obje amiloidne boje vežu na gelske niti tripeptida **6**. Hidrogel tripeptida **6** omogućio je u fiziološkim uvjetima preživljenje i proliferaciju stanica HEK293T *in vitro* te se pokazao kao potencijalni biomaterijal za primjenu u tkivnom inženjerstvu. Dosadašnja istraživanja su pokazala da bi novosintetizirani hidrogelator **6** mogao poslužiti kao potencijalni minimalistički model agregiranog A β -proteina i omogućiti precizan dizajn i razvoj novih efikasnijih molekula inhibitora ili detektora agregiranja.

Ključne riječi: tripeptidi, gelovi, protein amiloid- β , β -nabrana ploča, amiloidne boje, biomaterijal, HEK293T stanice.

SUMMARY

Synthesis, characterization and self-assembly of small peptidic gelators based on amyloid β -protein

Series of tripeptide FFA, FAF and AFF derivatives with different protecting groups was prepared using classical methods of solution-state peptide synthesis. Prepared tripeptides were tested for gelation of water, various organic solvents and mixtures of solvents. Acetyl FFA derivatives exhibited gelation of water, polar solvents (**6**) and aromatic solvents (**5**). However, acetyl FAF and AFF derivatives and butyryl FFA derivatives showed poor gelation abilities. Tripeptides with benzyloxycarbonyl protecting group (**28**, **32** and **37**) exhibited strong gelation of aromatic solvents (*o*-, *m*- and *p*-xylene and tetraline) and decaline. Morphology of prepared gels was investigated by Transmission Electron Microscopy (TEM). Organisation in gel assemblies at the molecular and the supramolecular level determined by using spectroscopic methods (NMR, FTIR, CD) pointed towards the β -sheet type of hydrogen bonding self-association of tripeptides in gel aggregates. Binding studies of tripeptide **6** with amyloid dyes, Congo Red and Thioflavin T (ThT) were carried out using fluorescence spectroscopy and confocal microscopy. Fluorescence titration of tripeptide **6** aqueous solution below its minimal gelation concentration with Thioflavin T showed increase of ThT emission with increased tripeptide concentration and formation of the 1:1 complex with the association constant, $\log K = 2,48$. Congo Red forms transparent hydrogel with a tripeptide **6** and shows increased fluorescence emission compared to aqueous solution of Congo Red. TEM of the tripeptide hydrogel with Congo Red revealed a change in fiber morphology compared to **6** hydrogel. TEM images of the nanofibrous hydrogel network show the presence of a mixture of fibers and straight ribbons with diameters in the range of 50–500 nm while the hydrogel network together with Congo Red contains small fibrils with diameters in range of 10-15 nm. Confocal microscopy revealed that the both dyes bind the hydrogel fibers. As a potential biomaterial, **6** was established as a stable and biocompatible physical support for HEK293T cells *in vitro*. Tripeptide **6** efficiently supported survival and promoted proliferation of HEK293T cells encapsulated within a three-dimensional nanofiber network. Furthermore, these results suggest the need for further evaluation of *in vitro* biocompatibility and bioactivity of this tripeptide on neural stem cells upon encapsulation for possible tissue engineering application. Likewise, tripeptide **6** could serve as minimalistic model of aggregated A β -protein and enable development of new amyloid aggregation inhibitors.

Key words: tripeptides, gels, A β -protein, β -sheet, amyloid dyes, biomaterial, HEK293T cells

1. UVOD

Istraživanja u području supramolekularne kemije koje se bavi fenomenom geliranja i samoudruživanjem malih organskih gelatora pokazuju da postoje strukturno različite porodice peptida koji pokazuju svojstva geliranja.¹ Ovakve molekule se udružuju u nitaste agregate nano-dimenzijskih promjera. U određenim tekućinama gelske niti tvore trodimenzionalnu mrežu koja kapilarnim silama imobilizira otapalo, sustav gubi svojstvo tečenja te nastaje fizikalni gel. Glavno obilježje Alzheimerove bolesti je nastajanje plakova u mozgu koji sadrže amiloidna vlakna nastala samoorganizacijom A β -proteina (A β -40 i A β -42).³ Može se zaključiti da je samoorganizacija A β -proteina u nitaste agregate nano-dimenzijskih promjera te samoorganizacija peptidnih gelatora posljedica istih supramolekularnih fenomena: molekularnog prepoznavanja i samoudruživanja (*eng.* self-assembly) temeljem slabih supramolekularnih nekovalentnih interakcija. Istraživanja su pokazala da postoji sličnost u morfologiji gelskih niti malih peptida i amiloidnih niti u vlaknima plakova. Mali peptidi poput tripeptida sadrže sve potrebne informacije za samoorganizaciju u tipična amiloidna vlakna.⁴ Dokazano je da je aminokiselinski slijed KLVFF u A β -proteinu važan za tvorbu vlaknastih agregata i pritom predstavlja vezno mjesto za amiloidne boje te određene molekule koje potencijalno mogu spriječiti amiloidnu agregaciju.⁵ Amiloidni plakovi u mozgu čovjeka detektiraju se selektivno nakon smrti primjenom histoloških boja (kongo-crvenilo, *eng.* Congo Red i tioflavin T).⁶ Strukture navedenih boja kao i poznavanje načina njihove interakcije s amiloidnim agregatima poslužili su za dizajn novih organskih spojeva za sprječavanje agregacije A β -proteina ili za razvoj *in vivo* dijagnostike Alzheimerove bolesti na mozgu najčešće primjenom PET-a (pozitronska emisijska tomografija).⁷ Dakle, navedeni peptidni supramolekularni sustavi bi mogli poslužiti kao jednostavan model A β -proteina što bi u budućnosti omogućilo razvoj novih inhibitora amiloidne- β agregacije.⁸ Fenomen supramolekularne samoorganizacije malih peptida u vlaknaste agregate odnosno gelove trenutno je vrlo aktualna problematika u istraživanju novih materijala u biomedicini.⁹ Gelovi predstavljaju nove meke materijale koji mogu poslužiti kao medij za prijenos i kontrolirano otpuštanje lijekova, medij za rast i diferencijaciju stanica i sintezu novih nanomaterijala. Zbog svoje osjetljivosti na različite stimulanse kao što su pH, temperatura, svjetlost ili dodatak aktivnih tvari mogu poslužiti za razvoj senzora.

1.1. Cilj i svrha rada

Osnovni cilj istraživanja je sintetizirati nove tripeptidne gelatore temeljene na proteinu amiloid- β te odrediti njihove strukture i supramolekularnu organizaciju spektroskopskim i mikroskopskim tehnikama. Identificirati odgovarajuću skupinu hidrogelatora kao potencijalne modele proteina amiloid- β . Polazi se od pretpostavke da gelske niti dobro oponašaju vlakna agregiranog proteina amiloid- β i mogu poslužiti kao minimalistički model za istraživanje vezanja različitih organskih molekula na takve agregate.

Klasičnim sintetskim metodama peptidne kemije u otopini sintetizirat će se niz novih, dosada neistraženih derivata tripeptida odnosno peptidometika koji će sadržavati tri moguće kombinacije aminokiselinskih slijedova (FFA, AFF, FAF) s različitim zaštitnim grupama na *N* i *C* terminalnim završecima. Navedeni spojevi će biti istraženi kao gelatori vode i raznih organskih otapala. Za sintezu će se koristiti različiti aminokiselinski derivati i reagensi uobičajeni u peptidnoj kemiji. Strukture spojeva će biti potvrđene ^1H i ^{13}C NMR te FTIR spektroskopijom, elementarnom analizom i masenom spektrometrijom. 1D i 2D NMR spektroskopskim metodama razmotrit će se samoorganizacija molekula i pratiti supramolekularne interakcije u gelu. Morfologija gelskih niti odredit će se transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM). Interakcije gelatora i gelskih vlakana sa tkivnim bojama (tioflavin T i kongo-crvenilo) ispitivat će se UV-Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom. Navedena istraživanja mogu dati doprinos u području supramolekularne kemije kroz bolje razumijevanje procesa samoorganizacije u gelovima i principa vezanja izabranih organskih molekula na gelske agregate. Pretpostavlja se da bi neki hidrogelatori koji sadrže aminokiselinski slijed FFA mogli poslužiti kao minimalistički model agregiranog A β -proteina. U tom slučaju hidrogel bi mogao poslužiti u istraživanjima usmjerenim prema pronalaženju novih inhibitora ili molekularnih detektora agregacije proteina amiloid- β (PET radioobilježivači). Nadalje, osnovna reološka mjerenja će potvrditi viskoleastična svojstva dobivenih hidrogelova kao potencijalnih kandidata za primjenu u biotehnologiji i biomedicini odnosno tkivnom inženjerstvu te kao medija za rast stanica.

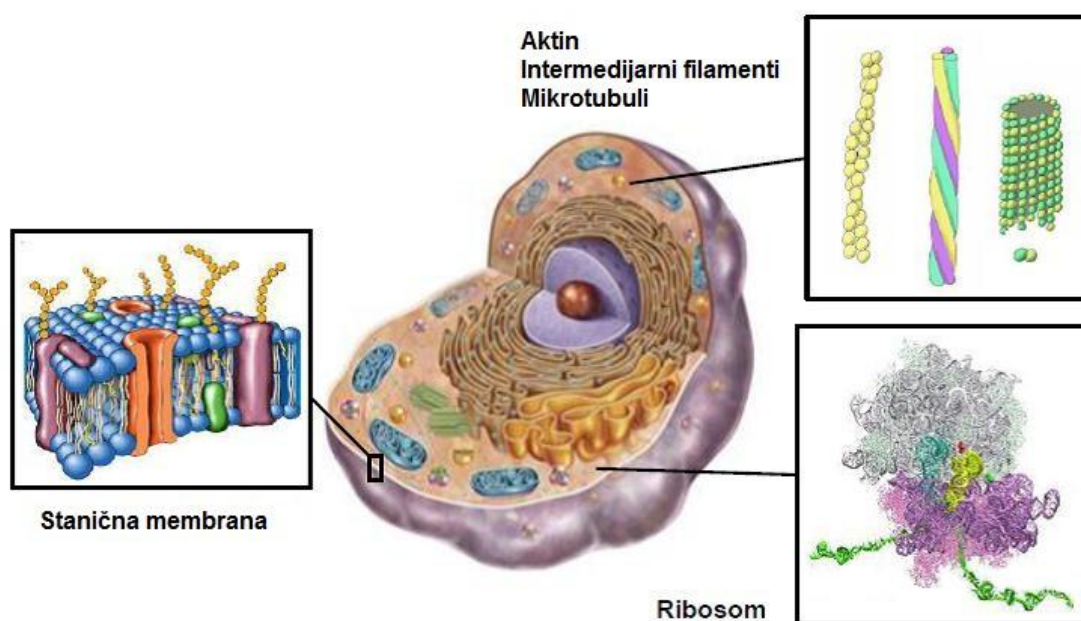
2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Molekulsko samoudruživanje

Molekulsko samoudruživanje (*eng.* self-assembly) je spontan i reverzibilan proces asocijacije molekula u organizirane strukture kao posljedica nekovalentnih intermolekularnih interakcija.¹⁰ Postoji nekoliko razloga zašto je ovaj supramolekularni fenomen intenzivno istraživani u zadnjih nekoliko desetljeća.¹¹ Jedan od njih je postojanje inherentne sklonosti kod ljudi da shvate i objasne kako iz neuređenih sustava mogu nastati uređeni sustavi. Važna motivacija za razumijevanje ovog fenomena postoji zbog najmanje jedinice živog organizma koja se može replicirati - stanice. Ova osnovna, strukturna i funkcionalna jedinica svih živih organizama se samoudružuje i prema tome razumijevanje životnih procesa uključuje prije svega razumijevanje principa samoudruživanja. Naposljetku, mnogobrojne primjene samoudruženih sustava u različitim područjima kao što su materijali, biomedicina i nanotehnologija potiču njihovo intenzivno istraživanje s ciljem poboljšanja njihovih svojstava.

Kao što je poznato, granice su vrlo važne za normalno funkcioniranje društva zbog ekonomskih razloga te jer definiraju gradove, zemlje, nacije i teško je zamisliti koliko je značajno bilo stvaranje stanične granice odnosno stanične membrane u stvaranju života. Stvaranje stanične membrane dovelo je do postojanja prostornog lokaliziranog odjeljka koji sadrži genetski materijal i u kojem se metaboličke aktivnosti mogu odvijati bez izmjene tvari sa okolinom.¹² Ako stavimo na stranu moguće izvore kompleksnih probiotičkih organskih tvari na zemlji, ključnu ulogu u pojavi i stvaranju stanične membrane zauzima proces samoudruživanja i prema tome, razumijevanje principa samoudruživanja će pomoći u razjašnjavanju podrijetla života.

S obzirom da je stanična membrana jedan od prvih primjera stanične organizacije i zbog toga što stanica kao cjelina daje široki izbor prirodnih procesa samoudruživanja (Slika 1), važno ih je spomenuti u okviru ove teme.¹³



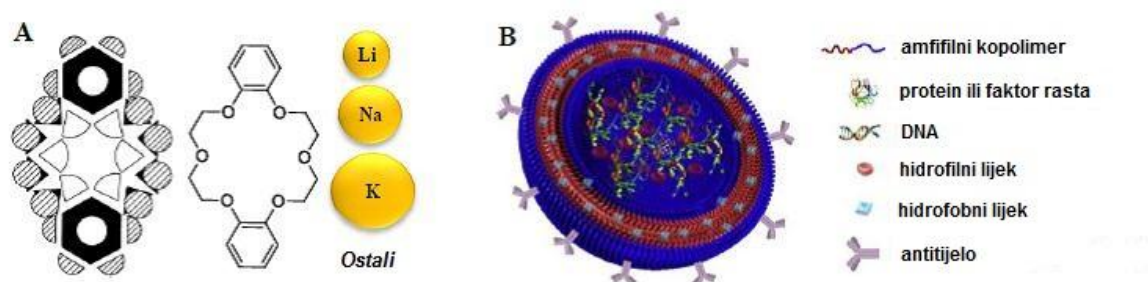
Slika 1. Eukariotska stanica s prikazom stanične membrane, sastavnih dijelova staničnog kostura (aktin, intermedijarni filamenti i mikrotubuli) i ribosoma.¹³

Stanična membrana je visoko selektivna propusna barijera koja se sastoji od samoorganiziranog fosfolipidnog dvosloja koji štiti stanicu od utjecaja okoline. Membrana je sastavljena od dva sloja lipida koji su organizirani na način da su ugljikovodični repovi okrenuti jedan prema drugom tvoreći hidrofobnu jezgru dok su hidrofilne grupe usmjerene prema vodenoj otopini s obje strane membrane. Drugi važan primjer samoudruživanja u stanici se može pronaći u unutrašnjosti stanice. Tri važna citoplazmatska supramolekulska polimera su mikrotubuli, filamenti aktina i intermedijarni filamenti koji se spontano samoorganiziraju iz kratkih monomera u duge uniformne strukture. Oni sudjeluju u važnim funkcijama kao što su segmentacija kromosoma za vrijeme diobe stanica te kao poveznica između transmembranskih i citoplazmatskih proteina te pružaju potporu stanici i daju joj oblik. Eukariotski ribosom je također primjer kompleksnog sustava koji sadrži više od 50 proteinskih podjedinica i nekoliko vrsta RNA.

Ti primjeri zajedno s ostalim prirodnim samoorganiziranim sustavima su inspirirali znanstvenike i doveli do razvoja supramolekularne kemije. Ova znanstvena disciplina ne

proučava isključivo samoudruživanje između molekula nego također i novonastale supramolekulske strukture.¹⁴

Počevši od najranijih jednostavnih sintetskih primjera samoudruživanja,¹⁵ saznanja o supramolekulskim interakcijama su omogućila razvoj kompleksnih sustava s različitim građevnim jedinicama (prirodnim ili umjetnim) što je dovelo do široke palete raznovrsnih topologija, fizikalno-kemijskih svojstava i primjena (Slika 2.).¹⁶



Slika 2. a) jednostavni supramolekulski kompleks između cikličkog polietera i metalnih soli kojeg su opisali Pedersen i suradnici 1967.¹⁵ b) primjer supramolekulskog sustava koji se sastoji od polimersoma modificiranog antitijelima koji sadrže hidrofilne molekule u vodenom dijelu i hidrofobne molekule lijeka u membranskom dvosloju međusobno povezane nekovalentnim interakcijama.¹⁷

Kao što je spomenuto, proces samoudruživanja je određen nekovalentnim interakcijama uključujući elektrostatske interakcije, vodikove veze, π - π interakcije, van der Waalsove interakcije i solvofobne efekte. Ove interakcije su energetske bitno slabije u odnosu na kovalentne veze, ali u dovoljnom broju mogu generirati samoorganizirane sustave pri čemu njihova osjetljiva ravnoteža određuje oblik i funkciju konačnog sustava.

Solvofobni efekti se moraju uzeti u obzir kada se proces samoudruživanja događa u vodi. U vodi su tipične nekovalentne interakcije poput vodikovih veza slabije zbog polarnog karaktera vode i konkurentnih vodikovih veza u odnosu na hidrofobni efekt, kao posljedica toga je samoudruživanje molekula pokretano i minimizacijom hidrofobnih površina izloženih vodi. Hidrofobni efekt se ne može prikazati kao jedan tip nekovalentnih interakcija nego kao kombinacija nekovalentnih interakcija kao što su dipol-dipol interakcije, vodikove veze ili van der Waalsove interakcije zajedno sa entropijskim i entalpijskim učincima dehidratacije lipofilnih površina.¹⁸

Općenito, ovakve reverzibilne nekovalentne interakcije su zaslužne za izuzetne karakteristike samoorganiziranih sustava¹⁹, kao što su:

- dinamičko ponašanje.
- visoki stupanj strukturne uređenosti, itd.
- mogućnost samopopravka (*eng.* self-healing, error checking), prilagodbe i ispravka pogreški.
- reakcija na vanjske utjecaje. Različiti vanjski utjecaji utječu na strukturu, morfologiju i svojstva ovih materijala.
- jednostavnost supramolekularne sinteze.
- mogućnost umetanja različitih liganada kombiniranjem građevnih jedinica.¹⁹

Premda je postignut veliki napredak u istraživanjima samoorganiziranih materijala u zadnjih nekoliko desetljeća, još uvijek postoje brojni izazovi za rješavanje. Jedan od glavnih izazova u supramolekularnoj kemiji uključuje razvoj homogenih i strukturno definiranih sustava s podesivim svojstvima koji bi pokrili široki izbor primjena. Zbog toga je potreban točan i racionalan dizajn kao i bolje razumijevanje pravila samoudruživanja za različite monomerne građevne jedinice kako bi stvorili pametne supramolekulske sustave osjetljive na vanjske podražaje s predvidljivim svojstvima i funkcijama.

Između mnogih opisanih građevnih jedinica (uključujući prirodne²⁰ ili sintetske²¹) peptidi su se pokazali kao najsvestranije jedinice te će se u narednim poglavljima usmjeriti pozornost na njihove glavne karakteristike.

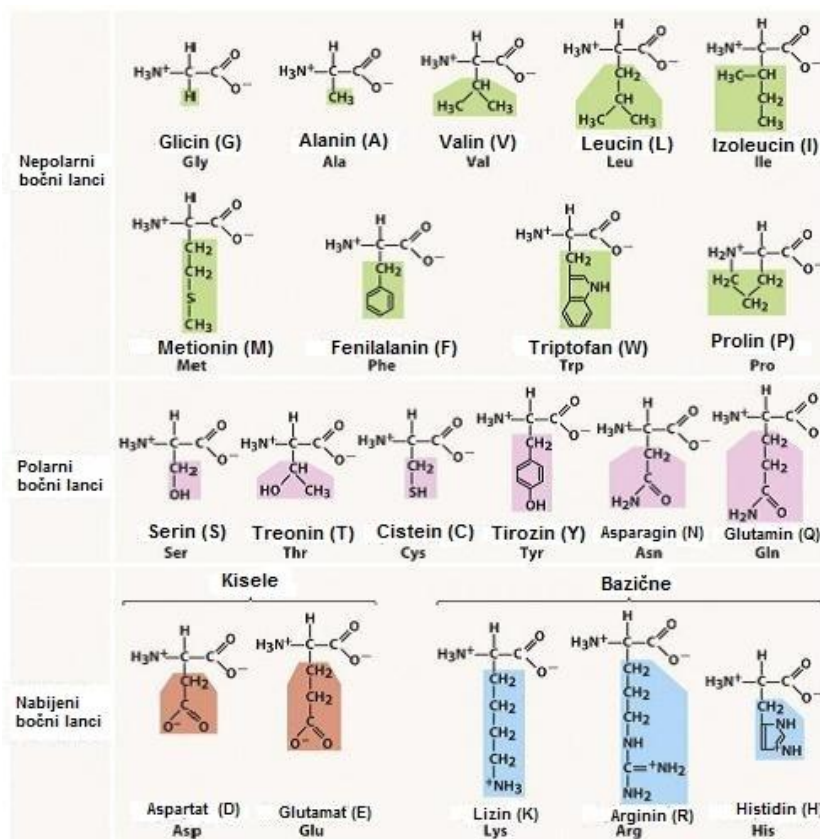
2.2. Samoudruživanje peptida

Peptidi su najčešće upotrebljavane biološke građevne jedinice korištene za dizajn samoorganiziranih sintetskih materijala i posjeduju mnoge prednosti koje ih čine posebno atraktivnim za tu svrhu. Proteini i peptidi sastavljeni su od 20 prirodnih L-aminokiselina (Slika 3.). Sve prirodne aminokiseline su kiralne osim glicina (G) i imaju istu osnovnu strukturu koja se sastoji od amino (-NH₂) i karboksilne (-COOH) grupe. Jedina razlika između njih je lanac (-R) koji se još naziva i bočni lanac koji je vezan na asimetrični ugljik (C_α). Peptidi poprimaju specifične konfiguracije ovisno o razmještaju skupina na bočnim lancima

peptida. U dizajnu samoorganiziranih peptida može se manipulirati brojem, tipom i slijedom aminokiselina što kao posljedicu daje određen odnos između aminokiselinskog slijeda i strukture.

Aminokiseline su građevne jedinice koje pokazuju različita fizikalno-kemijska svojstva koja ovise o naboju, hidrofobnosti, veličini i polarnosti bočnog lanca koji doprinosi njihovom biokemijskom djelovanju i određuje konačnu samoorganiziranu konformaciju. Npr., alifatski ostaci (A, I, L, M, V) omogućuju hidrofobne interakcije dok aromatske aminokiseline (F, W, Y) se uključuju u aromatske π - π interakcije. Polarni ostaci mogu se uključiti u interakcije sa svojim amino (H, K, R) pozitivnim ili kiselinskim (D, E) negativno nabijenim dijelovima. Ti nabijeni bočni lanci su važni za stvaranje specifičnih dipol-dipol interakcija između suprotno nabijenih dijelova koji pridonose stvaranju agregata ili se mogu koristiti u sprječavanju samoorganizacije kao posljedice odbijanja između istoimenih naboja. Ostale aminokiseline kao što su glicin (G) i prolin (P) mogu modificirati fleksibilnost peptidnog lanca. Npr., glicin uklanja steričke smetnje dok prolin uvodi strukturnu rigidnost jer je bočni lanac kovalentno vezan za amino grupu unutar peteročlanog prstena. Aminokiseline kao što su cistein (C) mogu sudjelovati u peptidnom umrežavanju intra- i intermolekularnim disulfidnim vezama te se vezati na druge vrste i metalne ione. Histidin (H) također može vezati metalne katione dok su serin, treonin i tirozin (S, T, Y) pogodni za kemijske ili enzimske modifikacije.²² Ako se uzme u obzir da samo tetrapeptidna sekvenca od 20 prirodnih aminokiselina daje 20^4 različitih kombinacija peptida onda je razumljivo zašto je racionalni dizajn ovih materijala još uvijek veliki izazov za znanstvenike.

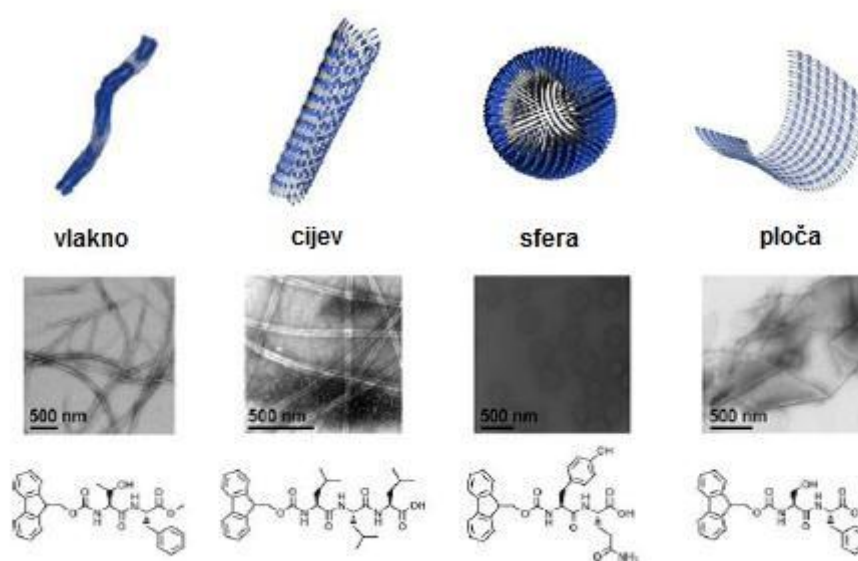
Ogromna svestranost peptida se također može smatrati prednošću koja ih u kombinaciji sa njihovom relativnom fizikalno-kemijskom stabilnošću i mogućnošću sinteze na velikoj skali, čini najboljim građevnim jedinicama za nove bioinspirirane samoudružene materijale.¹⁹ Nadalje, peptidi su se pokazali jako korisni u medicinskoj primjeni²³ zbog svoje intrinzične biokompatibilnosti i biorazgradivosti i jer sudjeluju u mnogim fiziološkim i biokemijskim funkcijama.



Slika 3. Prirodne aminokiseline klasificirane prema kemijskim svojstvima bočnog lanca (-R).²³

Dva najčešća „prirodna“ strukturalna motiva korištena kod materijala temeljenih na peptidima su α -heliks i β -nabrana ploča (*eng.* β -sheet). Nadalje, peptidni dijelovi lako se mogu kemijski ili biološki modificirati te uključiti dodatne supramolekulske interakcije što može rezultirati velikim brojem različitih samoorganiziranih struktura kao što su nanocijevi, nanovlakna, nanosfere, gelovi i slično (Slika 4.).²⁴

Kao što je spomenuto u tekstu, postoji velik broj aminokiselinskih kombinacija pa zbog toga ima mnogo klasifikacija samoorganiziranih peptida uzevši u obzir npr. sastav bočnog lanca, sekundarne interakcije uključene u proces samoudruživanja, nanostrukture nastale tim procesom i slično.



Slika 4. Slikoviti prikaz različitih nanostrukture nastalih nakon samoudruživanja dipeptida i tripeptida sa Fmoc zaštitom na *N*-terminalnom kraju te njihove TEM mikrografije.²⁵

2.3. Agregacija peptida i amiloidne bolesti

Jedan od glavnih obilježja amiloidnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i dijabetes tipa II je samoudruživanje proteina u vlakna.²⁶ Kod navedenih bolesti je karakteristična abnormalna agregacija topljivih proteina i peptida u nakupine amiloidnih vlakana, plakove koji dovode do napredovanja bolesti i na kraju do smrti stanica. Amiloidne bolesti (Alzheimerova bolest) su glavni uzrok demencije i gubitka pamćenja što pogađa više od 40 milijuna ljudi širom svijeta. Brojka će se povećati na procijenjenih 75.6 milijuna do 2030. godine i otprilike na 135.5 milijuna do 2050.²⁷ Ovaj trend je najviše prisutan u razvijenim zemljama zahvaljujući porastu starije populacije. Alzheimerova bolest i ostali oblici demencije su neurodegenerativni poremećaji povezani sa starenjem i s obzirom da ljudi sve duže žive, te bolesti postaju ozbiljan problem. Nažalost, trenutno dostupne terapije u najboljem slučaju pružaju samo privremeni simptomatski oporavak, ali ne zaustavljaju napredovanje bolesti. Drugim riječima, još uvijek ne postoji lijek protiv Alzheimerove bolesti. Određene terapije su pokazale poboljšanje u liječenju bolesti što ukazuje na nužnost povećanja istraživačkih aktivnosti usmjerenih na pronalaženje i razvoj novih metoda liječenja amiloidnih poremećaja. Samoorganizirani peptidi imaju ključnu ulogu ne samo što mogu

poslužiti kao model za studiranje agregacije nativnih proteina nego zato jer mali peptidi mogu biti korisni kao potencijalni inhibitori amiloidne agregacije.

Pojam amiloid se izvorno odnosi na proteinske nakupine slične škrobu (amiloid = „škrobu sličan“). Danas se taj pojam odnosi na proteine ili peptide koji se samoudružuju u vlakna. Istraživanja su pokazala da su vlakna građena od savinutih paralelno orijentiranih β -nabranih ploča u obliku traka postavljenih okomito s obzirom na os niti (*eng.* cross β -sheet tj. poprečni ili savinuti β -sheet).²⁸ Ne postoji specifični peptidni slijed koji se samoorganizira u vlakna, npr. više od 50 vrsta amiloidnih bolesti je opisano i kod svake od njih je uključen različiti protein. Zapravo vjeruje se da će se bilo koji protein u otopini iznad kritične koncentracije kroz neko vrijeme samoorganizirati u vlaknaste agregate. U tom slučaju topljivo stanje proteina (prirodna struktura proteina) je stabilno stanje s minimalnom energijom, a prijelaz prema stvaranju niti odnosno vlaknastih agregata može potrajati nekoliko minuta, nekoliko dana ili godina.²⁹ Nepostojanje specifičnog proteinskog slijeda dodatno otežava istraživanje mehanizama agregacije proteina i pronalaženja novih metoda kako bi se usporile ili zaustavile amiloidne bolesti.

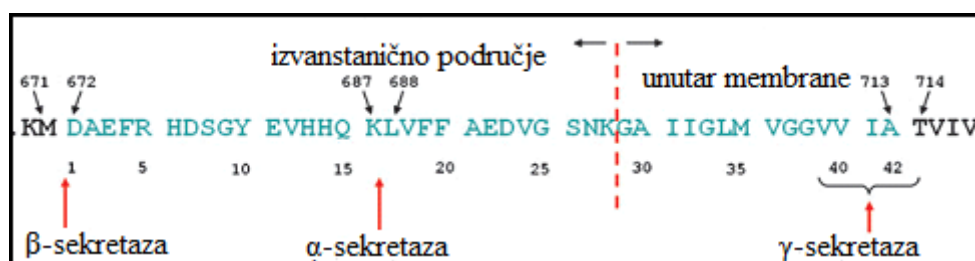
Glavno obilježje Alzheimerove bolesti je nastajanje plakova na mozgu koji sadrže amiloidna vlakna nastala samoorganizacijom amiloid- β proteina. Amiloid- β ($A\beta$ ili A-beta) je peptid sastavljen od 40–42 aminokiseline i glavna je komponenta amiloidnih plakova u mozgu kod Alzheimerove bolesti. Protein $A\beta$ se formira nakon pravilnog cijepanja amiloid-prekursorškog proteina (APP), transmembranskog proteina odnosno proteina koji prolazi kroz staničnu membranu neurona. APP je u velikoj mjeri prisutan u središnjem živčanom sustavu gdje ga se može pronaći na sinapsama između neurona. APP kao normalna komponenta organizma pomaže kod rasta i preživljenja neurona te kod njihovog oporavka od različitih oštećenja.

APP se cijepa pod utjecajem više vrsta proteolitičkih enzima sekretaza (Slika 5.).³⁰ U normalnim okolnostima cijepanje APP-a se odvija po neamiloidogenom putu, djelovanjem α - i γ -sekretaze i to između 687 (K) i 688 (L) aminokiseline pri čemu nastaju manji fragmenti peptida $A\beta$. U amiloidogenom procesu cijepanja APP proteina, β -sekretaza cijepa APP na specifičnom mjestu u izvanstaničnom dijelu, između 671 i 672 aminokiseline, stvarajući *N*-terminalni $A\beta$ i topljivi fragment $APP_s-\beta$. Sljedeće cijepanje u transmembranskoj regiji pod

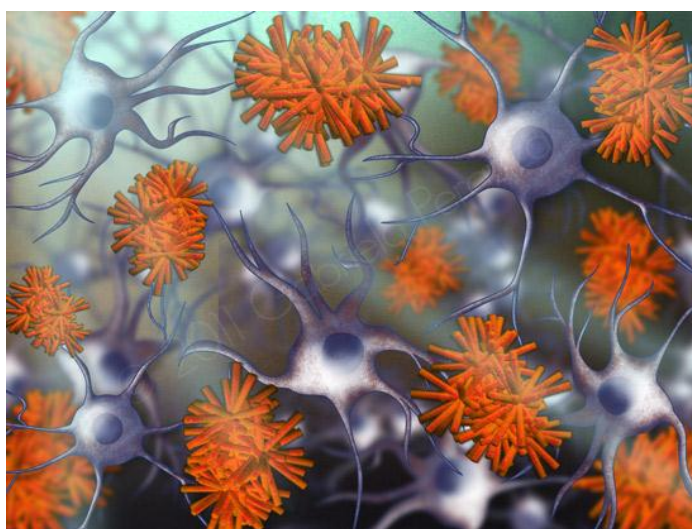
utjecajem γ -sekretaze stvara smjesu $A\beta$ komponenti s dominirajućim fragmentima, $A\beta(1-40)$ i $A\beta(1-42)$.

Protein $A\beta(1-42)$ je manje topljiv, čini jezgru amiloidnih plakova te agregiranjem stvara amiloidne trimere kao osnovne reprodukcijske jedinice koje se zatim slažu u β -nabrane ploče i tvore amiloidne niti koje se pohranjuju kao izvanstanični plakovi.

Izvanstanični odnosno amiloidni ili senilni plakovi nakupljaju se između neurona počevši s neuronima koji kontroliraju pamćenje (Slika 6.). Plakovi ometaju normalnu komunikaciju između živčanih stanica, uzrokuju kidanje sinapsi i naposljetku apoptozu odnosno smrt stanica. Takve neurodegenerativne promjene na mozgu se očituju u gubitku pamćenja - demenciji i promjenom ponašanja kod osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti.

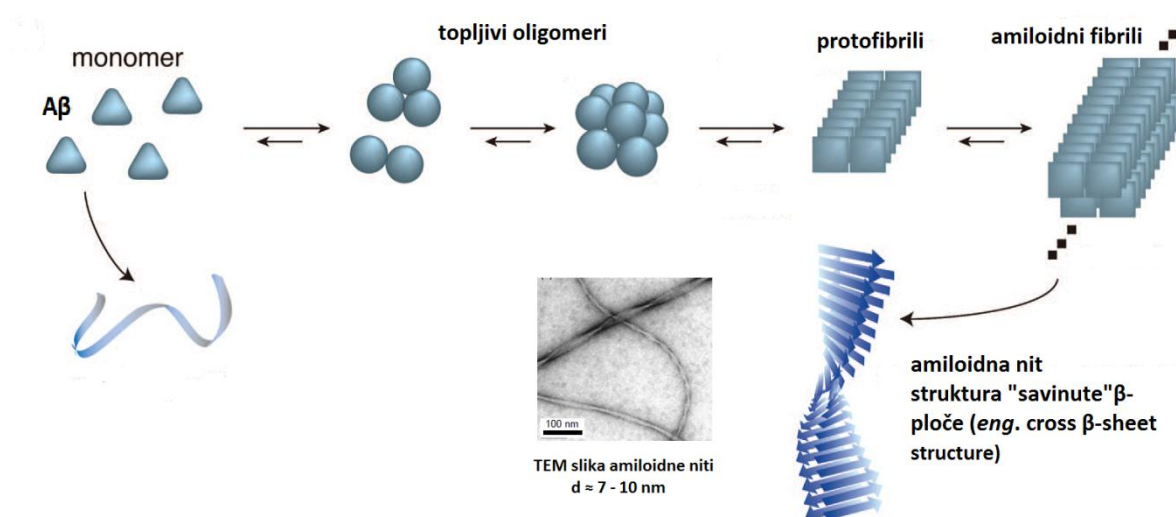


Slika 5. Shematski prikaz cijepanja amiloid-prekursorškog proteina (APP, gornje numeriranje) do amiloid- β peptida ($A\beta$, donje numeriranje).³⁰



Slika 6. Slikoviti prikaz amiloidnih plakova između neurona.

Protein A β (1-42) se puno lakše i brže samoorganizira u amiloidna vlakna nego protein A β (1-40) (Slika 7.).³ A β (1-42) prvo tvori topljive oligomere (globularni oblik) koji se zapravo smatraju puno više toksičnim za neurone nego ostali oblici amiloida. Struktura oligomera nije potpuno definirana - no spektroskopska mjerenja cirkularnog dikroizma (CD) upućuju na to da su oligomeri sastavljeni od β -nabranih ploča. Daljnjim procesom agregacije nastaju protofibrili i naposljetku amiloidne niti. Difrakcija X-zraka je pokazala da su niti građene od savinutih paralelno orijentiranih β -nabranih ploča u obliku traka postavljenih okomito s obzirom na os niti (*eng.* cross beta-sheet tj. poprečni ili savinuti beta-sheet). Vodikove veze odnosno hidrofobne i elektrostatske interakcije između dviju ili više β -nabranih ploča uzrokuju stabilnost i netopljivost strukture.

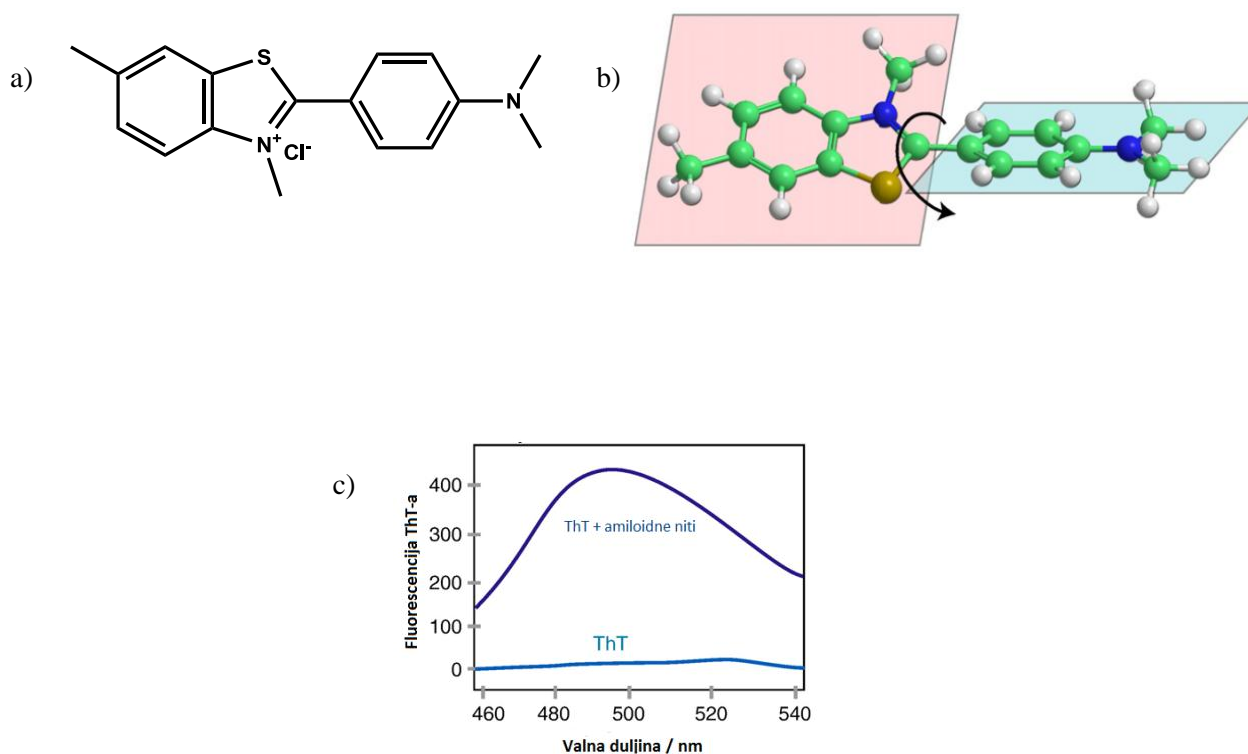


Slika 7. Prikaz agregacije monomera peptida A β u konformaciji slučajnog klupka (*eng.* random coil) u amiloidne niti sastavljene od paralelnih β -nabranih ploča.³

Amiloidni plakovi se u mozgu čovjeka selektivno detektiraju nakon smrti tkivnim bojama, kongo-crvenilo (*eng.* Congo Red) i tioflavin T (*eng.* Thioflavin T, ThT).

Tioflavin T je fluorescentna histološka boja koja se najviše koristi u bojanju odnosno postmrtnoj detekciji amiloidnih vlakana. Najvažnija karakteristika koja je ujedno i prednost pred ostalim amiloidnim bojama je veliko povećanje emisije fluorescencije prilikom vezanja

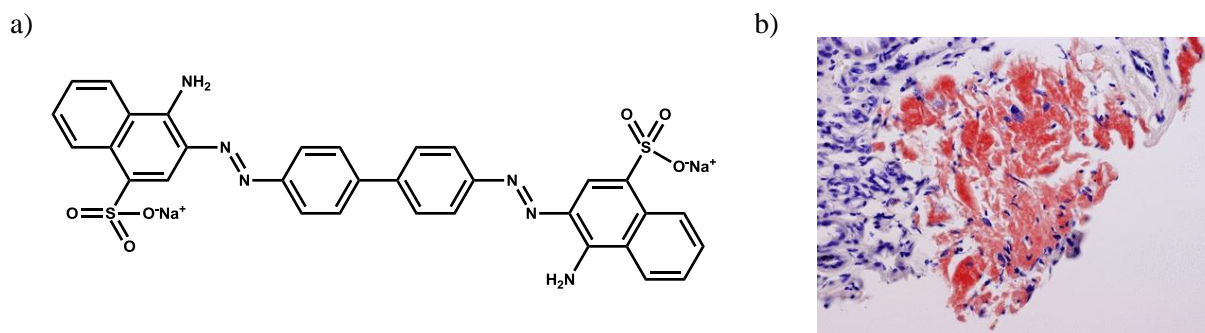
na amiloidne niti (Slika 8.). Molekula ThT je zapravo „molekularni rotor”. Posjeduje dva planarna dijela, benzotiolni i benzilaminski koji mogu rotirati oko C-C veze. ThT se selektivno veže na β -nabranu ploču amiloidnog peptida pri čemu dolazi do zakočenja te rotacije što uzrokuje emisiju fluorescencije.⁶ Upravo zbog sposobnosti tioflavina T da se specifično veže na amiloide, dizajnirani su derivati tog spoja kao potencijalni inhibitori agregacije ili kao klinički reagensi za upotrebu u oslikavanju amiloidnih plakova kod živih pacijenata.⁷



Slika 8. a) Kemijska struktura tioflavina T; b) Rotacija dvaju planarnih dijelova tioflavina T oko C-C veze; c) Karakteristično povećanje emisije fluorescencije tioflavina T pri vezanju na amiloidne niti.⁶

Kongo-crvenilo (*eng.* Congo Red) se od 20-ih godina prošlog stoljeća koristi kao tkivna boja za bojanje amiloidnih plakova, također postmrtno (Slika 9.)³¹. Za kongo-crvenilo je specifična birefringencija ili dvostruka refrakcija pod polariziranim svjetlom koju uočimo kao žuto-zeleno obojenje prilikom vezanja na amiloide.³² Istraživanja su pokazala da se kongo-crvenilo veže na protein $A\beta$ elektrostatskim interakcijama preko sulfonatnih grupa te da je ovaj spoj potencijalni inhibitor amiloidne agregacije odnosno da se veže na monomer $A\beta(1-$

40) i inhibira oligomerizaciju odnosno u potpunosti mijenja sam proces agregacije.⁷ Kao potencijalni lijek, kongo-crvenilo je toksičan spoj zbog metabolita benzidina i slabo prolazi kroz krvno-moždanu barijeru.



Slika 9. a) Kemijska struktura kongo-crvenila; b) Amiloidni plak obojan kongo-crvenilom.³²

2.4. Mali peptidi kao modeli amiloidne agregacije

Istraživanja su pokazala da su mali fragmenti proteina odgovorni za amiloidnu agregaciju.⁴ S obzirom da su takvi mali peptidni fragmenti jednostavni za sintezu, kratki peptidi trenutno predstavljaju najprikladniju opciju za istraživanje amiloidne agregacije.^{28,33} Istraživanja u zadnjih desetak godina su usmjerena na pronalazak najmanjeg peptidnog slijeda koji se samoorganizira u vlakna slična amiloidnima. Neki primjeri su prikazani u Tablici 1. i važno je napomenuti da su već peptidi od tri aminokiseline (VYK) dovoljni za nastanak vlakana sličnih amiloidnima, organiziranih u vlaknaste samoagregate na sličan način kao kod cjelovitog proteina.²⁸

Tablica 1. Pregled kratkih peptidnih fragmenata koji se samoorganiziraju u amiloidna vlakna.²⁸

Naziv proteina	Povezana amiloidna bolest	Amiloidna sekvenca
Amilin (<i>eng.</i> Islet Amyloid PolyPeptide, IAPP)	Dijabetes tipa 2	NFGAIL / NFLVH
Ljudski kalcitonin	Karcinom štitnjače	DFNK
Ljudski protein medin	Aortna amiloidoza	NFGSVQ
Amiloid-beta peptid	Alzheimerova bolest	KLVFFA
PHF6 (τ (tau)-protein)	Alzheimerova bolest	VYK
Gelsolin	Finska nasljedna amiloidoza	SFNNGDCCFILD
Serum amiloidni protein (SAP)	Kronična inflamatorna amiloidoza	SFFSFLGEAFD
B2-mikroglobulin	Bubrežna amiloidoza	DWSFYLLYTEFT

Od svih proteina navedenih u Tablici 1., najviše je istraživana amiloid- β peptid i to upravo zbog njegove medicinske važnosti.^{28, 34} Hilbich i suradnici su još početkom 90-ih godina prošlog stoljeća pokazali važnost fragmenta amiloid- β proteina, LVFF za stvaranje β -nabrane ploče.³⁵ Nekoliko godina kasnije su Tjenberg i suradnici otkrili da se pentapeptid koji u svojoj strukturi sadrži aminokiseline iz amiloidnog proteina - KLVFF ($A\beta(16-20)$) može vezati na sam protein i zaustaviti amiloidnu agregaciju.³⁶ Ista grupa je proučavala peptide s različitim brojem aminokiselina, a koji su sadržavali KLVFF sekvencu i prvo otkrila da najkraći peptid koji se samoudružuje u vlakna slična amiloidnima je dekapeptid HQKLVFFAED ($A\beta(14-23)$).³⁷ Međutim, nedavna istraživanja Mereditha,³⁸ Hamleya³⁹ i njihovih suradnika su pokazala da se već pentapeptidni slijed KLVFF može samoudruživati u vlakna slična amiloidnima. Samoudruživanje većih peptida kao što je npr. $CH_3CO-KLVFFAE-NH_2$ opisao je Lynn⁴⁰, Tycko⁴¹, Nilsson⁴² te mnogi drugi.

Peptidi i proteini s aromatskim aminokiselinama su pokazali veliku sklonost samoudruživanju u vlakna sa sekundarnom strukturom β -nabrane ploče,⁴³ no sam mehanizam agregacije još nije potpuno razjašnjen. Serpell i suradnici⁴⁴ su na primjeru oligopeptida

KFFEAAAKKFFE pokazali da aromatske aminokiseline direktno sudjeluju u aromatskim π - π interakcijama. Do istog zaključka su došli Desamero i suradnici⁴⁵ na primjeru peptida IAPP₂₂₋₂₉ te Gazit⁴⁶ za dipeptid s minimalnom sekvencom FF. Ove interakcije zasigurno imaju učinak na strukturu i svojstva amiloidnih agregata, ali njihov doprinos se ne može primijeniti na sve amiloidne sustave zbog drugih načina interakcije opisanih za aromatske aminokiseline. U zadnje vrijeme mnoga istraživanja vezana za ulogu aromatskih aminokiselina u procesu amiloidne agregacije ističu da njihova velika sklonost stvaranju amiloidnih vlakana proizlazi iz njihove hidrofobnosti, sklonosti stvaranju β -nabranih ploča i planarne geometrije, a ne samo zbog stvaranja π - π interakcija.⁴⁷

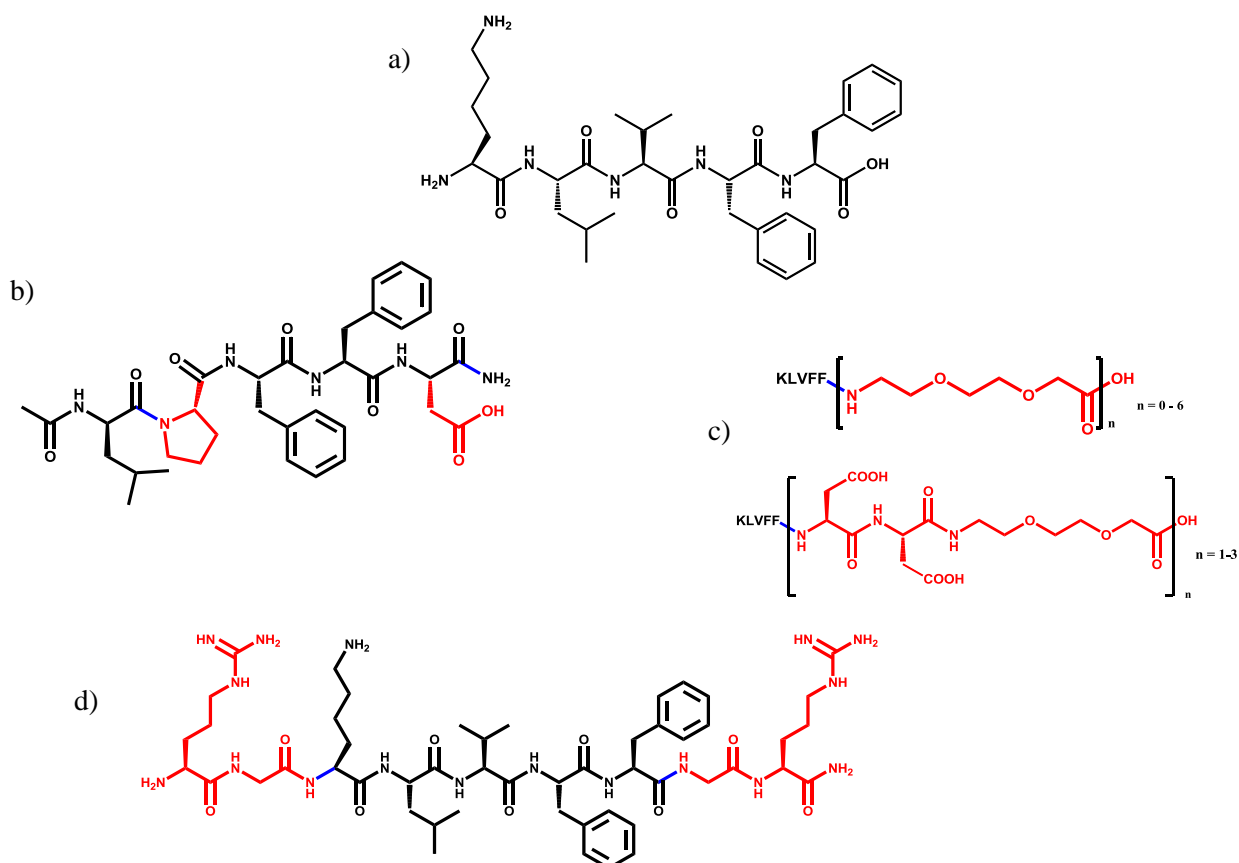
2.5. Mali peptidi kao inhibitori amiloidne agregacije

Male organske molekule te peptidi odnosno peptidometici su dvije najvažnije kategorije inhibitora amiloidne agregacije.⁴⁸ Upotreba peptida donosi mnoge prednosti uključujući jednostavnost sinteze te mogućnost modifikacija peptidnog slijeda i njihove biokompatibilnosti i biomimetičke prirode.

Premda je prisutnost amiloidnih vlakana najvidljiviji dokaz amiloidne bolesti, globularni oblici odnosno oligomeri kao prekursori u amiloidnoj agregaciji su smatrani više toksični nego amiloidna vlakna⁴⁹ i zbog toga bi se također morali uzeti u obzir kao ciljne molekule u inhibiciji amiloidne agregacije. S obzirom na veliki broj istraženih peptida i inhibitora amiloidne agregacije, u ovom ulomku će se navesti samo najrelevantniji primjeri.

U tekstu je ranije spomenuto da se pentapeptid KLVFF može samoorganizirati u vlakna slična amiloidnima, ali da se također može i vezati na sam protein i zaustaviti amiloidnu agregaciju. No mnogi znanstveni radovi su pokazali da je KLVFF aminokiselinski slijed u amiloid- β peptidu (A β (16-20)) odnosno tzv. centralna hidrofobna jezgra izuzetno važan za samoudruživanje tog peptida u amiloidna vlakna jer stabilizira intra- i intermolekulske interakcije uključene u stvaranju amiloidnih niti.⁵ Zbog navedenih činjenica dosta su istraživani kratki peptidi koji sadrže takav slijed aminokiselina kao potencijalni inhibitori amiloidne agregacije. Takvi kratki sintetski peptidi, tzv. „lomitelji β -nabrane ploče” (eng. „ β -sheet breaker peptides”) se vežu na središnju hidrofobnu regiju proteina zaslužnu za amiloidnu agregaciju i pritom sprječavaju stvaranje strukture β -nabrane ploče što prethodi slaganju u niti odnosno samoj agregaciji. Na slici 10. prikazana je kemijska struktura

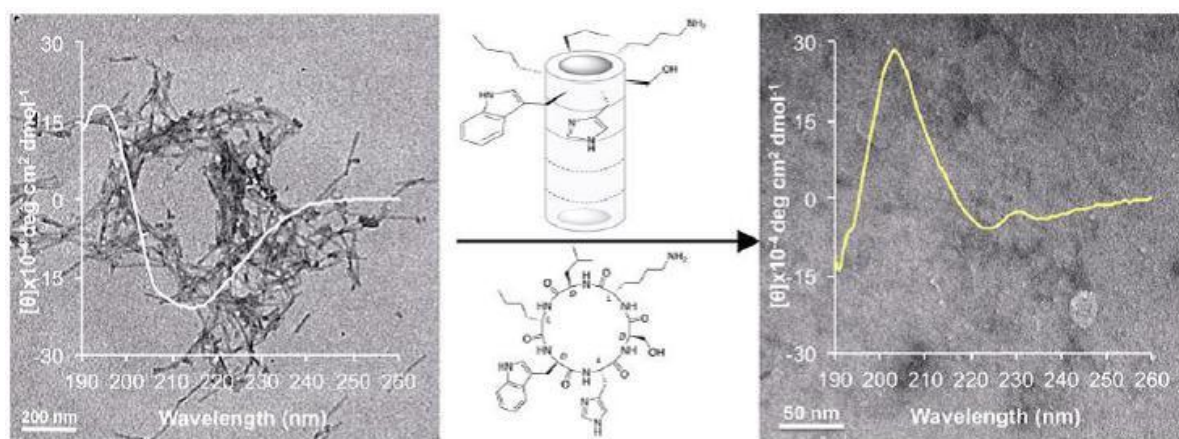
pentapeptida KLVFF te kemijske strukture spomenutih peptidnih inhibitora.⁵⁰ U heksapeptidu iA β 5p, (KLPFFG) prolin i asparaginska kiselina su zamijenili valin odnosno alanin iz KLVFFA sekvence A β (1-42) peptida. Takav sintetski peptid prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, sprječava stvaranje amiloidnih niti *in vitro* i smanjuje neurotoksičnost u staničnim kulturama te sprječava nakupljanje amiloida kod životinjskih modela. Dobri inhibitori su i oni u kojima su na slijed KLVFF vezani hidrofilni lanci aminoetoksietoksietata i aspartata (Slika 10c).⁵⁰ Potencijalni nedostatak takvih inhibitora s obzirom da su građeni od L-aminokiselina je njihova osjetljivost na razgradnju pod utjecajem enzima proteaza. Prikazan je i primjer peptidomimetika u kojem je na *N*- i *C*-terminalnoj strani slijeda KLVFF vezan glicin i arginin pri čemu su upotrebljene D-aminokiseline te je vrlo stabilan inhibitor koji lako prolazi kroz krvno-moždanu barijeru i pokazuje značajnu aktivnost kod transgeničnih modela miševa.⁵⁰



Slika 10. Kemijske strukture peptidomimetika-„lomitelja β -nabrane ploče” (eng. β -sheet breaker peptides); a) pentapeptid KLVFF (H-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OH); b) pentapeptid Ac-LPFFD-NH₂ (iA β 5p); c) peptidomimetici u kojima je KLVFF sekvenca vezana na hidrofilne lance aminoetoksi

etoksiacetata i aspartata; d) peptidomantik RGKLVFFGR-NH₂. Crvenom bojom na kemijskim strukturama su označene kemijske modifikacije aminokiselinskog slijeda KLVFF.⁵⁰

U zadnjih pet godina intenzivno su istraživani ciklički peptidi kao inhibitori amiloidne agregacije^{51a} s obzirom da su strukturno i biokemijski slični amiloidnim peptidima. Rahimpour je sa suradnicima razvio ciklički D,L- α -peptid koji se vezao na amiloid- β peptid i inhibirao njegovu agregaciju u amiloidna vlakna.^{51b} Struktura tog cikličkog peptida, kao i njegov CD spektar i TEM mikrografija su prikazani na slici 11.

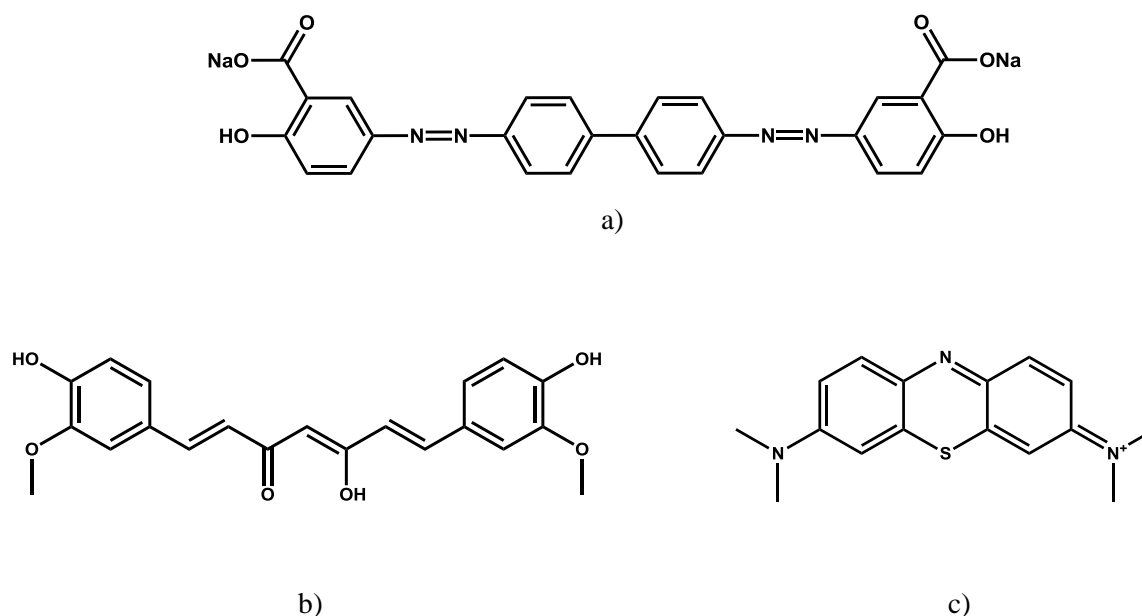


Slika 11. TEM mikrografije i odgovarajući CD spektri amiloidnih agregata (lijevo) prije te nakon dodatka inhibitora (desno). Struktura cikličkog peptida kao inhibitora amiloidne agregacije (sredina).⁵¹

Navedeni ciklički peptid je uzrokovao razgradnju amiloidnih agregata te je zaštitio stanice PC12 feokromocitoma štakora od toksičnog djelovanja amiloida.

Kao što je već spomenuto, na osnovi struktura navedenih amiloidnih boja, kongo-crvenila i tioflavina T dizajnirani su i proučavani novi spojevi kao potencijalni inhibitori amiloidne agregacije. To su male, planarne aromatske molekule koje reagiraju sa sekundarnom strukturom β -nabrane ploče i sprječavaju agregaciju u vlakna (Slika 12.).^{52a} Krisamin G, kao manja i lipofilnija varijanta toksičnog kongo-crvenila, uspješno prolazi krvno-moždanu barijeru i sprječava agregaciju u niti. Dok metilen-plava inhibira nastanak neurotoksičnih oligomera. Da bi neka slična azo-sulfonska boja bila uspješan inhibitor

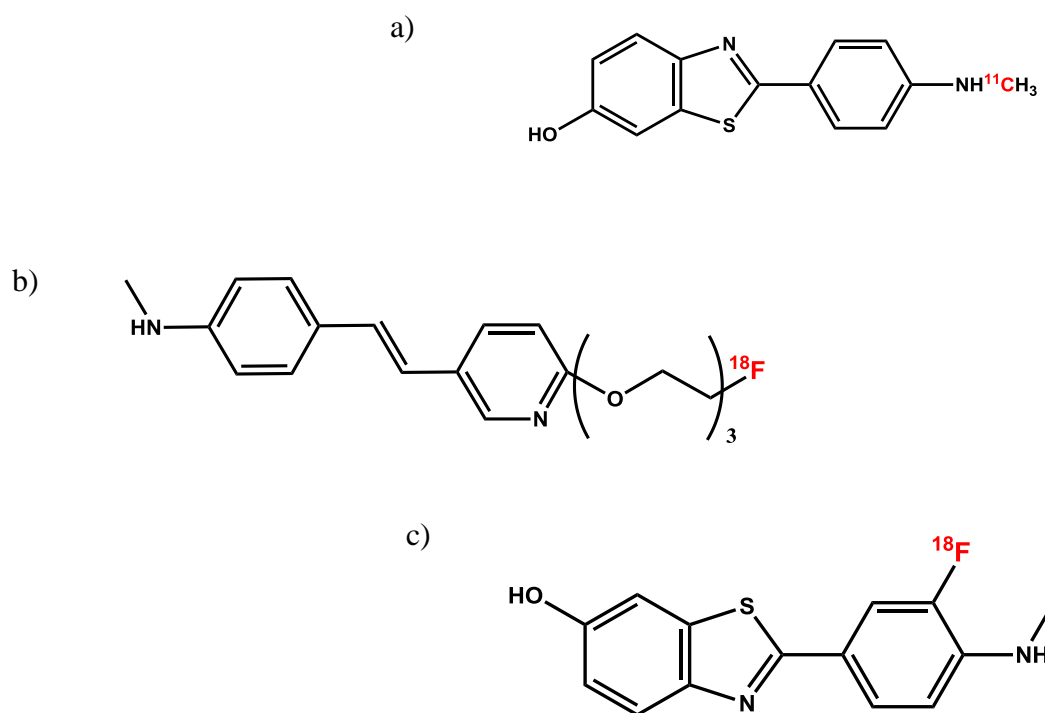
amiloidne agregacije, mora posjedovati sulfonske grupe na sličnoj udaljenosti u molekuli kao i kod kongo-crvenila što zapravo dovodi do precizne interakcije između negativno nabijenih sulfonskih grupa i amiloid- β proteina. Također je bitno i postojanje sekundarne terminalne fenilne grupe kao i hidrosilne skupine na aromatskim krajevima. Kurkumin je sastojak poznatog začina kurkume. Kao molekula posjeduje sve strukturne karakteristike kao i kongo-crvenilo te je zato odličan inhibitor amiloidne agregacije. Također se veže na plakove i smanjuje razinu amiloida *in vivo*. Uspješno prolazi krvno-moždanu barijeru, veže se na amiloid- β protein i prouzrokuje razgradnju plakova što je i dokazano kod transgeničnog miša. Također je uspješno smanjio oksidativni stres koji se također javlja kod Alzheimerove bolesti. Američka Agencija za hranu i lijekove (*eng.* Food and Drug Administration, FDA) je 2013. godine odobrila kapsule kurkumina BCM-95 za kliničku upotrebu kod liječenja Alzheimerove bolesti. Kurkumin daje novu nadu oboljelima - zaustavlja propadanje kognitivnih funkcija i sprječava stvaranje plakova. Ujedno, povišuje razinu vitamina E u tijelu, pa se najbolji rezultati u liječenju postižu kombinacijom kurkumina i vitamina D3.^{52b}



Slika 12. Kemijske strukture malih molekula, derivata amiloidnih boja (kongo-crvenilo i tioflavin T) kao inhibitora amiloidne agregacije: a) Krisamin G; b) Kurkumin; c) Metilen-plava (MB).^{52a}

Na temelju strukture amiloidnih boja sintetizirani su PET radiobilježivači koji se koriste za *in vivo* detekciju amiloidnih plakova i pomoću njih se mogu u ranoj fazi bolesti detektirati plakovi. Pozitron emisijska tomografija (PET) je nuklearno-medicinska tehnika

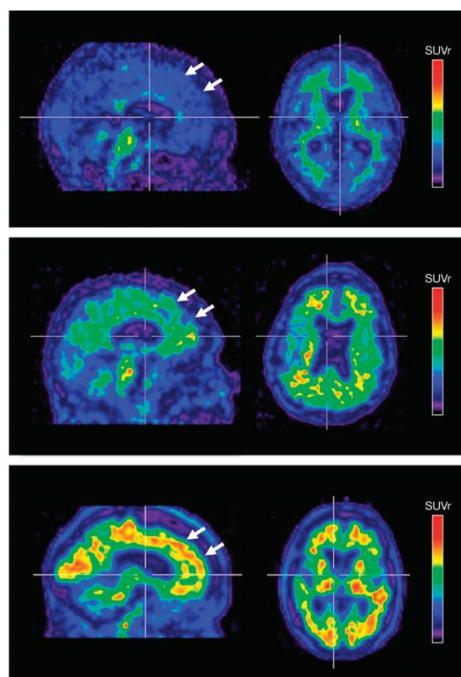
koja principom slikovne dijagnostike (*eng.* molecular imaging) daje trodimenzionalni prikaz funkcionalnih procesa u organizmu. Male organske molekule se obilježavaju radionuklidima (^{18}F , ^{11}C , ^{13}N) i intravenski ubrizgavaju u tijelo. Takve molekule (radioobilježivači) se nakupljaju u stanicama ovisno o njihovoj metaboličkoj aktivnosti i emitiraju pozitivno nabijenu česticu-pozitron pri čemu dolazi do oslobađanja gama zračenja koje detektira sustav i stvara odgovarajuću trodimenzionalnu sliku koncentracije radioobilježivača u tijelu. Slika 13. prikazuje kemijske strukture najpoznatijih PET radioobilježivača koji su u zadnjih nekoliko godina odobreni od strane američke agencije FDA za kliničku upotrebu.⁵³ Oni se selektivno vežu na amiloidne plakove, a s obzirom da su obilježeni izotopom fluora i ugljika, mogu se detektirati PET uređajem.



Slika 13. Kemijske strukture PET radioobilježivača odobrenih od strane FDA za kliničku upotrebu⁵³; a) Pittsburgh spoj B (*eng.* Pittsburgh compound B), [^{11}C] PIB; b) Florbetapir (^{18}F) ili [^{18}F] AV-45 (AmyvidTM); c) Flutemetamol (^{18}F) ili VizamyTM.

Na slici 14. su prikazani rezultati 3. faze kliničkih ispitivanja (često se naziva i terapijska potvrdna faza) najpoznatijeg radioobilježivača [^{18}F] AV-45 (AmyvidTM) koji su potvrdili korelaciju PET slika mozga nakon unosa radioobilježivača u mozak sa *post mortem*

studijama amiloidnih plakova. Uzevši u obzir podatke dobivene u prve dvije faze ispitivanja pokazano je da se taj radiobilježivač može uspješno koristiti u *in vivo* PET dijagnostici amiloidnih plakova.



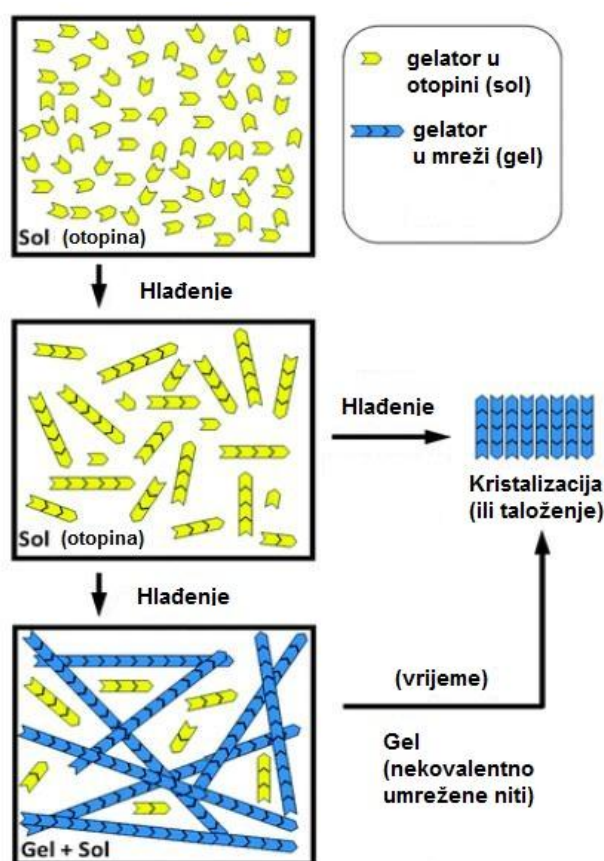
Slika 14. PET slike mozga nakon unosa radioobilježivača [^{18}F] AV-45 za tri različita pacijenta; gornja slika prikazuje mozak zdravog pacijenta bez amiloidnih plakova; u sredini je prikazan mozak pacijenta sa umjerenim količinama amiloidnih plakova u ranijoj fazi Alzheimerove bolesti; donja slika prikazuje mozak pacijenta u kasnoj fazi Alzheimerove bolesti s velikom količinom amiloidnih plakova (bijeale strelice).⁵³

2.6. Supramolekularni gelovi

Male organske molekule procesom samoudruživanja nekovalentnim interakcijama (vodikovim vezama, van der Waalsovima silama, π - π interakcijama, elektrostatskim interakcijama te interakcijama prijenosa naboja) povezuju molekule, stvaraju niti mikrometarske duljine i nanometarskog promjera koje nekovalentnim umrežavanjem i/ili mehaničkim ispreplitanjem stvaraju trodimenzionalnu mrežu koja imobilizira molekule

otapala te uzrokuje gubitak fluidnosti sustava odnosno nastanak gela.² Ovakvi sustavi su u zadnjih 20-ak godina privukli veliku pažnju istraživača upravo zbog njihove potencijalne primjene u kozmetičkoj industriji, pripravi viskoelastičnih materijala, dizajnu sustava za prijenos i kontrolirano otpuštanje lijekova, tehnologiji senzora, tkivnom inženjeringu, obradi hrane te farmakologiji.⁵⁴

Kako bi nastao gel, najčešće se molekule gelatora moraju prvo otopiti pri povišenoj temperaturi, nakon čega slijedi hlađenje otopine i samoudruživanje molekula u gel (Slika 15.).



Slika 15. Slikoviti prikaz procesa nastanka supramolekularnog gela.²

Kada se molekule gelatora počnu samoudruživati nekovalentnim interakcijama može doći do pojave drugih fizikalnih fenomena kao što su taloženje ili kristalizacija što može spriječiti nastanak gela. Međutim, sustav gelator-otapalo potiče anizotropan rast jednodimenzionalnih niti koje se dalje umrežavaju u kompleksnu mrežu koja imobilizira molekule otapala pri čemu se izbjegne karakteristična fazna separacija uočena kod procesa kristalizacije. Kao što je prikazano na Slici 15. do kristalizacije može doći nakon formiranja

gela te su gelski agregati kinetički zarobljeni i nisu termodinamički stabilni sustavi. Kao posljedica toga, proces fibrilacije odnosno stvaranja niti je strogo kinetički ovisan.⁵⁵ Uzevši ovo u obzir, konačna će mehanička svojstva gelova biti definirana ne samo svojstvima samih niti odnosno vlakana (širina, duljina, itd.) nego i otapalom u kojem dolazi do samoudruživanja. Važno je napomenuti da određen postotak molekula gelatora ostaje slobodan u otopini što gelu daje karakteristično dinamičko ponašanje zbog izmjene gelatora između gel i sol stanja.

Kemijski (polimerni) gelovi nastaju stvaranjem kovalentnih veza među molekulama čije udruživanje vodi nastanku termo-ireverzibilne mreže. Za razliku od polimernih gelova, formiranje fizikalnih gelova je termoreverzibilno te upravo zbog toga predstavlja zanimljivo područje istraživanja supramolekularne kemije.

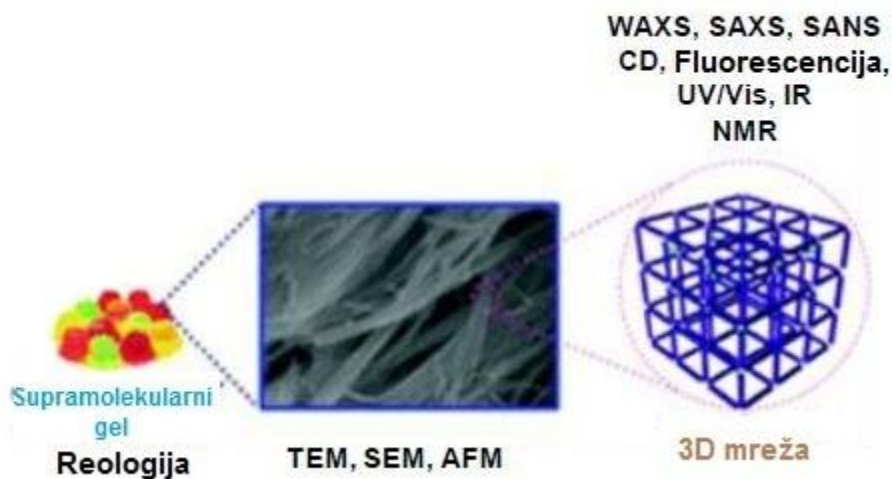
Mnogi gelatori su pronađeni slučajnim odabirom i zato se dizajn novih molekula gelatora temelji na izradi baza spojeva s nekoliko strukturnih modifikacija postojećih gelatora.

Unatoč činjenici da se do danas saznalo mnogo o fenomenu geliranja, vrlo je teško predvidjeti nastanak gela ovisno o strukturnim karakteristikama kandidata, a još je teže predvidjeti koja otapala će gelirati i koliko efikasno. Dokazano je da vrlo male promjene u konstituciji, konfiguraciji ili samo konformaciji molekula mogu nevjerojatno utjecati na svojstva gelatora. No u zadnjih nekoliko godina postignut je izvanredan napredak u razumijevanju strukturnih preduvjeta za geliranje. Najčešće funkcijske skupine koje su pronađene kod molekula gelatora:

- i) Amidi (peptidi), uree i hidroksilne skupine (ugljikohidrati) koji se mogu povezivati vodikovim vezama.
- ii) Dugi alifatski lanci koji se povezuju van der Waalsovima silama i hidrofobnim interakcijama.
- iii) Aromatske skupine (π - π interakcije).

Poznavanje i razumijevanje fenomena samoudruživanja i mehanizama geliranja, osnovno je za dizajn novih gelatora s ciljem dobivanja novih materijala sa željenom primjenom. Međutim, za istraživače još je uvijek teško u potpunosti okarakterizirati sva svojstva tih novih materijala zahvaljujući njihovoj dinamičkoj prirodi. Veliki napredak u

karakterizacijskim tehnikama omogućuje uvide u proces samoudruživanja na različitim razinama zahvaljujući novim alatima za dizajn i razvoj novih i boljih gelatora (Slika 16.).⁵⁶



Slika 16. Slikoviti prikaz karakterizacijskih tehnika s obzirom na različita stanja samoorganizacije gelatora.^{56b}

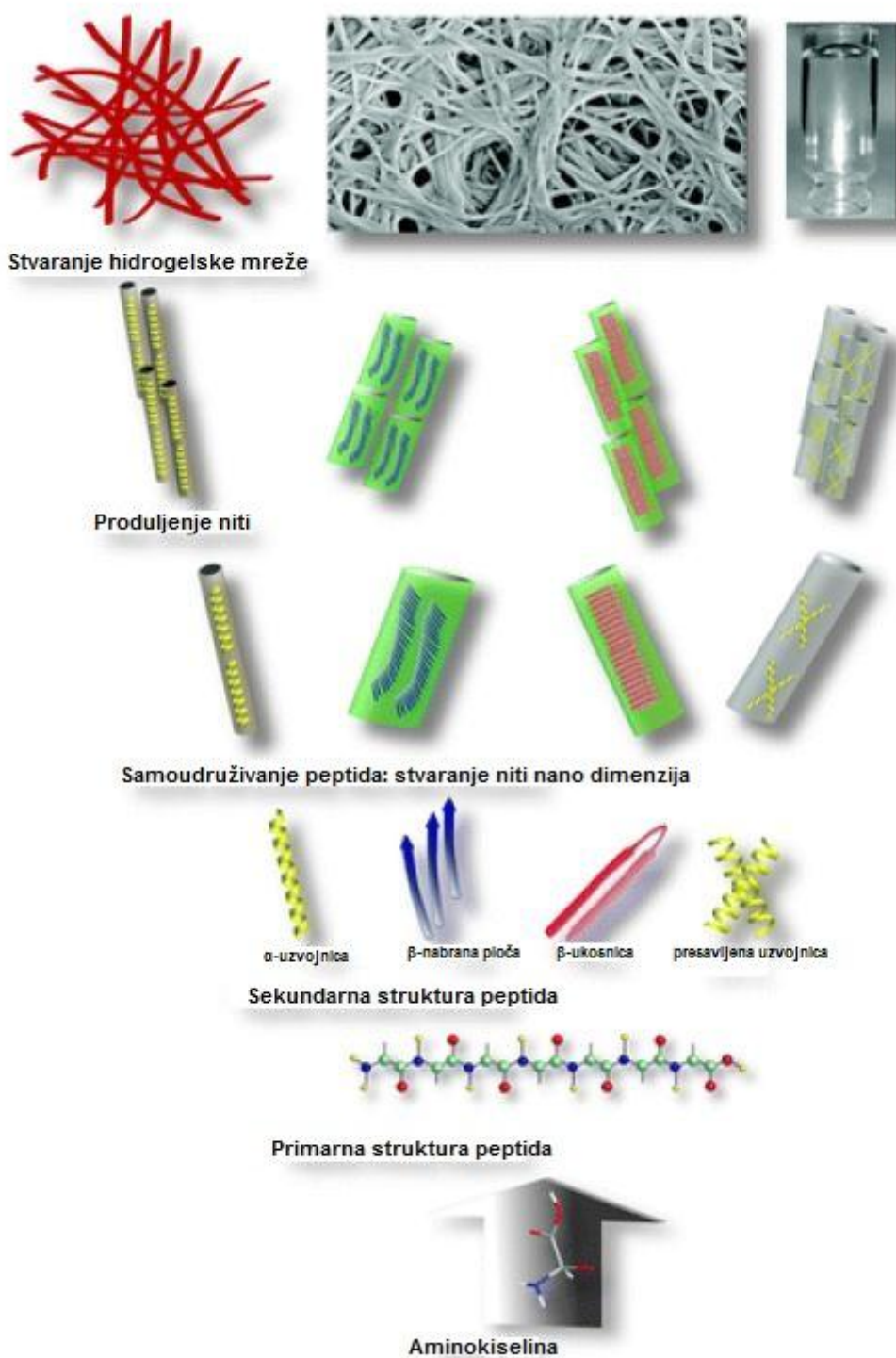
S obzirom da su supramolekularni gelovi „meki“ materijali (*eng.* soft materials), mogu se istražiti na makroskopskoj razini koristeći reološke metode kojima se analizira utjecaj dovedenog napreznja na gel. Morfologija gelova (izgled i struktura gelskih niti) određuje se mikroskopskim tehnikama kao što su TEM (transmisijska elektronska mikroskopija), SEM (pretražna elektronska mikroskopija) i AFM (mikroskopija atomskih sila). Ostalim komplementarnim tehnikama, kao što su difrakcijske tehnike može se ustanoviti način slaganja gelatora u gelovima. Navedene tehnike su nedestruktivne i mogu dati informacije o kemijskom sastavu i fizikalnim svojstvima materijala. Difrakcija rendgenskog zračenja praha (XRD) vizualizira organizaciju gelatora na molekularnoj razini i zahtjeva upotrebu osušenog uzorka gela (kserogel). Ostale difrakcijske tehnike kao što je metoda raspršenja X-zraka pod malim kutom (SAXS) i metoda raspršenja neutrona pod malim kutom (SANS) se mogu upotrebljavati na gelu pri čemu se dobiju informacije o promjeru gelskih niti i raspodjeli veličina niti. Detaljnije informacije o samoorganizaciji gelatora na molekularnoj razini uključujući prirodu intermolekularnih interakcija, vrijednosti kritičnih koncentracija te promjene u gibanju i konformaciji molekula u agregatima pruža nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Proces samoudruživanja gelatora može se pratiti koncentracijskim, temperaturnim i vremenski ovisnim eksperimentima uz korištenje različitih spektroskopskih

metoda kao što su NMR spektroskopija, FTIR spektroskopija te spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD). NMR i FTIR spektroskopijom se mogu pratiti određene interakcije između molekula u gelu, posebno vodikove veze i njihove promjene pod utjecajem temperature. Konformacijske odnosno kiralne strukture peptidnih agregata određuju se CD spektroskopijom.

2.7. Supramolekularni peptidni hidrogelovi

Među brojnim malim organskim gelatorima (*eng.* „Low Molecular Weight Gelators“) posebno se ističu kratki peptidi koji imaju mogućnost stvaranja gelova u vodi odnosno hidrogelova. Hidrogelovi su posebno zanimljivi zbog svoje biokompatibilnosti i biorazgradivosti.⁵⁷ Peptidi kao građevne jedinice kombiniraju aromatske, amidne i hidrofobne fragmente i samoorganiziraju se u specifične supramolekularne sustave. Samoudruživanje peptida u hidrogelove je hijerarhijski proces⁵⁸ i može se pojednostaviti kao što je prikazano na slikovitom prikazu na slici 17. U otopini primarna struktura peptida prelazi u sekundarnu strukturu (α -uzvojnica, β -nabrana ploča, β -ukosnica, presavijena uzvojnica) te pod utjecajem određenog stimulansa dolazi do samoudruživanja peptida sa sekundarnom strukturom u niti nanodimenzija koje se produljuju i stvaraju trodimenzionalnu mrežu koja imobilizira molekule vode i nastane hidrogel.

Premda su jednostavno funkcionalizirane aminokiseline i dipeptidi pokazali sposobnost geliranja vode odnosno stvaranja hidrogelova, uvođenje drugih funkcionalnih skupina kao što su aromatske skupine, polarno nabijene skupine, aktivna mjesta enzima ili ugradnja neprirodnih aminokiselina proširilo je potencijalnu primjenu ovakvih sustava u različitim područjima pripreme novih funkcionalnih materijala učinivši ih više osjetljivim na različite stimulanse.^{25, 59}



Slika 17. Shematski prikaz hijerarhijskog samoudruživanja peptida u hidrogel.^{58a}

2.8. Uloga dipeptida Phe-Phe u samoudruživanju kratkih peptida

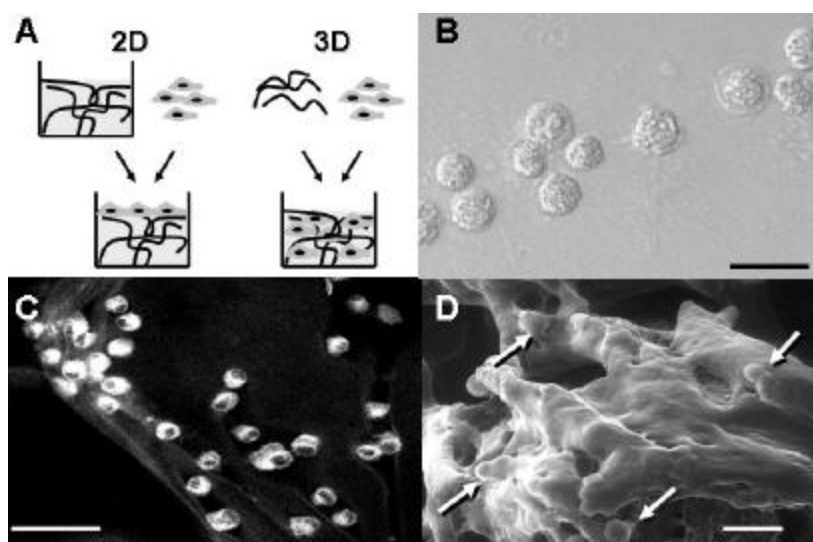
Difenilalaninski peptid (L-Phe-L-Phe) smatra se najmanjom građevnom jedinicom u procesu samoudruživanja peptida u različite strukture nano-dimenzija uključujući i proces samoudruživanja peptida A β u amiloidna vlakna.⁶⁰ Reches i Gazit su među prvima pokazali da se taj dipeptid kombinacijom vodikovih veza i aromatskih π - π interakcija u vodi samoorganizira u nanocijevi duljine do 100 nm⁴⁶. Različiti kratki peptidi koji u svojoj strukturi sadrže motiv Phe-Phe s različitim zaštitnim skupinama, samoudružuju se u različite strukture nano-dimenzija kao što su vezikule, trake, cijevi i vlakna (Slika 18.).⁶¹ Jedan od najpoznatijih takvih peptida je dipeptid koji na *N*-terminalnom kraju sadrži zaštitnu skupinu 9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc-Phe-Phe) koji se samoorganizira u hidrogel koji je izuzetno stabilan u različitim pH područjima uključujući i jako kisele uvjete.⁶² Li je sa suradnicima dokazao da dipeptid Phe-Phe može stvarati organogelove u kloroformu i aromatskim otapalima.⁶⁴ Nedavno je otkriveno da se čak i čista aminokiselina fenilalanin (L-Phe-OH) samoudružuje u niti slične amiloidnima koje onda tvore hidrogel pri točno određenoj pH vrijednosti pri čemu uz elektrostatske interakcije i vodikove veze, glavnu ulogu u procesu samoudruživanja u hidrogel imaju aromatske interakcije između fenilnih prstenova.⁶⁴ Navedeni primjeri upućuju na specifičnu ulogu aromatskih interakcija u procesu samoudruživanja kratkih peptida u nanostrukture visoke stabilnosti.



Slika 18. Različite strukture nano-dimenzija nastale samoorganizacijom kratkih peptida koji u svojoj strukturi sadrže Phe-Phe.⁶¹

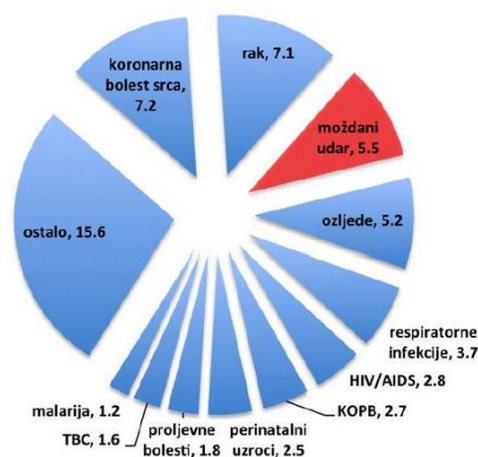
2.9. Primjena hidrogelova u tkivnom inženjerstvu

Supramolekularni hidrogelovi su vrlo prikladni za primjenu u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini s obzirom da je kod takvih sintetičkih biomaterijala prisutan minimalni rizik za prijenos bioloških patogena i onečišćenja u usporedbi sa prirodnim polimerima. Peptidni hidrogelovi se smatraju idealnim materijalima za stanično i tkivno inženjerstvo jer oponašaju izvanstanični matriks te posjeduju željena svojstva kao što su biokompatibilnost, biorazgradivost, hidrofilni karakter odnosno visoki udio vode i mogućnost proizvodnje u većim količinama. Dinamička nekovalentna hidrogelska mreža omogućuje biomaterijalu da se spontano prilagodi vanjskim uvjetima te pruži potporu stanicama te omogući izmjenu hranjivih tvari i kisika između stanica i medija.⁶⁵ Mali peptidni hidrogelatori koji se sastoje od dvije ili tri aminokiseline su pogodni za primjenu u biomedicini jer ih je jednostavno sintetizirati te su dostupni za proizvodnju u velikim količinama.⁶⁶ Proces samoudruživanja takvih peptida u hidrogelove najčešće je potaknut dodatkom staničnih suspenzija vodenoj otopini peptida pri čemu dolazi do rasta i umrežavanja gelskih niti te stvaranja trodimenzionalne mreže unutar koje stanice žive i diferenciraju se.⁶⁷ Ulijn je sa suradnicima prije deset godina pokazao da se određeni Fmoc zaštićeni dipeptidni hidrogelatori mogu primijeniti kao biomaterijali u 2D i 3D staničnoj kulturi (Slika 19).⁶⁸



Slika 19. Stanična kultura hrskavičnih stanica hondrocita na/u hidrogelu Fmoc zaštićenog dipeptida (Fmoc-Phe-Phe-OH) A) Prikaz pokusa 2D i 3D stanične kulture; B) stanice su zadržane na površini hidrogela (mjerna skala = 20 μm); C) Fluorescencijska mikroskopija prikazuje prisutnost stanica u hidrogelu (stanice su bojane 4',6-diamidin-2-fenilindolom, DAPI; mjerna skala = 50 μm) D) ESEM mikrofografija prikazuje hidrogelsku mrežu unutar koje su raspoređene stanice (prikazane strelicama), mjerna skala = 50 μm).⁶⁸

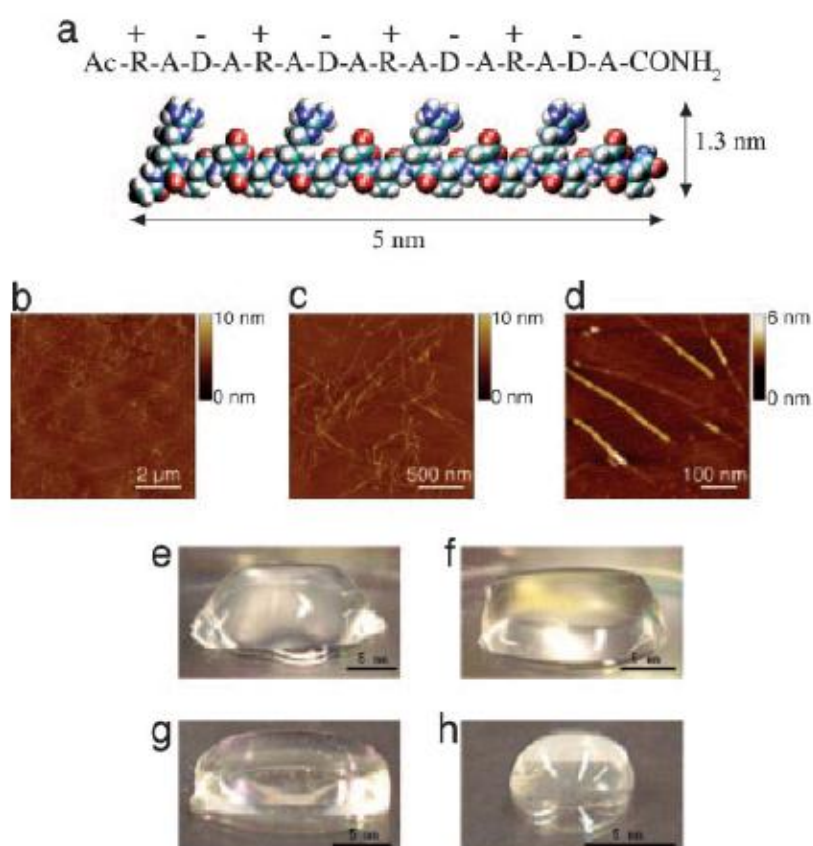
Moždani udar je danas jedan od najčešćih uzroka trajne invalidnosti kod ljudi u razvijenim zemljama te jedan od najučestalijih uzroka smrtnosti (Slika 20.) Definira se kao nagli gubitak funkcije dijela mozga zbog poremećaja dovoda krvi u mozak. Ovo najčešće nastupa zbog ishemije, prestanka dovoda krvi zbog začepljene krvne žile ili rjeđe zbog krvarenja u mozak odnosno hemoragije. S obzirom na značajno oštećenje moždanog tkiva i uništenje živčanih stanica kao posljedice moždanog udara, vrlo su aktualna istraživanja potencijala matičnih stanica zajedno s biomaterijalima u reparaciji i regeneraciji oštećenog tkiva. Matične stanice su nediferencirane stanice u našem tijelu koje se mogu specijalizirati u stanice pojedinih tkiva, ili se mogu dalje dijeliti i stvarati nove matične stanice. U odraslim jedinkama matične i progenitorne stanice služe za svakodnevnu regeneraciju tkiva koja se neprestano obnavljaju, kao što su koža, krv i probavni sustav. Kao jedna od najboljih terapijskih strategija u oporavku mozga nakon moždanog udara pokazala se upotreba živčanih matičnih stanica (*eng.* Neural Stem Cells, NSCs) zajedno s biomaterijalima koji služe kao medij za prijenos matičnih stanica u mozak. Istraživanja različitih biomaterijala su pokazala da upravo jedan od najvećih potencijala u liječenju oštećenog moždanog tkiva posjeduju peptidni hidrogelovi.



Slika 20. Dijagram učestalosti pojedinih uzroka smrtnosti u svijetu (u milijunima godišnje, Atlas of Heart Disease and Stroke, WHO, 2015).

Stupp i suradnici su među prvima objavili amfifilne peptide koji se miješanjem sa staničnim kulturama u prisutnosti kalcijevih iona samoudružuju u trodimenzionalnu mrežu niti nano dimenzija odnosno hidrogel u kojem se neuralne progenitorne stanice vrlo brzo diferenciraju u neurone.⁶⁹ Većina hidrogelova građenih od L-aminokiselina se pod utjecajem proteolitičkih enzima razgrađuju u organizmu i zbog toga je ograničena njihova dugoročna

upotreba u tkivnom inženjerstvu. Za potencijalni oporavak oštećenog moždanog tkiva bolje bi bilo koristiti peptidne biomaterijale temeljene na D-aminokiselinama koji se sporo razgrađuju i pri tome osiguravaju dugoročnu potporu okolnom tkivu mozga.⁷⁰ Neki peptidni hidrogelovi su odobreni i stavljeni na tržište kao biomaterijali za primjenu kod uzgajanja staničnih kultura. Jedan od takvih primjera je PuraMatrix™, sintetički resorbilan peptidni hidrogel koji je građen od ponavljajućeg aminokiselinskog slijeda - RADA (Arginin-Alanin-Asparaginska kiselina-Alanin). Podešavanjem koncentracije peptida u vodi moguće je kontrolirati gustoću i poroznost (veličinu pora) trodimenzionalne hidrogelske mreže. Prvi peptid koji je sadržavao spomenuti aminokiselinski slijed opisao je Zhang sa suradnicima (Ac-(RADA)₄-NH₂).⁷¹ Ac-(RADA)₄-NH₂ (RADA-16-I) je topljiv pri nižim vrijednostima pH i osmolarnosti, ali se samoudružuje u niti pri fiziološkim uvjetima (Slika 21.). Visoki udio vode (99%) i sposobnost mijenjanja i prilagođavanja peptidnog lanca omogućili su uspješnu primjenu u uzgoju živčanih stanica i osteocita te mnogih drugih. Zbog mnogih prednosti kao što je jednostavnost sinteze i mogućnost dugoročnog uzgoja staničnih kultura, PuraMatrix™ bi mogao zamijeniti trenutno najviše upotrebljavan biomaterijal u mnogim područjima primjene – Matrigel™.



Slika 21. Peptid RADA-16-I; a) aminokiselinski slijed i molekularni model peptida; b)-d) AFM mikrofotografije hidrogela RADA-16-I, 8 x 8 μm (b), 2x2 μm (c) i 0,5 x 0,5 μm (d), kod mikrofotografije(d) je vidljiva drukčija visina vlakna što upućuje na strukturu dvosloja; e)-h) fotografije hidrogela pri različitim uvjetima: 0,5 wt% (pH 7.5) (e), 0,1 wt% (pH 7,5; Tris·HCl) (f), 0,1 wt% (pH 7,5; PBS) (g) prije djelovanja ultrazvuka i ponovno samoorganizirani hidrogel nakon djelovanja ultrazvuka (h).⁷¹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uvodne napomene

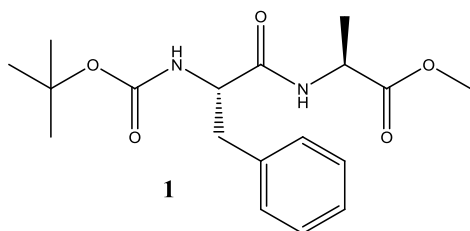
Točke tališta određene su na Koflerovom mikroskopu i nisu korigirane. ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance DPX 300 i 600 (300/75 Hz i 600/150 MHz) spektrometru. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm u odnosu na DMSO- d_6 ili na TMS kao unutrašnji standard, a konstante sprege (J) u Hercima (Hz). Dvodimenzijanski COSY (engl. Correlation Spectroscopy) te NOESY (engl. Nuclear Overhauser Effect) spektri snimljeni su uz upotrebu standardnog programskog paketa Varian Gemini. FTIR spektri snimljeni su na Bruker Equinox 55 i Bomem MB 102 spektrometrima. Optička rotacija mjerena je na polarimetru AA-10 na valnoj duljini od 589,3 nm. Tankoslojna kromatografija rađena je na pločicama silikagela Merck 60 F₂₅₄, a vizualizacija je omogućena upotrebom UV lampe (254 nm) ili parama joda. Otapala su pročišćena metodama opisanim u literaturi te su pohranjena na molekulskim sitima. UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 100 Bio spektrofotometru. Fluorescencijski spektri snimljeni su na Varian Cary Eclipse i Agilent Technologies CaryEclipse Fluorescence spektrofotometru. CD spektri snimljeni su na JASCO J815 spektrofotometru. Morfologija gelskih niti određena je transmisijском elektrоnskom mikroskopijom (TEM, Zeiss EM 10A, napon ubrzanja 60 kV i HRTEM JEOL 2100, napon ubrzanja 200 kV). Uzorci gela za potrebe snimanja TEM mikroskopijom kontrastirani su s 2 % vodenom otopinom kalijeve soli fosfovolframske kiseline (H₃PW₁₂O₄₀, pWk) ili su sijenčani paladijem odnosno platinom. Uzorci hidrogela obojanog amiloidnim bojama (kongo-crvenilo i tioflavin T) te uzorci hidrogela sa stanicama HEK293T promatrani su i snimljeni na konfokalnom mikroskopu Leica SP8 X FLIM (objektiv: NA 1.4, uljna imerzija; 60x) pomoću fluorescencije i u reflektiranom svjetlu. Osnovna reološka mjerenja viskoelastičnosti hidrogela provedena su na Anton Paar reometru (MCR 301). Spektri masa visoke rezolucije sintetiziranih spojeva snimljeni su tandemskim uređajem MALDI-TOF/TOF (matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja-analizator masa s vremenom leta) 4800 Plus MALDI TOF/TOF (AppliedBiosystems Inc., Foster City, CA, USA) opremljenim Nd:YAG laserom koji generira laserski puls zračenja valne duljine 355

nm s učestalošću od 200 Hz u pozitivnom modu. Snimanje je izvršeno uz 1600 laserskih pulseva po spektru, raspon m/z 100-1000 Da, fokus masa 500 Da i vrijeme zadržavanja 500 ns. Točnost određivanja masa od 5 ppm dobivena je internom kalibracijom. Minimizirane strukture dimera tripeptida dobivene su pomoću programskog paketa SYBYL-X 1,2 (Tripos Inc., St. Louis, Missouri, 63144, USA).

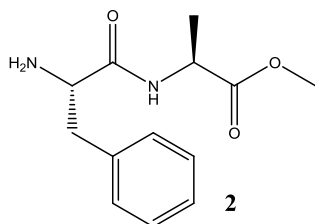
3.2. Priprava tripeptidnih derivata

3.2.1. Priprava acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA

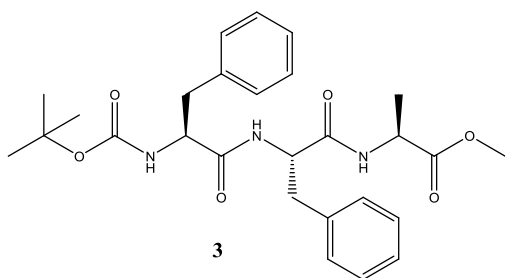
3.2.1.1. Boc-Phe-Ala-OMe (1)



U ohlađenu otopinu (-10 °C, ledena kupelj) Boc-Phe-OH (2,65 g, 10 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (20 mL) dodani su Ala-OMe·HCl (1,39 g, 10 mmol), Et₃N (1,40 mL, 1,01 g, 10 mmol), DCC (N,N'-dicikloheksilkarbodiimid) (2,06 g, 10 mmol) i katalitička količina katalizatora 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Reakcijska smjesa se miješa 30 minuta na 0 °C, a zatim na sobnoj temperaturi preko noći. Talog nusprodukta N,N'-dicikloheksiluree (DCHU) se odsiše pod sniženim tlakom, a filtrat se pere vodom, 10 % KHSO₄, 10 % NaHCO₃ te ponovno vodom. Organski dio se suši nad Na₂SO₄, a zatim se ostavi 2 h na temperaturi -18 °C pri čemu dolazi do taloženja preostalih tragova DCHU koji se uklone filtracijom. Otapalo se otpari do pola volumena te se nadsloji petroleterom pri čemu dolazi do taloženja produkta. Dobiveno je 3,10 g (89%) bijelog kristaliničnog produkta Boc-Phe-Ala-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,32-7,19 (m, 5H, Ph), 6,41 (d, 1H, *J* = 6,9, NHC*H), 4,98 (bs, 1H, NHC*H), 4,52 (dt, 1H, *J* = 7,2, 14,0, C*H_{Phe}), 4,35 (q, 1H, *J* = 6,9, C*H_{Ala}), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,13-3,01 (m, 2H, CH₂Ph), 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,35 (d, 3H, *J* = 7,0, CH_{3Ala}).

3.2.1.2. Phe-Ala-OMe (2)

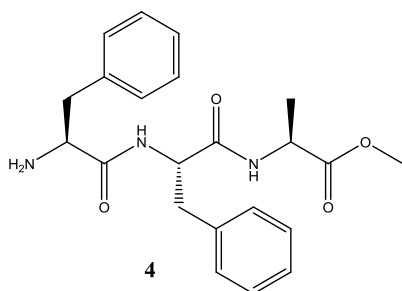
U ohlađenu otopinu (-10 °C, ledena kupelj) spoja **1** (2,33 g, 6.64 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (10 mL) dodana je TFA (6.64 mL) te se reakcijska smjesa miješa 30 minuta na 0 °C, a zatim na sobnoj temperaturi preko noći. Otapalo i ostaci TFA otpare se pod sniženim tlakom. Tako dobiveni produkt (žuto ulje) otopi se u CH₂Cl₂ te se otopina neutralizira sa 10 % KHCO₃ u ledenoj kupelji. Vodeni sloj se ekstrahira sa CH₂Cl₂, a spojeni organski slojevi se peru vodom i suše nad Na₂SO₄ te se zatim otapalo otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je 1,26 g (86%) žutog uljastog produkta Phe-Ala-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,77 (d, 1H, *J* = 7,1, NHC*H), 7,34-7,21 (m, 5H, Ph), 4,60 (q, 1H, *J* = 7,3, C*H_{Ala}), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,64 (dd, 1H, *J* = 4,0, 9,2, C*H_{Phe}), 3,25 (dd, 1H, *J* = 3,9, 13,7, CH₂Ph), 2,73 (dd, 1H, *J* = 9,3, 13,7, CH₂Ph), 1,44 (s, 2H, NH₂), 1,39 (d, 3H, *J* = 7,1, CH_{3Ala}).

3.2.1.3. Boc-Phe-Phe-Ala-OMe (3)

U otopinu Boc-Phe-OSu (1 g, 2,76 mmol) u smjesi suhog dioksana i CH₂Cl₂ (35 mL) dodan je **2** (0,69 g, 2,76 mmol) te se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Otapala se otpare pod sniženim tlakom te se doda voda (25 mL) i etil-acetat (25 mL). Slojevi su odijeljeni, vodeni sloj se pere s dodatnih 25 ml etil-acetata. Spojeni organski dijelovi se peru s vodom i suše nad Na₂SO₄ te se zatim otapalo otpari pod sniženim tlakom. Dobiveni bijeli talog se kromatografski pročisti na tankom sloju silikagela (sustav CH₂Cl₂ : MeOH = 50:1). Dobiveno je 0,85 g (62%) bijelog kristaliničnog produkta Boc-Phe-Phe-Ala-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,31-7,07 (m, 10H, 2 x Ph), 6,35 (bs, 2H, 2 x NHC*H),

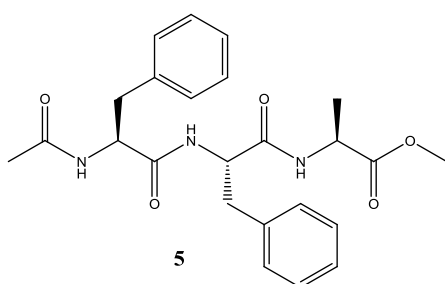
4,79 (bs, 1H, NHC*H), 4,61 (dd, 1H, $J = 7,1, 13,8$, C*H_{Phe}), 4,45 (q, 1H, $J = 7,2$, C*H_{Phe}), 4,30 (d, 1H, $J = 6,3$, C*H_{Ala}), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,16-2,89 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,34 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,31 (d, 3H, $J = 7,1$, CH_{3Ala}).

3.2.1.4 Phe-Phe-Ala-OMe (4)



U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **2**, reakcijom spoja **3** (0,79 g, 1,59 mmol) sa TFA (1,59 mL) u suhom CH₂Cl₂ (15 mL) dobiveno je 0,63 g (92%) žutog uljastog produkta Phe-Phe-Ala-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,48 (d, 1H, $J = 7,1$, NHC*H), 8,01 (d, 1H, $J = 8,5$, NHC*H), 7,27-7,13 (m, 10H, 2 x Ph), 4,61 (dd, 1H, $J = 8,4, 13,2$, C*H_{Phe}), 4,29 (q, 1H, $J = 7,2$, C*H_{Ala}), 3,64 (s, 3H, OCH₃), 3,02-2,77 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,63 (bs, 2H, NH₂), 1,29 (d, 3H, $J = 7,1$, CH_{3Ala}).

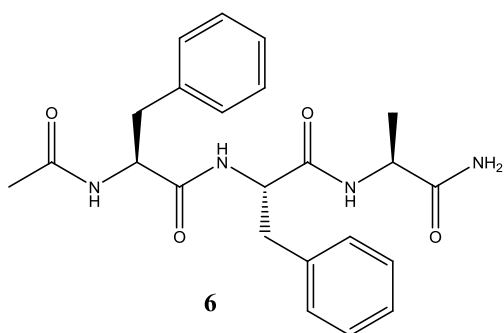
3.2.1.5. Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (5)



U ohlađenu otopinu (-10 °C, ledena kupelj) spoja **4** (0,58 g, 1,45 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (10 mL) doda se Et₃N (0,20 mL, 1,45 mmol) te se dokapava acetil-klorid (0,10 mL, 1,45 mmol). Reakcijska smjesa se miješa 1 h na 0 °C, a zatim na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon hlađenja na ledenoj kupelji, reakcijska smjesa se pere vodom, 5 % NaHCO₃, 1M HCl i ponovno vodom. Organski dio se suši nad Na₂SO₄ te se zatim otapalo otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je 0,58 g (92%) bijelog praškastog produkta Ac-Phe-Phe-Ala-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,34 (d, 1H, $J = 7,0$, NHC*H), 7,99-7,95 (m, 2H, 2 x

NHC*H), 7,27-7,14 (m, 10H, 2 x Ph), 4,54 (dt, 1H, $J = 4,7, 8,9$, C*H_{Phe}), 4,47-4,41(m, 1H, C*H_{Phe}), 4,29 (dt, 1H, $J = 7,2$, C*H_{Ala}), 3,62 (s, 3H, OCH₃), 3,05 (dd, 1H, $J = 4,6, 14,0$, 2 x CH₂Ph), 2,92 (dd, 1H, $J = 4,5, 13,9$, 2 x CH₂Ph), 2,81 (dd, 1H, $J = 9,3, 14,0$, 2 x CH₂Ph), 2,65 (dd, 1H, $J = 10,0, 13,9$, 2 x CH₂Ph), 1,72 (s, 3H, COCH₃), 1,29 (d, 3H, $J = 7,1$, CH₃); ¹³C-NMR (75,5 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C /ppm: 172,78, 171,13, 170,76, 169,07 (4 x CONH), 137,95, 137,56, 129,22, 129,03, 127,98, 127,93, 126,23, 126,11 (2 x Ph), 53,80, 53,41 (2 x C*H_{Phe}), 51,83 (OCH₃), 47,59 (C*H_{Ala}), 37,42, 37,28 (2 x CH₂Ph), 22,38 (COCH₃), 16,86 (CH_{3Ala}); FTIR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3278 (NH), 1740 (COOMe), 1638 (amid I), 1537 (amid II); t.t. = 214-216 °C; $[\alpha]_D^{RT} = +29^\circ$ (c = 0,02 M u MeOH), HRMS: m/z [M+Na]⁺ za C₂₄H₂₉N₃O₅, izračunato 462,2005, pronađeno: 462,1999.

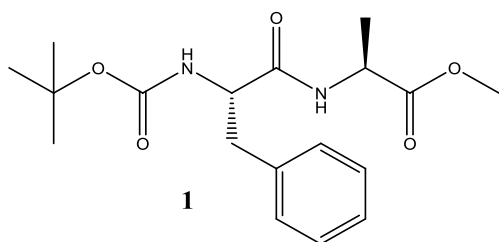
3.2.1.6. Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (6)



Spoj **5** (0,57 g, 1,30 mmol) se otopi u zasićenoj otopini amonijaka u metanolu (50 mL). Nakon 7 dana na 4 °C dolazi do taloženja produkta iz otopine. Talog se odsiše, dobro ispere metanolom te se suši pod sniženim tlakom. Dobiveno je 0,54 g (98%) bijelog kristaliničnog produkta Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H /ppm: 8,08 (d, 1H, $J = 8,0$, NHC*H), 8,00 (d, 1H, $J = 8,0$, NHC*H), 7,93 (d, 1H, $J = 7,5$, NHC*H), 7,29-7,10 (m, 11H, 2 x Ph + NH(NH₂)), 6,99 (bs, 1H, NH(NH₂)), 4,56-4,39 (m, 2H, 2 x C*H_{Phe}), 4,19 (p, 1H, $J = 7,1$, C*H_{Ala}), 3,11-2,60 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,72 (s, 3H, COCH₃), 1,21 (d, 3H, $J = 7,1$, CH_{3Ala}); ¹³C-NMR (75,5 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C /ppm: 173,87, 171,30, 170,28, 169,08 (4 x CONH), 137,94, 137,66, 129,20, 129,04, 128,01, 127,93, 126,22, 126,12 (2 x Ph), 53,84, 53,83 (2 x C*H_{Phe}), 48,00 (C*H_{Ala}), 37,25, 37,18 (2 x CH₂Ph), 22,37 (COCH₃), 18,31 (CH_{3Ala}); FTIR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3277 (NH), 1679 (CONH₂), 1626 (amid I), 1544 (amid II); t.t. = 243-245 °C; $[\alpha]_D^{RT} = -18^\circ$ (c = 0,02 M u EtOH); elementna analiza za C₂₃H₂₈N₄O₄ (Mr = 424,49) izračunato (%): C 65,08 H 6,65 N 13,2, pronađeno: C 65,09 H 6,48 N 13,0.

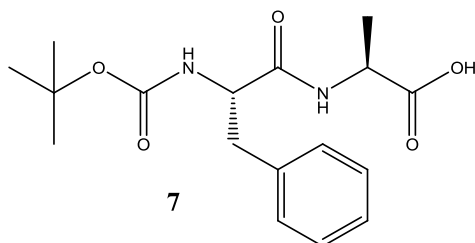
3.2.2. Priprava acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FAF

3.2.2.1. Boc-Phe-Ala-OMe (1)

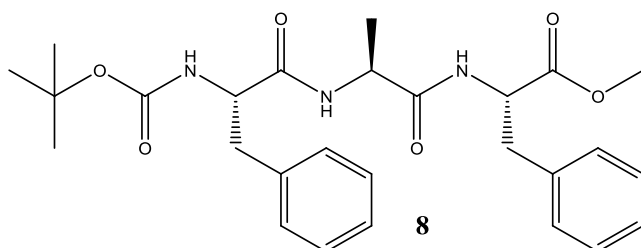


U otopinu Boc-Phe-OSu (2.37 g, 6.53 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (20 mL) dodan je Ala-OMe·HCl (0.91 g, 6.53 mmol) i Et₃N (0.91 mL, 6.53 mmol) te se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Zatim se pere vodom te se organski dio suši nad Na₂SO₄, a otapalo se otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je 1.76 g (77%) bijelog kristaliničnog produkta Boc-Phe-Ala-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,33-7,17 (m, 5H, Ph), 6,48 (d, 1H, *J* = 7,0, NHC*H), 5,2 (bs, 1H, NHC*H), 4,59-4,36 (m, 1H, C*H_{Phe}), 4,36 (q, 1H, *J* = 6,9, C*H_{Ala}), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,07 (d, 2H, *J* = 6,7, CH₂Ph), 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,35 (d, 3H, *J* = 7,1, CH₃Ala),

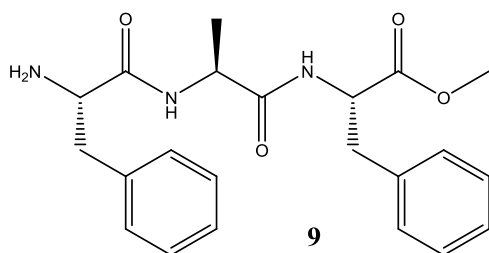
3.2.2.2. Boc-Phe-Ala-OH (7)



U otopinu spoja **1** (1,76 g, 5,01 mmol) u CH₃OH (10 ml) doda se 1M LiOH (7,52 mL, 7,52 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Potom se otpari otapalo i doda voda te se na ledenoj kupelji zakiseli s 10% KHSO₄ do pH=2 pri čemu dolazi do taloženja produkta. Talog se odsiše, dobro ispere vodom te se suši pod sniženim tlakom. Dobiveno je 1,56 g (93%) bijelog kristaliničnog produkta Boc-Phe-Ala-OH; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,32-7,15 (m, 5H, Ph), 6,79 (d, 1H, *J* = 7,0, NHC*H), 6,57 (bs, 1H, COOH), 5,27 (bs, 1H, NHC*H), 4,54-4,45 (m, 2H, C*H_{Phe} + C*H_{Ala}), 3,03 (d, 2H, *J* = 6,9, CH₂Ph), 1,44-1,31 (m, 12H, CH₃Ala + C(CH₃)₃).

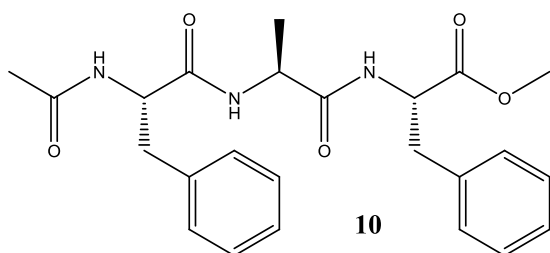
3.2.2.3. Boc-Phe-Ala-Phe-OMe (8)

U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **1** reakcijom spoja **7** (1,28 g, 3,82 mmol) i Phe-OMe-HCl (0,82 g, 3,82 mmol) u ledenoj kupelji u suhom CH_2Cl_2 (50 mL) uz Et_3N (0,53 mL, 3,82 mmol), DCC (0,79 g, 3,82 mmol) i katalitičku količinu DMAP-a dobiveno je 1,38 g (73%) bijelog kristaliničnog produkta Boc-Phe-Ala-Phe-OMe; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} /ppm: 7,34-7,02 (m, 10H, 2 x Ph), 6,38 (bs, 2H, 2 x NHC^*H), 4,81 (bs, 1H, NHC^*H), 4,62 (dd, 1H, $J = 7,0, 13,8$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,45 (q, 1H, $J = 7,2$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,30 (q, 1H, $J = 6,8$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,70 (s, 3H, OCH_3), 3,23-2,87 (m, 4H, 2 x CH_2Ph), 1,34 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,32 (d, 3H, $J = 7,2$, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

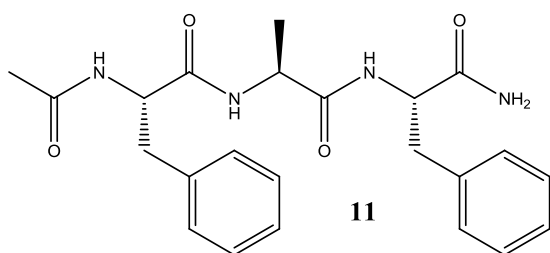
3.2.2.4. Phe-Ala-Phe-OMe (9)

U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **2**, reakcijom spoja **8** (1,38 g, 2,77 mmol) sa TFA (2,77 mL) u suhom CH_2Cl_2 (9 mL) dobiveno je 1,07 g (98%) žutog uljastog produkta Phe-Ala-Phe-OMe; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{H} /ppm: 8,52 (d, 1H, $J = 7,1$, NHC^*H), 8,03 (d, 1H, $J = 7,3$, NHC^*H), 7,32-7,07 (m, 10H, 2 x Ph), 4,61 (q, 1H, $J = 4,9$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,29 (q, 1H, $J = 7,1$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,63 (s, 3H, OCH_3), 2,99 (dd, 2H, $J = 4,8, 13,8$, CH_2Ph), 2,89-2,73 (m, 2H, CH_2Ph), 1,66 (bs, 2H, NH_2), 1,29 (d, 3H, $J = 7,2$, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$).

3.2.2.5. Ac-Phe-Ala-Phe-OMe (10)



U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **5**, reakcijom spoja **9** (1,07 g, 2,48 mmol) i acetil-klorida (0,176 mL, 0,19 g, 2,48 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (10 mL) uz Et₃N (0,347 mL, 2,48 mmol) dobiveno je 1,02 g (93%) bijelog kristaliničnog produkta Ac-Phe-Ala-Phe-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,22 (d, 1H, *J* = 7,5, NHC*H), 8,02 (q, 2H, *J* = 7,9, 2 x NHC*H), 7,32-7,11 (m, 10H, 2 x Ph), 4,55-4,42 (m, 2H, 2 x C*H_{Phe}), 4,36-4,22 (m, 1H, C*H_{Ala}), 3,58 (s, 3H, OCH₃), 3,07-2,89 (m, 3H, CH₂Ph), 2,75-2,61 (m, 1H, CH₂Ph), 1,73 (s, 3H, COCH₃), 1,19 (d, 3H, *J* = 7,1, CH_{3Ala}).

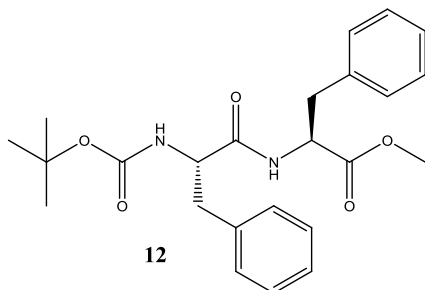
3.2.2.6. Ac-Phe-Ala-Phe-NH₂ (11)

U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **6** iz spoja **11** (1 g, 2,27 mmol) u metanolnom amonijaku (100 mL) dobiveno je 0,95 g (98%) bijelog kristaliničnog produkta Ac-Phe-Ala-Phe-NH₂; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,14 (d, 1H, *J* = 7,00, NHC*H), 8,07 (d, 1H, *J* = 8,3, NHC*H), 7,75 (d, 1H, *J* = 8,2, NHC*H), 7,33 (s, 1H, NH(NH₂)), 7,27-7,15 (m, 10H, 2 x Ph), 7,08 (s, 1H, NH(NH₂)), 4,47 (td, 1H, *J* = 4,0, 10,4, C*H_{Phe}), 4,40 (td, 1H, *J* = 5,2, 8,4, C*H_{Phe}), 4,20 (q, 1H, *J* = 7,1, C*H_{Ala}), 3,03-2,94 (m, 2H, CH₂Ph), 2,84 (dd, 1H, *J* = 8,3, 13,8, CH₂Ph), 2,68 (dd, 1H, *J* = 10,4, 13,90, CH₂Ph), 1,74 (s, 3H, COCH₃), 1,16 (d, 3H, *J* = 7,1, CH_{3Ala}); ¹³C-NMR (75,5 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C/ppm: 173,07, 172,20, 171,84, 169,71 (4 x CONH), 138,54, 138,21, 129,66, 129,57, 128,48, 126,68 (2 x Ph), 54,32 (C*H_{Phe}), 54,03 (C*H_{Phe}), 48,99 (C*H_{Ala}), 37,87 (2 x CH₂Ph), 22,89

(COCH₃), 18,37 (CH_{3Ala}); t.t. = 251-253 °C; $[\alpha]_{D}^{RT} = -20^{\circ}$ (c = 0,02 M u EtOH); elementna analiza za C₂₃H₂₈N₄O₄ (Mr = 424,49) izračunato (%): C 65,08 H 6,65 N 13,2, pronađeno: C 65,10 H 6,52 N 13,1.

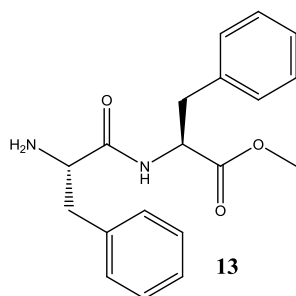
3.2.3. Priprava acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom AFF

3.2.3.1. Boc-Phe-Phe-OMe (12)

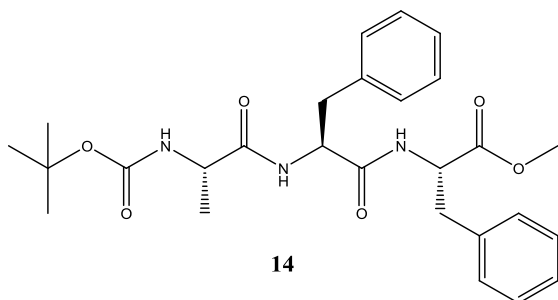


U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **1** reakcijom Boc-Phe-OH (2,65 g, 10 mmol) i Phe-OMe-HCl (2,16 g, 10 mmol) u ledenoj kupelji u suhom CH₂Cl₂ (45 mL) uz Et₃N (1,40 mL, 10 mmol), DCC (2,06 g, 10 mmol) i katalitičku količinu DMAP-a dobiveno je 3,73 g (88%) bijelog kristaliničnog produkta Boc-Phe-Phe-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,32-7,15 (m, 8H, Ph), 7,01-6,95 (m, 2H, Ph), 6,29 (d, 1H, *J* = 7,3, NHC*H), 4,93 (bs, 1H, NHC*H), 4,78 (dd, *J* = 7,0, 14,3, C*H_{Phe}), 4,33 (q, 1H, *J* = 6,8, C*H_{Phe}), 3,66 (s, 3H, OCH₃), 3,11-2,97 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,40 (s, 9H, C(CH₃)₃).

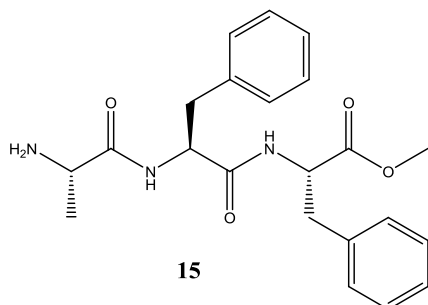
3.2.3.2. Phe-Phe-OMe (13)



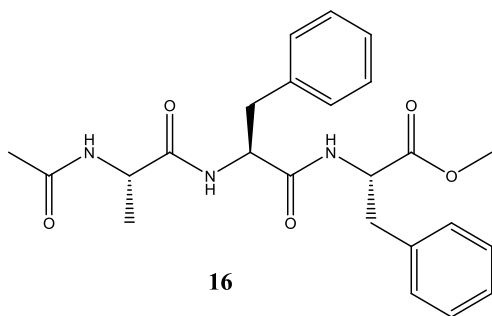
U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **2**, reakcijom spoja **12** (1,02 g, 2,39 mmol) sa TFA (2,4 mL) u suhom CH₂Cl₂ (10 mL) dobiveno je 0,74 g (95%) žutog uljastog produkta Phe-Phe-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,73 (d, 1H, *J* = 8,0, NHC*H), 7,34-7,17 (m, 8H, Ph), 7,07-7,01 (m, 2H, Ph), 4,89 (dt, 1H, *J* = 6,2, 8,1, C*H_{Phe}), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,59 (dd, *J* = 4,00, 9,20, C*H_{Phe}), 3,17-3,05 (m, 3H, CH₂Ph), 2,59 (dd, 1H, *J* = 9,1, 13,8, CH₂Ph), 1,26 (bs, 2H, NH₂).

3.2.3.3. *Boc-Ala-Phe-Phe-OMe* (**14**)

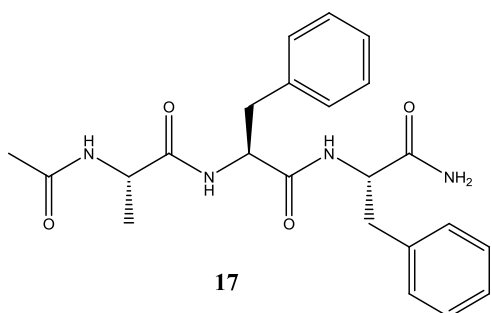
U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **1** reakcijom spoja **13** (0,7 g, 2,18 mmol) i Boc-Ala-OH (0,41 g, 2,18 mmol) u ledenoj kupelji u suhom CH₂Cl₂ (30 mL) uz DCC (0,45 g, 2,18 mmol) i katalitičku količinu DMAP-a dobiveno je 0,99 g (91%) bijelog kristaliničnog produkta Boc-Ala-Phe-Phe-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 8,22 (d, 1H, *J* = 6,7, NHC*H), 7,30-7,15 (m, 8H, Ph), 7,02-6,95 (m, 2H, Ph), 6,60 (d, 1H, *J* = 7,8, NHC*H), 6,49 (d, 1H, *J* = 6,8, NHC*H), 4,74 (q, 1H, *J* = 7,4, C*H_{Phe}), 4,61 (q, 1H, *J* = 7,2, C*H_{Phe}), 4,17-4,01 (m, 1H, C*H_{Ala}), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 3,16-2,90 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,26 (d, 3H, *J* = 7,1, CH₃_{Ala}).

3.2.3.4. *Ala-Phe-Phe-OMe* (**15**)

U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **2**, reakcijom spoja **14** (0,99 g, 1,99 mmol) sa TFA (2 mL) u suhom CH₂Cl₂ (5 mL) dobiveno je 0,79 g (90 %) žutog uljastog produkta Ala-Phe-Phe-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,64 (d, 1H, *J* = 7,2, NHC*H), 7,35-7,13 (m, 8H, Ph), 7,06- 6,94 (m, 2H, Ph), 6,50 (d, 1H, *J* = 8,1, NHC*H), 4,79 (q, 1H, *J* = 7,3, C*H_{Phe}), 4,60 (q, 1H, *J* = 7,8, C*H_{Phe}), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 3,37 (q, 1H, *J* = 7,1, C*H_{Ala}), 3,17- 2,92 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,46 (s, 2H, NH₂), 1,16 (d, 3H, *J* = 7,0, CH₃_{Ala}).

3.2.3.5. *Ac-Ala-Phe-Phe-OMe* (16)

U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **5**, reakcijom spoja **15** (0,7 g, 1,75 mmol) i acetil-klorida (0,124 mL, 0,14 g, 1,75 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (10 mL) uz Et₃N (0,245 mL, 1,75 mmol) dobiveno je 0,69 g (90%) bijelog kristaliničnog produkta *Ac-Ala-Phe-Phe-OMe*; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,29- 7,13 (m, 8H, Ph), 7,03-6,96 (m, 2H, Ph), 6,82 (d, 1H, *J* = 7,9, NHC*H), 6,56 (d, 1H, *J* = 7,7, NHC*H), 6,16 (d, 1H, *J* = 7,4, NHC*H), 4,82-4,67 (m, 2H, 2 x C*H_{Phe}), 4,45 (q, 1H, *J* = 7,8, C*H_{Ala}), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 3,14- 2,94 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,92 (s, 3H, COCH₃), 1,26 (d, 3H, *J* = 7,1, CH_{3Ala}).

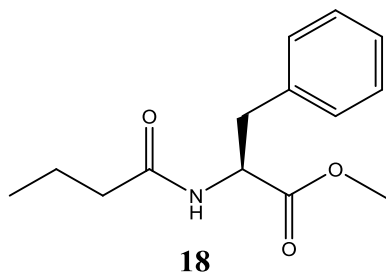
3.2.3.6. *Ac-Ala-Phe-Phe-NH₂* (17)

U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **6** iz spoja **16** (0,65 g, 1,47 mmol) u metanolnom amonijaku (60 mL) dobiveno je 0,61 g (97%) bijelog kristaliničnog produkta *Ac-Ala-Phe-Phe-NH₂*; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,01-7,84 (m, 3H, 3 x NHC*H), 7,30-7,11 (m, 11H, 2 x Ph + NH(NH₂)), 7,07 (s, 1H, NH(NH₂)), 4,46-4,35 (m, 2H, 2 x C*H_{Phe}), 4,18 (q, 1H, *J* = 7,1, C*H_{Ala}), 3,07-2,70 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,80 (s, 3H, COCH₃), 1,08 (d, 3H, *J* = 7,10, CH_{3Ala}); ¹³C-NMR (75,5 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C/ppm: 173,05, 172,74, 170,99, 169,66 (4 x CONH), 138,26, 138,11, 129,62, 128,53, 128,46, 126,70 (2 x Ph), 54,39 (C*H_{Phe}), 54,22 (C*H_{Phe}), 48,67 (C*H_{Ala}), 37,96, 37,55 (2 x CH₂Ph), 22,92 (COCH₃), 18,28 (CH_{3Ala}), t.t. = 264-266 °C; [α]_D^{RT} = -21° (c = 0,02 M u EtOH); elementna analiza za

$C_{23}H_{28}N_4O_4$ ($M_r = 424,49$) izračunato (%): C 65,08 H 6,65 N 13,2, pronađeno: C 65,12 H 6,55 N 13,1.

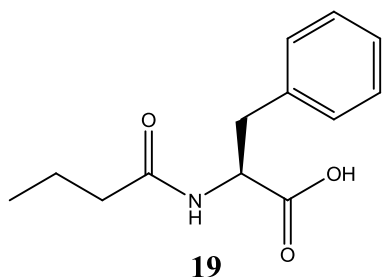
3.2.4. Priprava butirilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA

3.2.4.1. $CH_3(CH_2)_2CO-Phe-OMe$ (**18**)



U ohlađenu suspenziju (-10 °C, ledena kupelj) Phe-OMe·HCl (1 g, 4,64 mmol) u suhom CH_2Cl_2 te u atmosferi argona dodani su Et_3N (1,29 mL, 0,94 g, 9,28 mmol) i butiril-klorid (0,48 mL, 4,64 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na ledenoj kupelji dva sata, a zatim preko noći na sobnoj temperaturi. Potom se pere vodom, 1 M HCl, 10% $NaHCO_3$ te opet vodom. Organski dio se suši nad Na_2SO_4 te se otapalo otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je 1,02 g (89%) žutog uljastog produkta $CH_3(CH_2)_2CO-Phe-OMe$; ^1H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H/ppm : 7,31-7,22 (m, 3H, Ph), 7,10 (dd, 2H, $J = 1,6, 7,7$, Ph), 6,06 (d, 1H, $J = 7,6$, NHC^*H), 4,90 (dt, 1H, $J = 6,0, 7,6$, C^*H_{Phe}), 3,71 (s, 3H, OCH_3), 3,18-3,03 (m, 2H, CH_2Ph), 2,16 (dd, 2H, $J = 7,5, 14,6$, $COCH_2$), 1,68-1,55 (m, 2H, CH_2), 0,90 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH_3).

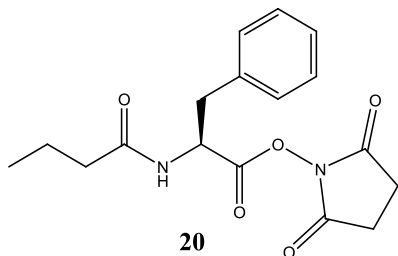
3.2.4.2. $CH_3(CH_2)_2CO-Phe-OH$ (**19**)



U otopinu spoja **18** (1,02 g, 4,1 mmol) u CH_3OH (10 ml) doda se 1M LiOH (6,14 mL, 6,14 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Potom se otapalo otpari pod sniženim tlakom, doda se CH_2Cl_2 te se otopina na ledenoj kupelji zakiseli s 1M HCl do pH=2. Organski sloj se odijeli i pere vodom, osuši nad Na_2SO_4 i otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je 0,80 g (83%) žutog uljastog produkta $CH_3(CH_2)_2CO-Phe-OH$; ^1H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H/ppm : 8,61 (bs, 1H, OH), 7,39-7,10 (m, 5H, Ph), 6,05 (d, 1H, $J = 7,5$,

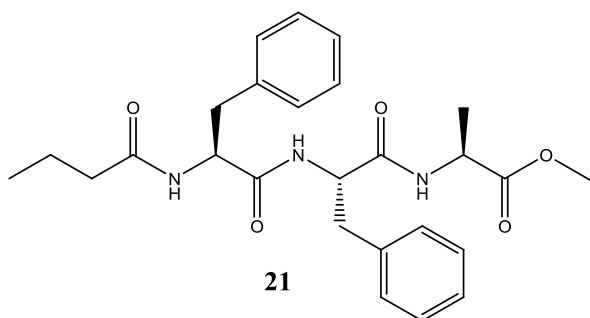
NHC*H), 4,89 (dd, 1H, $J = 6,0, 13,4$, C*H_{Phe}), 3,28-3,09 (m, 2H, CH₂Ph), 2,23-2,10 (m, 2H, COCH₂), 1,68- 1,52 (m, 2H, CH₂), 0,89 (t, 3H, $J = 7,4$, CH₃).

3.2.4.3. CH₃(CH₂)₂CO-Phe-OSu (20)



U otopinu spoja **19** (0,80 g, 3,41 mmol) u suhom dioksanu (30 mL) doda se *N*-hidroksisukcinimid, HOSu (0,39 g, 3,41 mmol) i DCC (0,70 g, 3,41 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Potom se otpari otapalo pod sniženim tlakom, doda se CH₂Cl₂ i otopina se pere vodom i 10% NaHCO₃. Organski dio se suši nad Na₂SO₄, a zatim se otapalo otpari do pola volumena i ostavi 2 h na -10 °C. Talog nusprodukta DCHU se odsiše pod sniženim tlakom, a filtrat se otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je 0,93 g (82%) bijelog praškastog produkta CH₃(CH₂)₂CO-Phe-OSu; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,35-7,22 (m, 10H, Ph), 5,84 (d, 1H, $J = 8,2$, NHC*H), 5,30 (dt, 1H, $J = 6,0, 8,2$, C*H_{Phe}), 3,39-3,16 (m, 2H, CH₂Ph), 2,84 (s, 4H, OSu), 2,19-2,09 (m, 2H, COCH₂), 1,67-1,52 (m, 2H, CH₂), 0,87 (dd, 3H, $J = 6,4, 13,8$, CH₃).

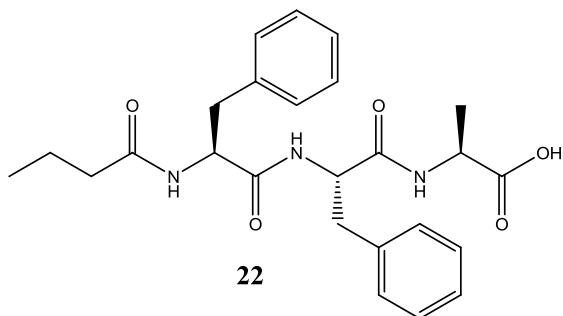
3.2.4.4. CH₃(CH₂)₂CO-Phe-Phe-Ala-OMe (21)



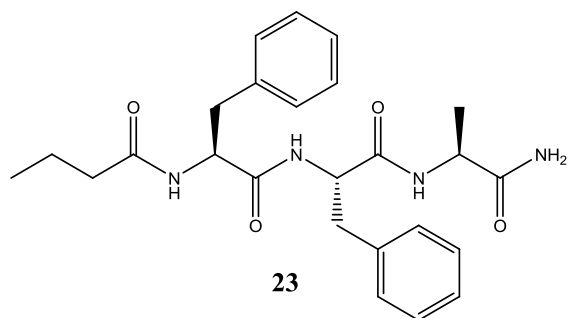
U otopinu spoja **20** (0,86 g, 2,58 mmol) u smjesi suhog dioksana i CH₂Cl₂ (3:1, 50 mL) dodan je prethodno sintetizirani dipeptid **2** (0,65 g, 2,58 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Nastali bijeli praškasti talog se odsiše pod sniženim tlakom, a filtrat se otpari pod sniženim tlakom. Dobiveni žuti talog se otopi u CH₂Cl₂ i otopina se pere vodom, 1M HCl, 10% NaHCO₃ te ponovno vodom. Organski dio se suši nad Na₂SO₄, a zatim se otapalo otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je ukupno 0,89 g (79%) bijelog praškastog

produkta $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO-Phe-Phe-Ala-OMe}$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 8,43 (d, 1H, $J = 7,1$, NHC^*H), 8,00 (d, 1H, $J = 8,2$, NHC^*H), 7,90 (d, 1H, $J = 8,5$, NHC^*H), 7,30-7,10 (m, 10H, Ph), 4,61-4,42 (m, 2H, $2 \times \text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,29 (q, 1H, $J = 7,1$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,62 (s, 3H, OCH_3), 3,07-2,59 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{Ph}$), 1,95 (t, 2H, $J = 7,3$, COCH_2), 1,40-1,26 (m, 5H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_{3\text{Ala}}$), 0,67 (t, 3H, $J = 7,4$, CH_3).

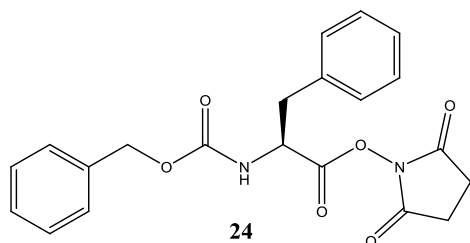
3.2.4.5. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO-Phe-Phe-Ala-OH}$ (22)



U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **19** reakcijom spoja **21** (0,28 g, 0,61 mmol) i 1M LiOH (0,90 ml, 0,90 mmol) u smjesi CH_3OH i CH_2Cl_2 (1:1, 10 mL) dobiveno je 0,25 g (90%) bijelog praškastog produkta $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO-Phe-Phe-Ala-OH}$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 12,61 (bs, 1H, OH), 8,28 (d, 1H, $J = 7,3$, NHC^*H), 8,02-7,83 (m, 2H, $2 \times \text{NHC}^*\text{H}$), 7,34-7,10 (m, 10H, $2 \times \text{Ph}$), 4,61-4,40 (m, 2H, $2 \times \text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,29-4,17 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,12-2,59 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{Ph}$), 1,95 (t, 2H, $J = 7,3$, COCH_2), 1,42-1,21 (m, 5H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_{3\text{Ala}}$), 0,67 (t, 3H, $J = 7,4$, CH_3), $^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 174,66, 173,71, 173,10, 172,64 ($4 \times \text{CONH}$), 139,84, 139,38, 131,09, 130,94, 129,85, 129,75, 128,11, 127,94 ($2 \times \text{Ph}$), 55,49 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 55,25 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 49,44 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 39,35 (COCH_2), 39,17 (CH_2Ph), 38,92 (CH_2Ph), 20,34 (CH_2), 18,73 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 15,23 (CH_3), t.t. = 250-252 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{RT} = -18^{\circ}$ ($c = 0,02 \text{ M}$ u MeOH); elementna analiza za $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$ ($\text{Mr} = 453,53$) izračunato (%): C 66,21 H 6,89 N 9,27, pronađeno: C 66,31 H 6,90 N 9,25.

3.2.4.6. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO-Phe-Phe-Ala-NH}_2$ (**23**)

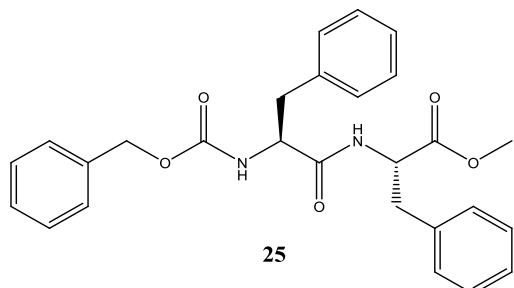
U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **6** iz spoja **21** (0,5 g, 1,07 mmol) u metanolnom amonijaku (50 mL) dobiveno je 0,48 g (96%) bijelog kristaliničnog produkta $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO-Phe-Phe-Ala-NH}_2$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 8,06 (d, 1H, $J = 7,9$, NHC^*H), 7,99 (d, 1H, $J = 7,6$, NHC^*H), 7,93 (d, 1H, $J = 8,4$, NHC^*H), 7,29 -7-10 (m, 11H, Ph + $\text{NH}(\text{NH}_2)$), 7,01 (s, 1H, $\text{NH}(\text{NH}_2)$), 4,55-4,40 (m, 2H, 2x $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,25-4,14 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,10-3,25 (m, 4H, 2x CH_2Ph), 1,97 (dd, 2H, $J = 7,4$, 14,5, COCH_2), 1,43-1,28 (m, 2H, CH_2) 1,20 (t, 3H, $J = 8,4$, CH_3_{Ala}), 0,67 (t, 3H, $J = 7,4$, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 173,88, 171,87, 171,39, 170,28 (4 x CONH), 137,95, 137,62, 129,20, 129,07, 128,00, 127,88, 126,23, 126,08 (2 x Ph), 53,80 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 53,66 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 47,98($\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 37,25 (CH_2Ph), 37,01 (CH_2Ph), 33,31 (COCH_2), 24,42 (CH_2), 18,33 (CH_3_{Ala}), 13,37 (CH_3); t.t. = 296-298 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{RT}} = -14^\circ$ (c = 0,02 M u MeOH); elementna analiza za $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4$ (Mr = 452,55) izračunato (%): C 66,35 H 7,13 N 12,38, pronađeno: C 66,41 H 7,21 N 12,43.

3.2.5. Priprava derivata tripeptida sa benziloksikarbonil (*Z,Cbz*) zaštitnom grupom3.2.5.1. *Z-Phe-OSu* (**24**)

U skladu s postupkom opisanima za pripravu spoja **20**, reakcijom *Z-Phe-OH* (1 g, 3,34 mmol) i *HOSu* (0,38 g, 3,34 mmol) u suhom dioksanu (30 mL) uz *DCC* (0,69 g, 3,34 mmol) dobiveno je 1,01 g (76%) bijelog kristaliničnog produkta *Z-Phe-OSu*; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz,

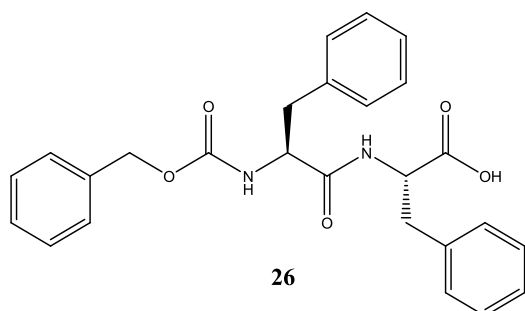
CDCl_3) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,39-7,20 (m, 10H, 2 x Ph), 5,19-4,99 (m, 4H, OCH_2Ph + $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$ + NHC^*H), 3,36-3,18 (m, 2H, CH_2Ph), 2,83 (s, 4H, OSu),

3.2.5.2. Z-Phe-Phe-OMe (25)

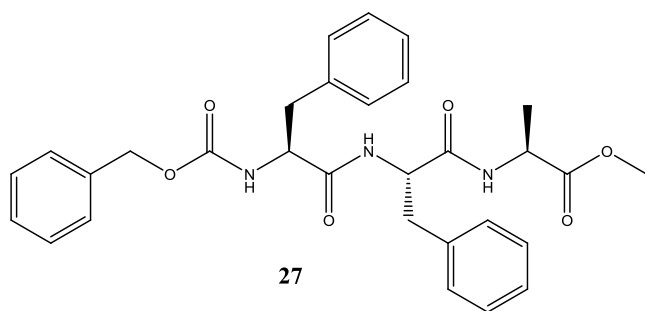


U ohlađenu otopinu (-10 °C, ledena kupelj) spoja **24** (0,89 g, 2,26 mmol) u suhom CH_2Cl_2 (30 mL) dodani su Phe-OMe·HCl (0,48 g, 2,26 mmol) i Et_3N (0,31 mL, 2,26 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 48 h te se pere vodom, 1M HCl i 10% NaHCO_3 , suši nad Na_2SO_4 , a zatim se otapalo otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je 0,90 g (89%) bijelog kristaliničnog produkta Z-Phe-Phe-OMe; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,39-7,13 (m, 13H, 2 x Ph), 7,00-6,93 (m, 2H, Ph), 6,17 (d, 1H, $J = 7,1$, NHC^*H), 5,20 (bs, 1H, NHC^*H), 5,08 (s, 2H, OCH_2Ph), 4,77 (dd, 1H, $J = 7,0$, 13,9, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,39 (dd, 1H, $J = 7,0$, 14,0 $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 3,67 (s, 3H, OCH_3), 3,12-2,95 (m, 4H, 2 x CH_2Ph).

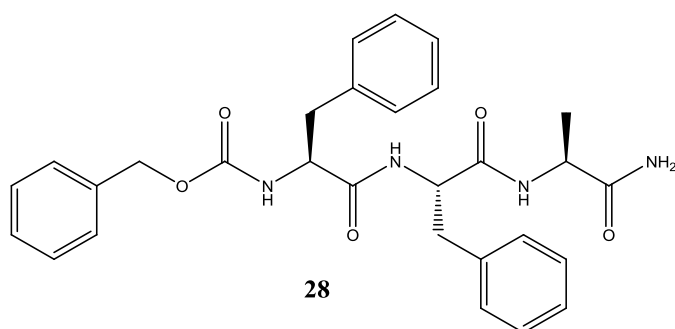
3.2.5.3. Z-Phe-Phe-OH (26)



U skladu s postupkom opisanima za pripremu spoja **7** reakcijom spoja **25** (0,9 g, 1,99 mmol) i 1M LiOH (2,99 mL, 2,99 mmol) u CH_3OH (50 mL) uz dodatak 1 mL CH_2Cl_2 dobiveno je 0,82 g (93%) bijelog kristaliničnog produkta Z-Phe-Phe-OH; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 12,78 (bs, 1H, OH), 8,27 (d, 1H, $J = 7,80$, NHC^*H), 7,45 (d, 1H, $J = 8,80$, NHC^*H), 7,37-7,13 (m, 15H, 3 x Ph), 4,92 (s, 2H, OCH_2Ph), 4,50-4,43 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,30-4,23 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 3,12-2,91 (m, 3H, CH_2Ph), 2,72-2,64 (m, 1H, CH_2Ph).

3.2.5.4. *Z*-Phe-Phe-Ala-OMe (27)

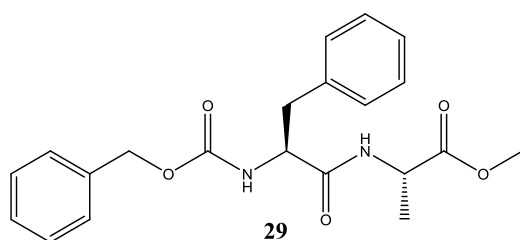
U ohlađenu otopinu (-10 °C, ledena kupelj) spoja **26** (0,97 g, 2,18 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (30 mL) dodani su Ala-OMe·HCl (0,3 g, 2,18 mmol), Et₃N (0,304 mL, 2,18 mmol), DCC (0,45 g, 2,18 mmol) i katalitička količina DMAP-a. Reakcijska smjesa se miješa 30 minuta na 0 °C, a zatim na sobnoj temperaturi preko noći. Talog DCHU se odsiše pod sniženim tlakom, a filtrat se otpari pod sniženim tlakom i ostatak se otopi u etil-acetatu te se otopina pere vodom, 1M HCl, 10% NaHCO₃ te opet vodom. Organski dio se suši nad Na₂SO₄, a zatim se otapalo otpari pod sniženim tlakom. Dobiveni bijeli talog se kromatografski pročisti (sustav CH₂Cl₂ : MeOH = 19:1). Dobiveno je 0,71 g (75%) bijelog kristaliničnog produkta *Z*-Phe-Phe-Ala-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,48 (d, 1H, *J* = 6,9, NHC*H), 8,08 (d, 1H, *J* = 7,30, NHC*H), 7,42 (d, 1H, *J* = 7,2, NHC*H), 7,36-7,11 (m, 15H, 3 x Ph), 4,92 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,65-4,52 (m, 1H, C*H_{Phe}), 4,34-4,19 (m, 2H, C*H_{Phe} + C*H_{Ala}), 3,62 (s, 3H, OCH₃), 3,05 (dd, 1H, *J* = 7,4, 13,9, CH₂Ph), 2,93-2,78 (m, 2H, CH₂Ph), 2,71-2,58 (m, 1H, CH₂Ph), 1,30 (d, 3H, *J* = 7,1, CH₃Ala).

3.2.5.5. *Z*-Phe-Phe-Ala-NH₂ (28)

U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **6** iz spoja **27** (0,70 g, 1,33 mmol) u metanolnom amonijaku (50 mL) dobiveno je 0,67 g (97%) bijelog praškastog produkta *Z*-Phe-Phe-Ala-NH₂; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,14 (d, 1H, *J* = 8,0, NHC*H), 8,04 (d, 1H, *J* = 7,2, NHC*H), 7,46 (d, 1H, *J* = 8,1, NHC*H), 7,38-7,14 (m, 15H, 3 x Ph),

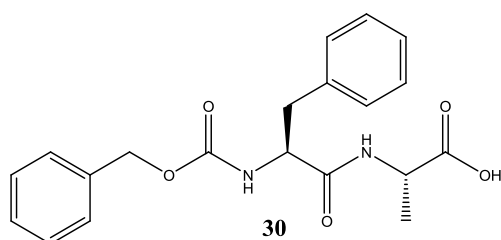
7,02 (s, 1H, NH(NH₂)), 4,93 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,58-4,51 (m, 1H, C*H_{Phe}), 4,25-4,16 (m, 2H, C*H_{Phe} + C*H_{Ala}), 3,13-2,59 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,22 (d, 3H, $J = 7,2$, CH_{3Ala}); ¹³C-NMR (75,5 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C/ppm: 173,83, 171,31, 170,27, 155,64 (4 x CONH), 137,95, 137,56, 136,92, 129,22, 129,07, 128,21, 127,96, 127,93, 127,59, 127,32, 126,19, 126,13 (3 x Ph), 65,15 (OCH₂Ph), 56,06 (C*H_{Phe}), 53,74 (C*H_{Phe}), 47,96 (C*H_{Ala}), 37,35 (2 x CH₂Ph), 18,33 (CH_{3Ala}); t.t. = 271-273 °C; [α]_D^{RT} = -16° (c = 0,02 M u EtOH); elementna analiza za C₂₉H₃₂N₄O₅ (Mr = 516,59) izračunato (%): C 67,43 H 6,24 N 10,85, pronađeno: C 67,41 H 6,19 N 10,84.

3.2.5.6. Z-Phe-Ala-OMe (29)

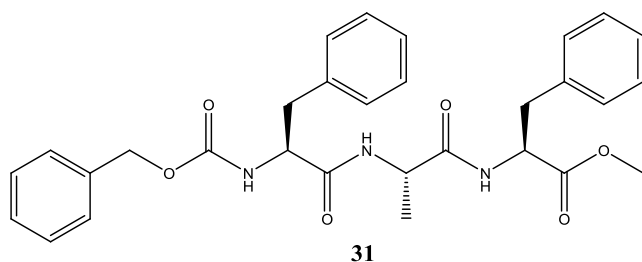


U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **25** reakcijom spoja **24** (0,82 g, 2,06 mmol) i Ala-OMe·HCl (0,28 g, 2,06 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (30 mL) uz Et₃N (0,287 mL, 2,06 mmol) dobiveno je 0,74 g (93%) bijelog praškastog produkta Z-Phe-Ala-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,39-7,16 (m, 10H, 2 x Ph), 6,31 (d, 1H, $J = 6,3$, NHC*H), 5,30 (bs, 1H, NHC*H), 5,09 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,57-4,37 (m, 2H, C*H_{Phe} + C*H_{Ala}), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,21-2,98 (m, 2H, CH₂Ph), 1,33 (d, 3H, $J = 7,1$, CH_{3Ala}).

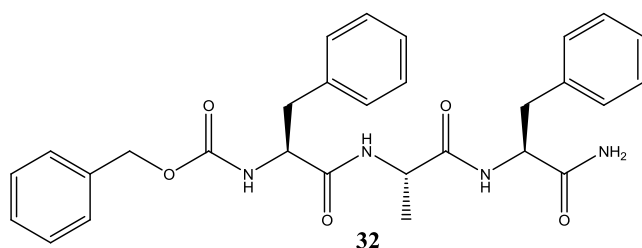
3.2.5.7. Z-Phe-Ala-OH (30)



U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **7** reakcijom spoja **29** (0,75 g, 1,95 mmol) i 1M LiOH (2,93 mL, 2,93 mmol) u CH₃OH (40 mL) dobiveno je 0,71 g (98%) bijelog kristaliničnog produkta Z-Phe-Ala-OH; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,40-7,08 (m, 10H, 2 x Ph), 6,60 (d, 1H, $J = 6,9$, NHC*H), 5,58 (bs, 1H, NHC*H), 5,06 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,57-4,43 (m, C*H_{Phe} + C*H_{Ala}), 3,05 (d, 2H, $J = 6,8$, CH₂Ph), 1,33 (t, 3H, $J = 7,1$, CH_{3Ala}).

3.2.5.8. *Z-Phe-Ala-Phe-OMe* (**31**)

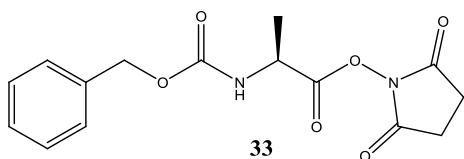
U ohlađenu otopinu (-10 °C, ledena kupelj) **30** (0,70 g, 1,89 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (60 mL) dodani su Phe-OMe·HCl (0,39 g, 1,89 mmol), Et₃N (0,264 mL, 1,89 mmol), DCC (0,39 g, 1,89 mmol) i katalitička količina DMAP-a. Reakcijska smjesa se miješa 30 minuta na 0 °C, a zatim na sobnoj temperaturi 48 sati. Talog DCHU se odsiše pod sniženim tlakom, a filtrat se otpari i ostatak se otopi u etil-acetatu te se otopina pere vodom, 1M HCl, 10% NaHCO₃ te ponovno vodom. Organski dio se suši nad Na₂SO₄, a zatim se otapalo otpari pod sniženim tlakom. Ostatak nakon otparavanja se otopi u minimalnoj količini CH₂Cl₂ i nadsloji petroleterom te ostavi preko noći na -20 °C pri čemu dolazi do taloženja produkta. Talog se odsiše, ispere petroleterom i suši pod sniženim tlakom. Dobiveno je 0,85 g (85%) bijelog kristaliničnog produkta *Z-Phe-Ala-Phe-OMe*; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,29 (d, 1H, *J* = 7,4, NHC*H), 8,07 (d, 1H, *J* = 7,2, NHC*H), 7,45 (d, 1H, *J* = 7,6, NHC*H), 7,32-7,17 (m, 15H, 3 x Ph), 4,93 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,47 (q, 1H, *J* = 7,5, C*H_{Phe}), 4,35-4,23 (m, 2H, C*H_{Phe} + C*H_{Ala}), 3,58 (s, 3H, OCH₃), 3,07-2,91 (m, 3H, CH₂Ph), 2,73-2,59 (m, 1H, CH₂Ph), 1,21 (d, 3H, *J* = 7,1, CH₃Ala).

3.2.5.9. *Z-Phe-Ala-Phe-NH₂* (**32**)

U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **6** iz **31** (0,80 g, 1,50 mmol) u metanolnom amonijaku (60 mL) dobiveno je 0,75 g (96%) bijelog praškastog produkta *Z-Phe-Ala-Phe-NH₂*; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 8,09 (d, 1H, *J* = 7,0, NHC*H), 7,77 (d, 1H, *J* = 8,0, NHC*H), 7,43 (d, 1H, *J* = 8,1, NHC*H), 7,33 -7,10 (m, 15H, 3 x Ph), 7,03 (s, 1H, NH(NH₂)), 4,89 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,38 (dt, 1H, *J* = 8,1, 13,50, C*H_{Phe}), 4,29-4,20 (m, 2H,

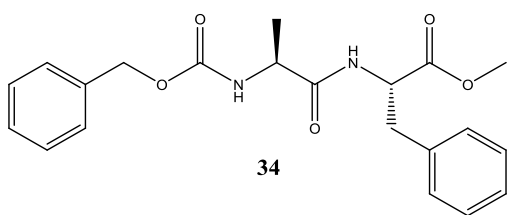
$C^*H_{Phe} + C^*H_{Ala}$), 3,03-2,57 (m, 4H, 2 x CH_2Ph), 1,16 (t, 3H, $J = 7,2$, CH_3Ala); ^{13}C -NMR (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ_C/ppm : 173,04, 172,21, 171,81, 156,33 (4 x CONH), 138,62, 138,18, 137,46, 129,65, 128,73, 128,47, 128,11, 127,85, 126,67 (3 x Ph), 65,66 (OCH_2Ph), 56,43 (C^*H_{Phe}), 54,04 (C^*H_{Phe}), 48,93 (C^*H_{Ala}), 37,95, 37,79 (2 x CH_2Ph), 18,51 (CH_3Ala); t.t. = 278-280 °C; $[\alpha]_D^{RT} = -21^\circ$ (c = 0,02 M u EtOH); elementna analiza za $C_{29}H_{32}N_4O_5$ (Mr = 516,59) izračunato (%): C 67,43 H 6,24 N 10,85, pronađeno: C 67,49 H 6,21 N 10,81.

3.2.5.10. Z-Ala-OSu (33)



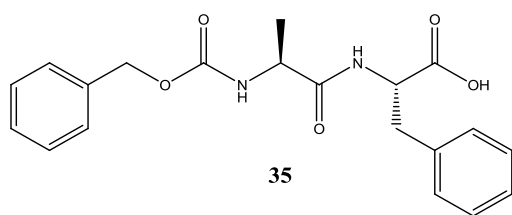
U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **20**, reakcijom Z-Ala-OH (2 g, 8,96 mmol) i HOSu (1,03 g, 8,96 mmol) u suhom dioksanu (50 mL) uz DCC (1,85 g, 8,96 mmol) dobiveno je 2,25 g (78%) bijelog kristaliničnog produkta Z-Ala-OSu; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H/ppm : 7,39 -7,30 (m, 5H, Ph), 5,23 (s, 1H, NHC^*H), 5,14 (s, 2H, OCH_2Ph), 4,83-4,73 (m, 1H, C^*H_{Ala}), 2,84 (s, 4H, OSu), 1,60 (d, 3H, $J = 7,2$, CH_3Ala).

3.2.5.11. Z-Ala-Phe-OMe (34)



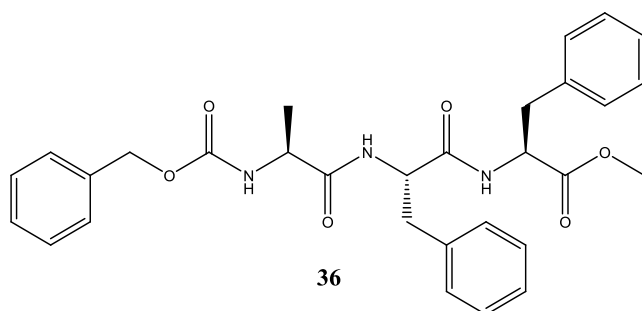
U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **25** reakcijom **33** (1,61 g, 5,02 mmol) i Phe-OMe·HCl (1,08 g, 5,02 mmol) u suhom CH_2Cl_2 (40 mL) uz Et_3N (0,70 mL, 5,02 mmol) dobiveno je 1,7 g (88%) bijelog praškastog produkta Z-Ala-Phe-OMe; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H/ppm : 7,40-7,20 (m, 8H, Ph), 7,07 (d, 2H, $J = 6,2$, Ph), 6,44 (s, 1H, NHC^*H), 5,23 (s, 1H, NHC^*H), 5,16-5,03 (m, 2H, OCH_2Ph), 4,91-4,76 (m, 1H, C^*H_{Phe}), 4,30-4,12 (m, 1H, C^*H_{Ala}), 3,72 (s, 3H, OCH_3), 3,18-3,03 (m, 2H, CH_2Ph), 1,33 (d, 3H, $J = 7,0$, CH_3Ala).

3.2.5.12. Z-Ala-Phe-OH (35)



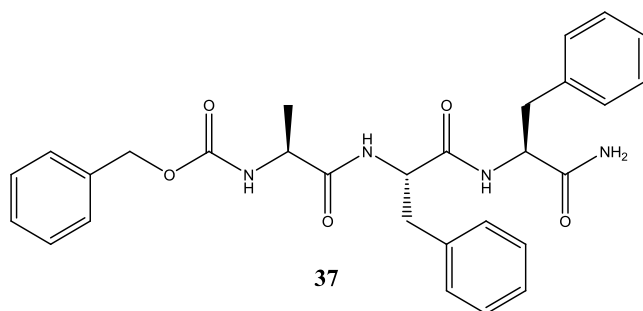
U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **7** reakcijom **34** (1,69 g, 4,40 mmol) i 1M LiOH (6,60 mL, 6,60 mmol) u CH₃OH (50 mL) dobiveno je 1,50 g (95%) bijelog kristaliničnog produkta Z-Ala-Phe-OH; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,92 (s, 1H, OH), 7,45-7,02 (m, 10H, 2 x Ph), 6,67 (s, 1H, NHC*H), 5,41 (s, 1H, NHC*H), 5,20-4,98 (m, 2H, OCH₂Ph), 4,89-4,80 (m, 1H, C*H_{Phe}), 4,24 (s, 1H, C*H_{Ala}), 3,19 (dd, 1H, *J* = 6,5, 14,0, CH₂Ph), 3,03 (dd, 1H, *J* = 6,5, 14,0, CH₂Ph), 1,29 (d, 3H, *J* = 7,0, CH₃_{Ala}).

3.2.5.13. Z-Ala-Phe-Phe-OMe (36)



U skladu s postupkom opisanim za pripravu spoja **31** reakcijom **35** (0,93 g, 2,5 mmol) i Phe-OMe·HCl (0,54 g, 2,5 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (60 mL) uz Et₃N (0,35 mL, 2,5 mmol), DCC (0,52 g, 2,5 mmol) i katalitičku količinu DMAP-a dobiveno je 1,10 g (82%) bijelog kristaliničnog produkta Z-Ala-Phe-Phe-OMe; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,39-7,12 (m, 13H, 2 x Ph), 7,02-6,92 (m, 2H, Ph), 6,50 (d, 1H, *J* = 7,1, NHC*H), 6,20 (s, 1H, NHC*H), 5,12-5,02 (m, 3H, NHC*H + OCH₂Ph), 4,75 (q, 1H, *J* = 6,8, C*H_{Phe}), 4,60 (q, 1H, *J* = 7,0, C*H_{Phe}), 4,21-4,07 (m, 1H, C*H_{Ala}), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 3,13-2,88 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,26 (t, 3H, *J* = 7,1, CH₃_{Ala}).

3.2.5.14. Z-Ala-Phe-Phe-NH₂ (37)



U skladu s postupkom opisanim za pripremu spoja **6** iz **36** (1 g, 1,88 mmol) u metanolnom amonijaku (70 mL) dobiveno je 0,94 g (97%) bijelog praškastog produkta Z-Ala-Phe-Phe-NH₂; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H/ppm: 7,98 (d, 1H, *J* = 7,2, NHC*H), 7,87 (d, 1H, *J* = 7,2, NHC*H), 7,42-7,12 (m, 17H, NHC*H + NH(NH₂) + 3 x Ph), 7,07 (s, 1H, NH(NH₂)), 5,06-4,94 (m, 2H, OCH₂Ph), 4,51-4,38 (m, 2H, 2 x C*H_{Phe}), 4,04 -3,94 (m, 1H, C*H_{Ala}), 3,00 (dd, 2H, *J* = 7,3, 13,8, CH₂Ph), 2,89-2,71 (m, 2H, CH₂Ph), 1,09 (d, 3H, *J* = 7,1, CH_{3Ala}); ¹³C-NMR (75,5 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C/ppm: 172,50, 172,16, 170,48, 155,58 (4 x CONH), 137,71, 137,51, 136,89, 129,19, 129,12, 128,30, 128,02, 127,93, 127,75, 127,70, 126,21, 126,15 (3 x Ph), 65,40 (OCH₂Ph), 53,77 (C*H_{Phe}), 53,67 (C*H_{Phe}), 50,10 (C*H_{Ala}), 37,54, 37,31 (2 x CH₂Ph), 18,03 (CH_{3Ala}); t.t. = 301-203 °C; [α]_D^{RT} = -12° (c = 0,02 M u MeOH); elementna analiza za C₂₉H₃₂N₄O₅ (Mr = 516.59) izračunato (%): C 67,43 H 6,24 N 10,85, pronađeno: C 67,51 H 6,27 N 10,83.

3. Geliranje tripeptidnih derivata

Efikasnost tripeptidnih gelatora ispitana je na uzorcima mase 10 mg koji su otopljeni uz grijanje u ispitivanom otapalu određenog volumena. Ukoliko je hlađenjem otopine nastao gel, dodana je nova količina otapala, a gel se uz zagrijavanje otopi. Sustav se ponovno hladi kako bi se provjerila mogućnost nastajanja gela s novom količinom otapala. Proces otapanja gela i ponovnog dodavanja otapala ponavljan je do onog volumena otapala pri kojem ne nastaje čvrsti gel; gel pada okretanjem epruvete. Na taj se način utvrđuje maksimalni volumen geliranog otapala. U slučaju kada je spoj netopiv u izabranom otapalu, dodaje se mala količina otapala u kojem dolazi do otapanja spoja, a zatim se dodaje otapalo manje polarosti do nastanka gela. Procedura dodavanja otapala se ponavlja do trenutka kada ponovnim hlađenjem otopine nastaje meki gel ili dolazi do otapanja spoja.

3.4. Eksperimentalno određivanje interakcije tripeptida **6** s amiloidnim bojama

3.4.1. Fluorescencijska spektroskopija

Tripeptid **6** s vodom tvori neproziran (mutan hidrogel) i zbog toga nije moguće fluorimetrijsko ispitivanje interakcije hidrogela **6** sa tioflavinom T. Stoga je konstanta stabilnosti kompleksa tripeptida **6** i tioflavina T određena u vodenoj otopini.

Tablica 2. prikazuje pripravu otopina tijekom titracije vodene otopine tripeptida **6** sa vodenom otopinom tioflavina T te intenzitet fluorescentne emisije tioflavina T u ovisnosti o koncentraciji tripeptida **6**. Koncentracija tioflavina T je konstantna tijekom titracije ($c = 3 \times 10^{-6}$ M), a koncentracija **6** se tijekom titracije smanjuje. Emisija fluorescencije prilikom titracije odgovara emisiji fluorescentne boje tioflavina T. Tripeptid **6** u vodenoj otopini ne pokazuje emisiju fluorescencije.

Tablica 2. Priprava otopina tijekom titracije vodene otopine tripeptida **6** s vodenom otopinom tioflavina T (ThT) i intenzitet fluorescentne emisije tioflavina T u ovisnosti o koncentraciji **6** ($\lambda_{\text{exc}} = 412 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}(\text{ThT}) = 484 \text{ nm}$).

	c (6) / M	V (otopina u kivetu) / μl	izbačeno iz kivete / μl	dodatak V (ThT, 3×10^{-6} M) / μl	I_{em} (412 / 484 nm)
1	3×10^{-3}	3000	0	0	175,72
2	$2,5 \times 10^{-3}$	2500	500	500	170,98
3	$2,25 \times 10^{-3}$	2700	300	300	154,81
4	2×10^{-3}	2667	333	333	152,17
5	$1,75 \times 10^{-3}$	2625	375	375	143,47
6	$1,5 \times 10^{-3}$	2571	429	429	143,14
7	$1,25 \times 10^{-3}$	2500	500	500	137,45
8	1×10^{-3}	2400	600	600	131,00
9	$7,5 \times 10^{-4}$	2250	750	750	128,78
10	5×10^{-4}	2000	1000	1000	119,63
11	$2,5 \times 10^{-4}$	1500	1500	1500	113,77
12	1×10^{-4}	1200	1800	1800	120,92
13	0	ThT, c = 3×10^{-6} M	-	-	94,12

3.4.2. Konfokalna mikroskopija

Vodena otopina tioflavina T ($c = 3 \times 10^{-6}$ M) je pažljivo stavljena iznad hidrogela tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3}$ M) i tako ostavljena tri dana na sobnoj temperaturi kako bi navedena boja penetrirala unutar gela. Uzorci hidrogela su promatrani i snimljeni na laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopu SP8 X FLIM (ekscitacija na 458 nm, emisija 481-600 nm).

Hidrogel tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3}$ M) je istim postupkom obojan s vodenom otopinom kongo-crvenila ($c = 1,5 \times 10^{-4}$ M) i snimljen na konfokalnom mikroskopu (ekscitacija na 499 nm, emisija 550-700 nm).

3.5. *In vitro* ispitivanje biokompatibilnosti hidrogela tripeptida Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂

3.5.1. *In vitro* ispitivanje staničnog preživljenja i proliferacije u tripeptidnom hidrogelu

Tripeptid **6** otopljen je u fiziološkoj otopini u 5,5 mM koncentraciji (minimalna gelatorska koncentracija). Otopina je hlađena na vodenoj kupelji do temperature 37 °C. Stanice HEK283T su uzgojene u mediju DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“) koji sadrži 1%-tnu smjesu penicilina i streptomicina (Pen/Strep), 1%-tni L-glutamin i 10%-tni teleći serum. Kada se postigne konfluentnost od oko 80% (svakih 3-4 dana), stanice se tripsiniziraju i centrifugiraju 5 min pri brzini 3000 xg (4400 o/min). Nakon centrifugiranja je odstranjen medij i stanice su suspendirane u hidrogel tripeptida **6** na temperaturi 37 °C sa koncentracijom stanica 1×10^6 stanica/ml. Stanice zarobljene u hidrogelu su nasađene na ploču sa 24 jažice pri čemu svaka jažica sadrži 150 µL heterogene smjese stanica i hidrogela. Nakon toga je 600 µL čistog medija oprezno dodano u svaku jažicu kako se ne bi poremetila stabilnost smjese. Stanice su u istoj koncentraciji nasađene zajedno sa Matrigel (Croning) hidrogelom koji je poslužio kao pozitivna kontrola zajedno sa čistim medijom. Negativna kontrola je bio lateks. Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost četiri nezavisna pokusa pri čemu je svaki izveden tri puta. Stanice su držane 5 dana u vlažnoj atmosferi na 37 °C uz 5% CO₂. Uzorci su uzeti nultog i petog dana eksperimenta. Za utvrđivanje konačnog broja stanica u uzorcima korišten je poseban reagens za kvantifikaciju stanica (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay). Stanice su odvojene iz smjese s hidrogelom tako da je svaka jažica dvadeset puta snažno titrirana sa fosfatnim puferom (PBS). Nakon toga je dobivena otopina centrifugirana 5 min pri 3000 xg, a pufer je odsisan zajedno s otopljenim hidrogelom. Nakon toga stanice su suspendirane u 250 µL miliQ vode i ostavljene 1 h na 37 °C u vodenoj kupelji, a zatim pohranjene na -80 °C sve do analize na fluorimetru. Pripravljene uzorci su sonificirani na ultrazvučnoj kupelji, pomiješani sa Tris-EDTA (TE) puferom i bojom PicoGreen te inkubirani u mraku 10 min. Nakon toga im je izmjerena fluorescencija pri ekscitaciji na 485 nm i emisiji na 538 nm. Točan broj stanica je određen uz pomoć standarda za stanice HEK293T.

Za određivanje staničnog preživljenja korišten je poseban test za utvrđivanje preživljenja stanica (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay). Stanice su inkubirane u smjesi kalceina-AM (žive stanice) i etidijum homodimera-1 (mrtve stanice) 15 min te promatrane pod fluorescentnim mikroskopom Axiovert 200 uz povećanje 10x. Za svaku jažicu je snimljeno 5 mikrografija zelene

fluorescencije (žive stanice) i crvene fluorescencije (mrtve stanice). Mikrografije su analizirane softverom Fiji, a postotak živih stanica je izračunat po svakom vidnom polju.

3.5.2. *Transfekcija stanica*

Kako bi se istražila morfologija stanica, stanice su prolazno transfecirane s plazmidom tubulin-mCherry procesom elektroporacije na posebnom uređaju (Nucleofector 2b) slijedivši poseban transfekcijski protokol koji je osigurao proizvođač (Lonza, Basel, Švicarska). Pri tome je korišteno 1×10^6 stanica i 2 μg plazmida DNA.

3.5.3. *Konfokalna mikroskopija stanica*

Stanice unutar hidrogelske mreže te stanice uzgojene u čistom mediju su oslikane konfokalnim mikroskopom Leica SP8 X FLIM s objektivom s povećanjem 100x koji je grijan integriranim sustavom za grijanje (Okolab, Burlingame, SAD). Snopovi ekscitacije i emisije su odvojeni posebnom vrstom razdjelnika optičkih snopova (AOBS - „Acousto-Optical Beam Splitter, Leica, Wetzlar, Njemčka). Stanice su održavane na temperaturi 37 °C u komori za grijanje (Okolab, Burlingame, SAD). Emisija plazmida mCherry je detektirana hibridnim (HyD) detektorom u području 585-665 nm. Slike su dobivene pri 20 fokalnih ravnina s razmakom 1 μm i s jednosmjernim xyz skenirajućim načinom rada. Dodatno, obje grupe stanica su snimljene pod jakim svjetlom uz objektiv sa povećanjem 20x.

3.5.4. *Reološka mjerenja*

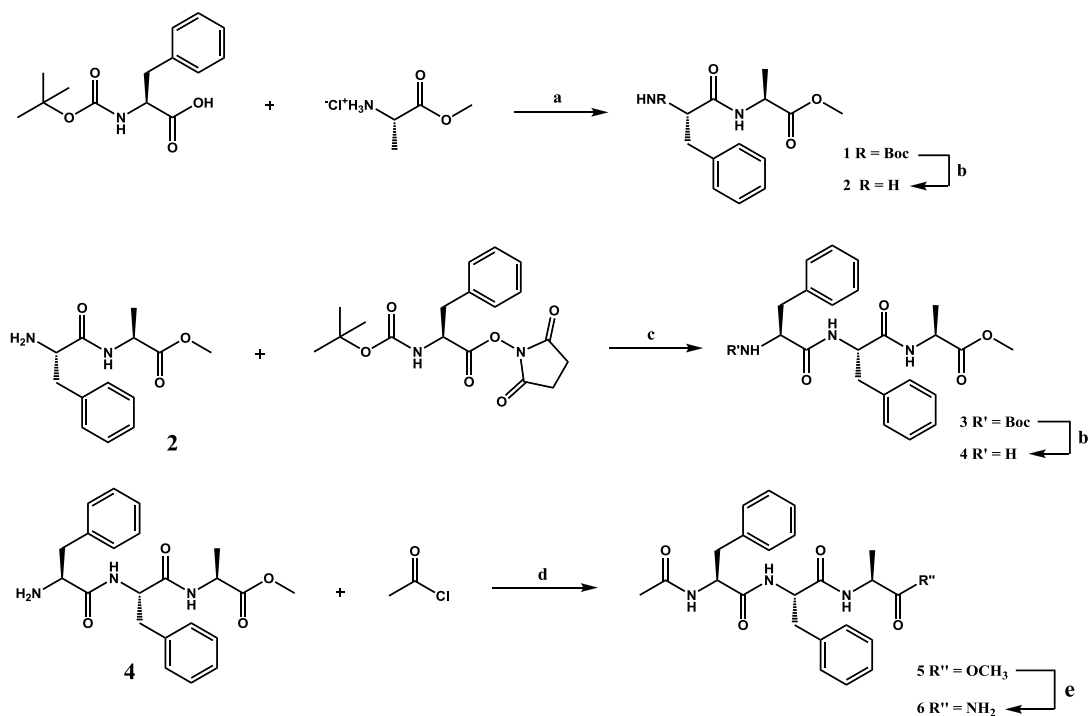
Mjerenja dinamičke viskoelastičnosti hidrogela tripeptida **6** su izvršena na Anton Paar reometru (MCR 301) uz korištenje paralelnih ploča (promjer ploča 25 mm) na temperaturi 25 °C. Tripeptid **6** (2,64 mg ml⁻¹) je uz lagano zagrijavanje otopljen u fiziološkoj otopini (pH = 6,12) i ostavljen da izgelira. Uzorak gela je postavljen na senzorsku ploču, podešena je širina prostora između dvaju ploča (300 μm) te je primijenjeno konstantno naprezanje od 2% uz frekvenciju 10 rad/s u trajanju od sat vremena. Dobiveni rezultati, G' - modul pohrane (elastični modul) te G'' - modul gubitka (viskozni modul) su prikazani u ovisnosti o vremenu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava tripeptidnih gelatora

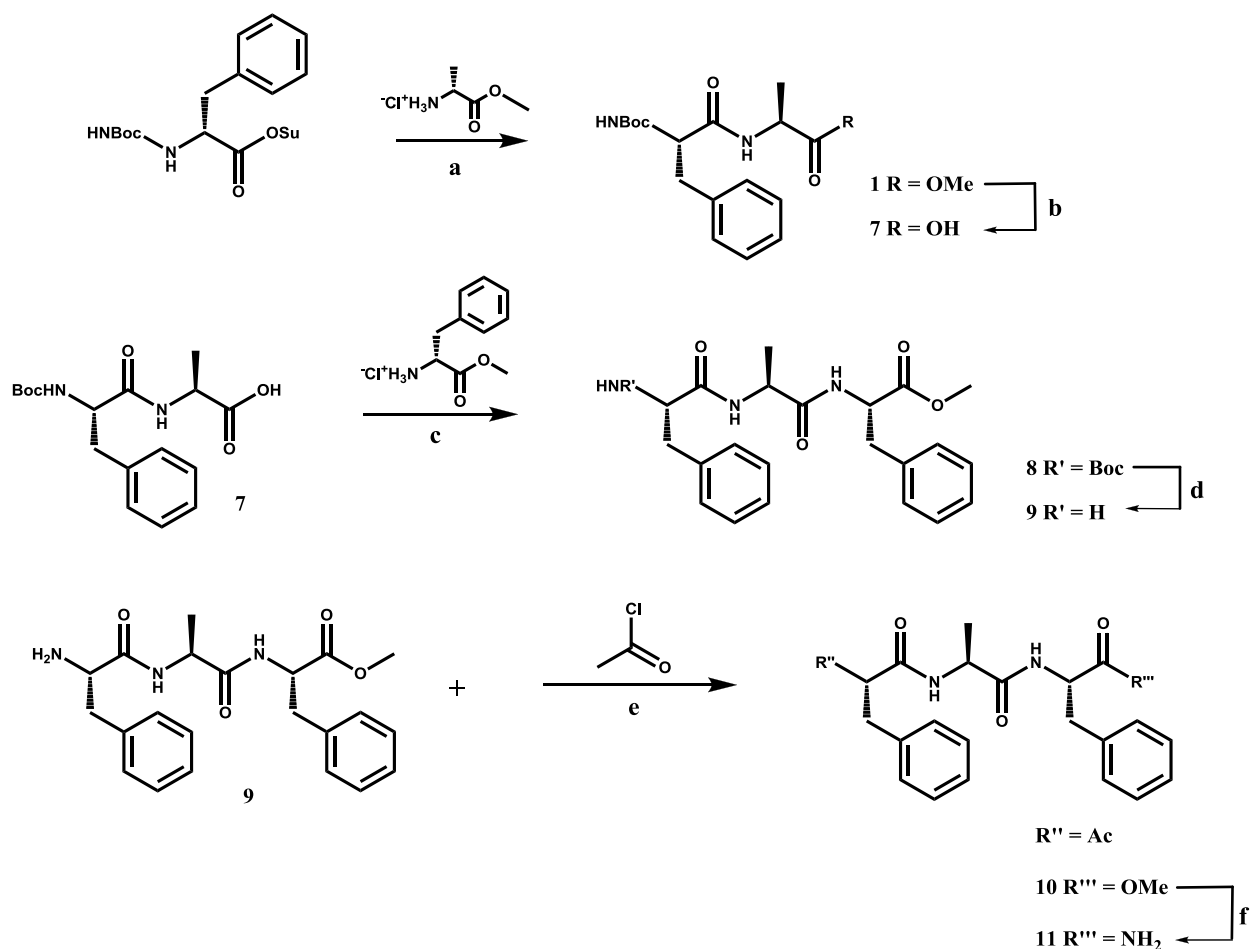
4.1.1. Priprava acetilnih tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA

Sinteza acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA (Shema 1.) započinje sintezom dipeptida **1** (Boc-Phe-Ala-OMe) odnosno kondenzacijom *N*-Boc(tert-butiloksikarbonil) fenilalanina i metilnog estera alanina uz pomoć karbodiimidnog reagensa *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC). Nakon što je trifluoroctenom kiselinom (TFA) uklonjena Boc zaštita, dipeptid **2** kondenziran je sa *N*-Boc zaštićenim aktivnim sukcinimidnim esterom fenilalanina pri čemu je dobiven tripeptid **3** (Boc-Phe-Phe-Ala-OMe). Nakon uklanjanja Boc zaštite uz TFA, dobiveni tripeptid **4** je acetiliran sa acetyl-kloridom pri čemu je nastao acetilirani metilni ester **5** (Ac-Phe-Phe-Ala-OMe). U zadnjem stupnju sinteze, metilni ester **5** je otopljen u zasićenoj otopini amonijaka u metanolu i reakcijom amonolize je dobiven spoj **6** (Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂).



Shema 1. Reagensi: a) DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; b) TFA/CH₂Cl₂; c) CH₂Cl₂; d) Et₃N, CH₂Cl₂; e) NH₃/MeOH.

4.1.2. Priprava acetilnih tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FAF

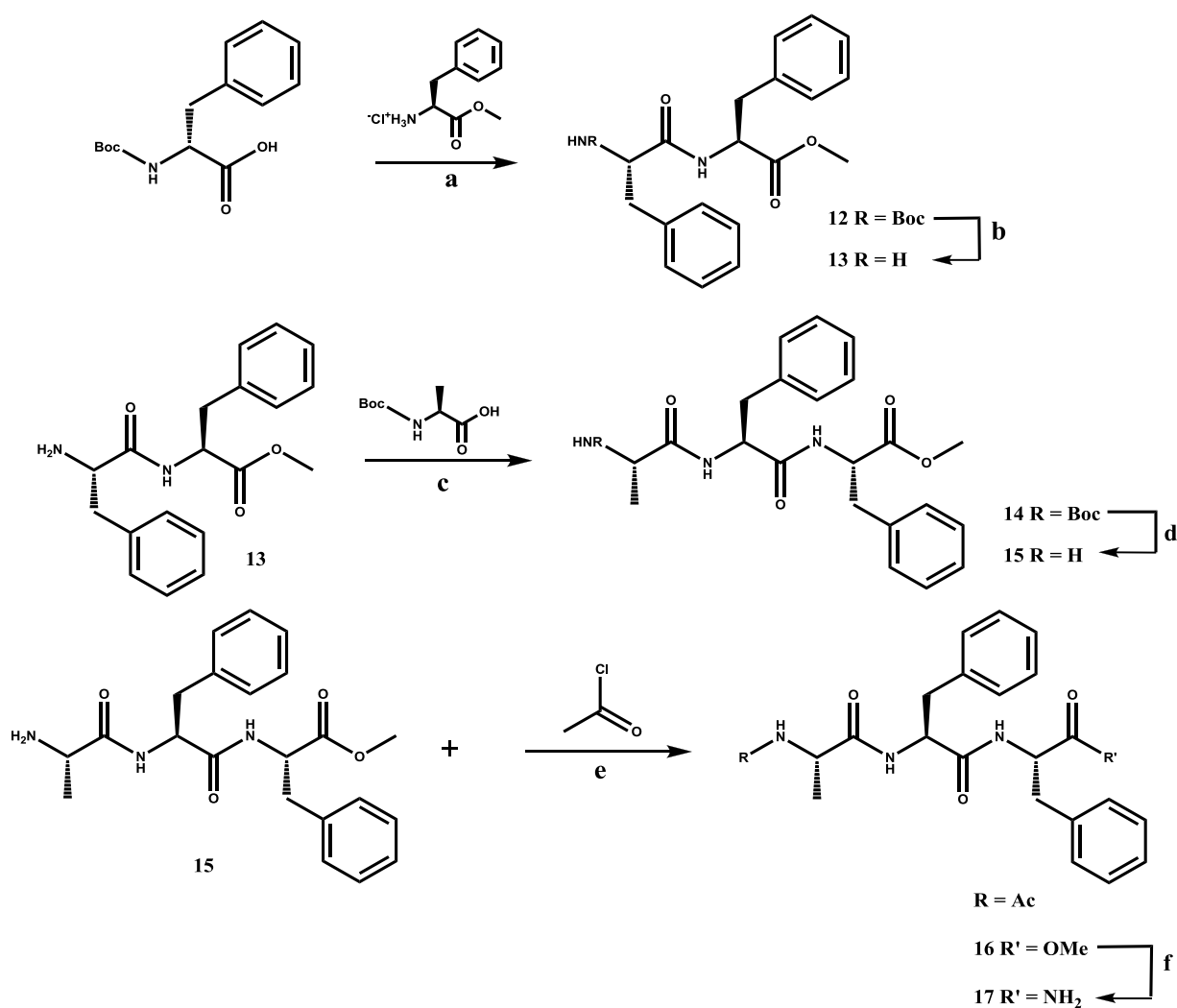


Shema 2. Reagensi: a) Et₃N, CH₂Cl₂; b) 1M LiOH zatim HCl; c) DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; d) TFA/CH₂Cl₂; e) Et₃N, CH₂Cl₂; f) NH₃/MeOH.

U prvom stupnju sinteze (Shema 2.) kondenzacijom *N*-Boc zaštićenog sukcinimidnog estera fenilalanina i alaninskog metilnog estera nastaje dipeptid **1**. Alkalnom hidrolizom spoj **1** je preveden u spoj **7**. Reakcijom DCC kondenzacije spoja **7** sa metilnim esterom fenilalanina nastaje tripeptid **8**. Nakon uklanjanja Boc zaštite uz TFA, tripeptid **9** je acetiliran sa acetyl-kloridom pri čemu je nastao spoj **10** (Ac-Phe-Ala-Phe-OMe). Tripeptid **10** je u zadnjem stupnju sinteze otopljen u zasićenoj otopini amonijaka u metanolu i reakcijom amonolize preveden u glavni produkt **11** (Ac-Phe-Ala-Phe-NH₂).

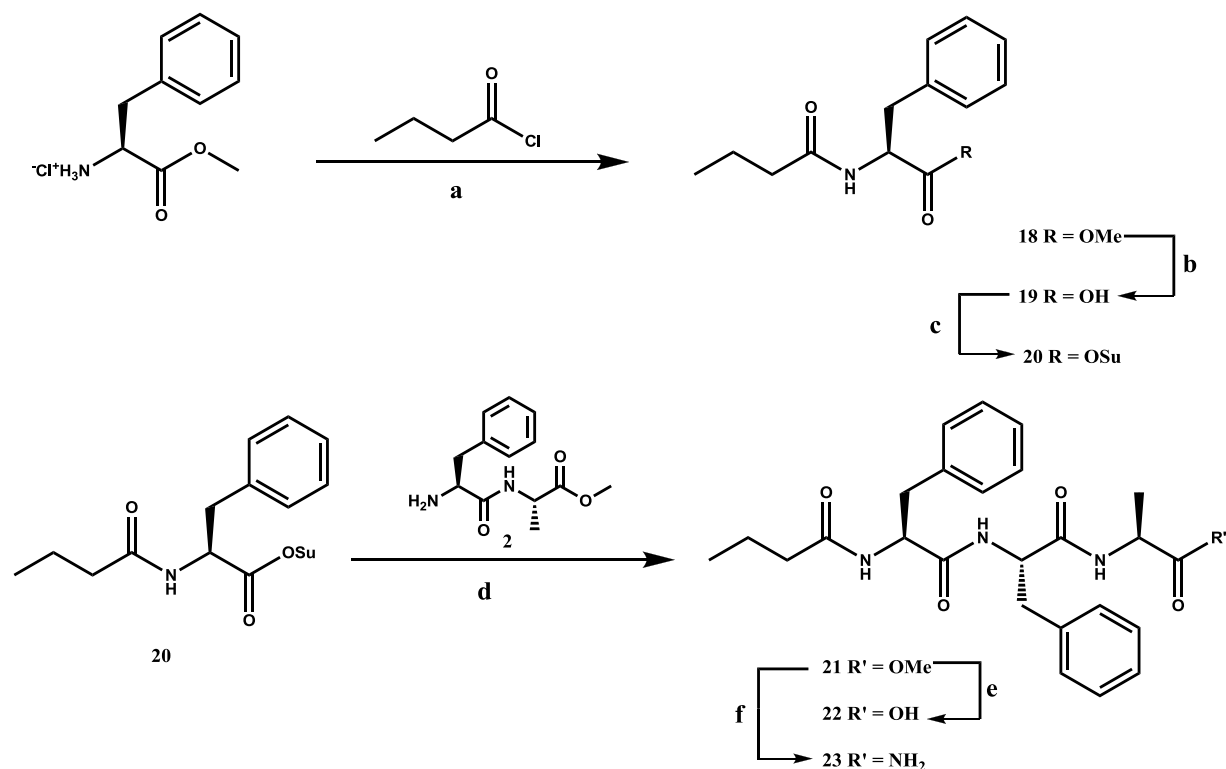
4.1.3. Priprava acetilnih tripeptida s aminokiselinskom sekvencom AFF

Sinteza acetilnih derivata aminokiselinske sekvence AFF prikazana je na Shemi 3. Kondenzacijom Boc-Phe-OH sa metilnim esterom fenilalanina uz DCC pripravljen je dipeptid **12**. Deprotekcijom *N*-terminalne zaštitne skupine sa TFA dobiven je dipeptid **13** koji je kondenzacijom s Boc-Ala-OH uz DCC preveden u tripeptid **14**. Deprotekcijom *N*-terminalne zaštitne skupine sa TFA dobiven je spoj **15** koji je s acetil kloridom preveden u spoj **16** (Ac-Ala-Phe-OMe). Njegovom amonolizom (konc. NH₃/MeOH) priređen je glavni produkt **17** (Ac-Ala-Phe-Phe-NH₂).



Shema 3. Reagensi: a), c) DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; b), d) TFA/CH₂Cl₂; e) Et₃N, CH₂Cl₂; f) NH₃/MeOH.

4.1.4. Priprava butirilnih tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA

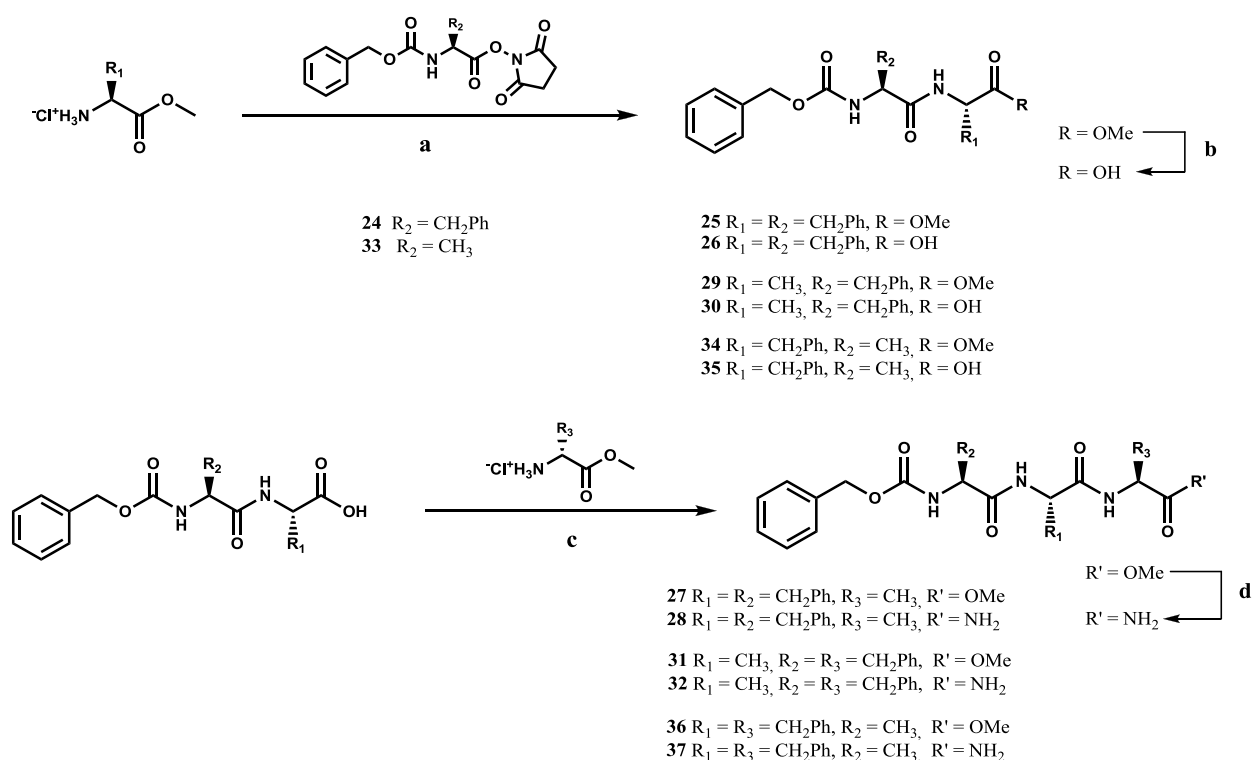


Shema 4. Reagensi: a) Et₃N, CH₂Cl₂; b), e) 1M LiOH zatim HCl; c) HOSu, DCC, dioksan; d) dioksan i CH₂Cl₂; f) NH₃/MeOH.

Na Shemi 4. prikazana je sinteza tripeptida sa butirilnim lancem (4 C atoma) na *N*-terminalnom kraju. U prvom stupnju sinteze uvodi se butirilni lanac na *N*-terminalni kraj metilnog estera fenilalanina. Zatim se tako dobiveni metilni ester fenilalanina **18** alkalnom hidrolizom prevede u kiselinu **19**. Spoj **19** se aktivira sa *N*-hidroksisukcinimidom (HOSu) pri čemu nastane aktivni sukcinimidni ester **20** koji se kondenzira s ranije pripremljenim dipeptidom **2** u tripeptid **21** (CH₃(CH₂)₂CO-Phe-Phe-Ala-OMe). Tripeptid **21** se alkalnom hidrolizom uz LiOH prevede u kiselinu **22**. Reakcijom amonolize spoja **21** u metanolnom amonijaku dobiven je spoj **23** (CH₃(CH₂)₂CO-Phe-Phe-Ala-NH₂).

4.1.5. Priprava derivata tripeptida sa benziloksikarbonil (Z,Cbz) zaštitnom skupinom

Na Shemi 5. je prikazana opća sinteza tripeptida s benziloksikarbonil zaštitnom skupinom na *N*-terminalnom kraju koji sadrže sve tri kombinacije aminokiselinske sekvence (FFA, FAF I AFF). Najvažniji korak je aktivirati jednu od *Z*-zaštićenih aminokiselina prevođenjem u aktivni ester, npr. *N*-hidroksisukcinimidni ester (spojevi **24** i **33**), nakon čega slijedi kondenzacija s drugom aminokiselinom u odgovarajući dipeptidni metilni ester (**25**, **29** i **34**). Protektirani dipeptid alkalnom hidrolizom prevede se u kiselinu (**26**, **30** i **35**) koja zatim kondenzacijom (uz DCC) sa sljedećom odgovarajućom aminokiselinom daje tripeptid (**27**, **31** i **36**). Njegovom amonolizom nastaje odgovarajući tripeptid sa benziloksikarbonilom na *N*-terminalnom i amidom na *C*-terminalnom kraju (**28**, **32** i **37**).



Shema 5. Reagensi: a) CH_2Cl_2 ; b) 1M LiOH zatim HCl; c) DCC, DMAP, Et_3N , CH_2Cl_2 ; d) NH_3/MeOH .

4.2. Gelirajuća svojstva tripeptidnih derivata

Ispitana su gelirajuća svojstva pripremljenih tripeptida u vodi, organskim otapalima i smjesama različitih otapala. Efikasnost pojedinog gelatora izražena je kao maksimalan volumen (V_{\max} / ml) otapala ili smjese otapala koju može izgelirati 10 mg određenog spoja (Tablica 3-6). U literaturi se to često naziva *minimalna gelatorska koncentracija*, a definira se kao najmanja koncentracija gelatora u otopini pri kojoj dolazi do stvaranja gela. Nastali gelovi uglavnom su stabilni kroz više mjeseci te pokazuju termoreverzibilne sol-gel prijelaze.

Među novosintetiziranim acetilnim derivatima tripeptida, efikasnim gelatorima vode, polarnih i aromatskih otapala pokazali su se acetilni tripeptidi s aminokiselinskom sekvencom FFA. Ostali sintetizirani acetilni tripeptidi su pokazali izrazito slaba gelirajuća svojstva.

Acetilni tripeptid **5** (Ac-Phe-Phe-Ala-OMe) i **6** (Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂) su se pokazali kao efikasni gelatori vode, polarnih i aromatskih otapala. Topljivost navedenih spojeva može se predvidjeti matematičkim vrijednostima particijskog koeficijenta (logP). Particijski koeficijent (P) je ravnotežni omjer koncentracija spoja u smjesi dvaju otapala koja se ne miješaju. Najčešće se od otapala koristi voda i n-oktanol. Definiran je kao particijski koeficijent molekule između n-oktanola i vode. N-oktanol je tekući alkohol koji se ne miješa (topi) u vodi. On je stoga više “masnijeg” karaktera i svojim svojstvima djelomično oponaša staničnu membranu. Kada izmiješamo neku tvar u jednakim omjerima n-oktanola i vode, tvar će se otopiti i u jednoj i u drugoj tekućini. No, u kojoj mjeri će biti ta tvar otopljena u svakoj tekućini ovisit će o svojstvima te tvari. Ako tvar više voli biti u “masnijem” mediju (lipofilna), bolje će se otopiti u n-oktanolu, odnosno više ćemo molekula tvari naći u njemu. Ako više voli vodu (hidrofilna), više molekula će se rasporediti u vodenom dijelu.

Tripeptidni metilni ester **5** je lipofilan na što ukazuje vrijednost particijskog koeficijenta (logP= 1,34) i zbog toga efikasno gelira aromatska otapala i dekalin. Vrijednost particijskog koeficijenta amida **6** je niža (logP = 0,47) i on je hidrofilniji te je dobar gelator vode i polarnih otapala (Tablica 3.). No važno je spomenuti da se i metilni ester **5** dužim zagrijavanjem otapa u vodi i pritom gelira vodu sa smanjenom efikasnošću u odnosu na amid **6**.

Tablica 3. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{\max}) izgeliranog otapala (u mL) s 10 mg pripremljenih acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom **FFA**.

Otapalo	V_{\max} / mL	
	5	6
H ₂ O	2,44 mutan gel	4,31 mutan gel
DMSO	topljivo	topljivo
DMSO + H ₂ O	0,16 (DMSO) + 6,33 (H ₂ O) mutan gel	0,48 (DMSO) + 0,77 (H ₂ O) mutan gel
DMF	topljivo	topljivo
THF	0,91 proziran gel	7,95 proziran gel
MeOH	topljivo	0,60 mutan gel
MeOH + H ₂ O	topljivo	0,60 (MeOH) + 1,80 (H ₂ O) mutan gel
EtOH	topljivo	0,94 proziran gel
EtOH + H ₂ O	topljivo	1,10 (EtOH) + 1,30 (H ₂ O) proziran gel
MeCN	1,85 mutan gel	3,15 opalescentan gel
EtOAc	3,72 opalescentan gel	netopljivo
CH ₂ Cl ₂	topljivo	netopljivo
CHCl ₃	topljivo	netopljivo
cikloheksan	netopljivo	netopljivo
Toluene	3,77 (5,66) proziran gel	netopljivo
<i>o</i> -ksilen	5,61 proziran gel	netopljivo
<i>m</i> -ksilen	4,89 proziran gel	netopljivo
<i>p</i> -ksilen	4,25 proziran gel	netopljivo
Dekalin	10,63 opalescentan gel	netopljivo
Tetralin	1,02 proziran gel	netopljivo
±2-oktanol	2,31 opalescentan gel	2 mL Gusta viskozna tekućina (t,v,s.=turbid viscous solution)

Acetilni derivati s ostalim aminokiselinskim sekvencama, FAF i AFF su pokazali izrazito slaba gelirajuća svojstva (Tablica 4.) što upućuje na važnost položaja fenilalanina odnosno

Phe-Phe sekvence u tripeptidu za bolja gelirajuća svojstva. Frederix i ostali su istraživali utjecaj svih mogućih aminokiselinskih sekvenci na gelirajuća svojstva tripeptida te su računalno i eksperimentalno potvrdili da aromatske aminokiseline, kao i fenilalanin u stvaranju gelskih agregata favoriziraju položaj 1 i 2 u odnosu na *N*-terminalni kraj peptida.⁷²

Tablica 4. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{\max}) izgeliranog otapala (u ml) s 10 mg pripremljenih acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskim sekvencama **FAF** i **AFF**.

Otapalo	V_{\max} / mL	
	11	17
H ₂ O	netopljivo	netopljivo
DMSO	topljivo	topljivo
DMSO + H ₂ O	topljivo	0,88 (DMSO) + 0,44 (H ₂ O) opalescentan
DMF	topljivo	topljivo
THF	netopljivo	netopljivo
MeOH	topljivo	taloži
MeOH + H ₂ O	taloži	taloži
EtOH	topljivo	topljivo
EtOH + H ₂ O	taloži	taloži
MeCN	djelomično topljivo	netopljivo
EtOAc	netopljivo	netopljivo
CH ₂ Cl ₂	netopljivo	netopljivo
CHCl ₃	netopljivo	netopljivo
cikloheksan	netopljivo	netopljivo
Toluene	netopljivo	netopljivo
<i>o</i> -ksilen	netopljivo	netopljivo
<i>m</i> -ksilen	netopljivo	netopljivo
<i>p</i> -ksilen	netopljivo	netopljivo
Dekalin	netopljivo	netopljivo
Tetralin	2,72 proziran gel	netopljivo
±2-oktanol	netopljivo	netopljivo

Tripeptid **11** (Ac-Phe-Ala Phe-NH₂) gelira samo tetralin dok tripeptid **18** (Ac-Ala-Phe-Phe-NH₂) gelira samo smjesu otapala DMSO-H₂O.

Tablica 5. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{\max}) izgeliranog otapala (u ml) s 10 mg pripremljenih butirilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencijom **FFA**.

Otapalo	V_{\max} / mL	
	22	23
H ₂ O	netopljivo	netopljivo
DMSO	topljivo	topljivo
DMSO + H ₂ O	taloži	0,49 (DMSO) + 0,49 (H ₂ O) mutan gel
DMF	topljivo	topljivo
THF	netopljivo	netopljivo
MeOH	topljivo	topljivo
MeOH + H ₂ O	taloži	taloži
EtOH	topljivo	1,1 mutan gel
EtOH + H ₂ O	taloži	taloži
MeCN	taloži	netopljivo
EtOAc	1,1 opalescentan gel	netopljivo
CH ₂ CL ₂	netopljivo	netopljivo
CHCl ₃	netopljivo	netopljivo
cikloheksan	netopljivo	netopljivo
Toluene	netopljivo	netopljivo
<i>o</i> -ksilen	netopljivo	netopljivo
<i>m</i> -ksilen	netopljivo	netopljivo
<i>p</i> -ksilen	netopljivo	netopljivo
Dekalin	netopljivo	netopljivo
Tetralin	netopljivo	netopljivo
±2-oktanol	netopljivo	netopljivo

Lipofilni butirilni tripeptidi su pokazali slaba gelirajuća svojstva.

Spoj **22** ($\log P = 2,14$) gelira samo etil-acetat dok spoj **23** ($\log P = 1,49$) gelira etanol i smjesa otapala, EtOH-H₂O i DMSO-H₂O.

Tablica 6. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{\max}) izgeliranog otapala (u ml) s 10 mg pripremljenih Z-zaštićenih derivata tripeptida s aminokiselinskim sekvencama **FFA**, **FAF** i **AFF**.

Otapalo	V_{\max} /mL		
	28	32	37
H ₂ O	netopljivo	netopljivo	netopljivo
DMSO	topljivo	topljivo	topljivo
DMSO + H ₂ O	0,97 (DMSO) + 6 (H ₂ O) mutan gel	taloži	taloži
DMF	topljivo	topljivo	topljivo
THF	taloži	topljivo	taloži
MeOH	taloži	topljivo	taloži
MeOH + H ₂ O	taloži	taloži	taloži
EtOH	taloži	topljivo	netopljivo
EtOH + H ₂ O	taloži	taloži	netopljivo
MeCN	3,41 opalescentan gel	3,17 opalescentan gel	netopljivo
EtOAc	netopljivo	netopljivo	netopljivo
CH ₂ CL ₂	netopljivo	netopljivo	netopljivo
CHCl ₃	netopljivo	netopljivo	netopljivo
cikloheksan	netopljivo	netopljivo	netopljivo
Toluene	netopljivo	netopljivo	netopljivo
<i>o</i> -ksilen	13,63 proziran gel	9 proziran gel	14,58 proziran gel
<i>m</i> -ksilen	14,31 proziran gel	20,83 proziran gel	netopljivo
<i>p</i> -ksilen	netopljivo	18,75 proziran gel	netopljivo
Dekalin	12,3 proziran gel	35,52 proziran gel	13,46 neproziran gel
Tetralin	6,15 proziran gel	6,25 proziran gel	13,46 opalescentan gel
±2-oktanol	netopljivo	netopljivo	netopljivo

Lipofilni tripeptidi sa s benziloksikarbonil zaštitnom skupinom na *N*-terminalnom kraju ($\log P = 2,74$) su jako efikasni gelatori aromatskih otapala (*o*-, *m*- i *p*-ksilena i tetralina) te osobito dekalina. Od polarnih otapala tripeptidi **28** i **32** geliraju acetonitril te **28** gelira smjesu DMSO-H₂O. Zanimljivo je istaknuti tripeptid **32** koji gelira velike volumene *m*-ksilena i dekalina (supergelator).

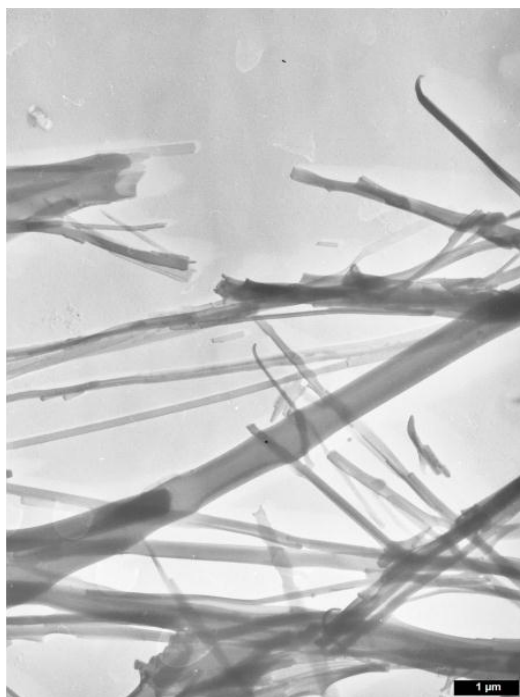
4.3. Morfologija gelskih niti utvrđena TEM mikroskopijom

Elektronska mikroskopija (TEM i SEM) te mikroskopija atomskih sila (AFM) su vrlo efikasne metode za ispitivanje morfologije nano-materijala. Elektronski mikroskopi koriste snop elektrona kojima je valna dužina oko 10^5 puta manja od valne dužine svjetla te im je povećanje znatno veće od svjetlosnog mikroskopa. Morfologiju gelske mreže ispitali smo sa transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). Kod TEM-a slika se generira od elektrona koji prolaze kroz uzorak. Budući da organski spojevi slabo zaustavljaju ili otklanjaju elektrone, uzorci su kontrastirani sa pWk (kalijeva sol poliwolframfosforne kiseline) ili sjenčani sa paladijem ili platinom. Danas se TEM-om može postići razlučenje do 0.1 nm i povećanje do 10^6 .

Gelska mreža može biti vrlo raznolike strukture. Može se sastojati od niti, traka, tubula ali ponekad je i vezikularne strukture. Česte su i nakupine niti. Niti ili trake mogu biti ravne ili uvinute, međusobno statistički ispreplete u prostoru, ali mogu biti i račvaste. Širina im je najčešće od 10 do stotinjak nanometara, ali nalazimo i strukture mikrometarskih dimenzija. Morfologija gelske mreže ima znatan utjecaj na čvrstoću i stabilnost gela. Uvjetovana je najviše strukturom gelatora te utjecajem otapala na njegovu samoorganizaciju. Pored toga promjene mogu nastati i zbog nekih vanjskih utjecaja, kao što je starost gela, brzina ili temperatura hlađenja, koncentracija, rotacija ili dodatak aditiva.

4.3.1. Acetilni derivati tripeptida

Tripeptid **6** se u polarnim otapalima (voda, etanol, metanol, acetonitril) slično samoorganizira (trake i niti sličnih dimenzija). TEM mikroskopija potvrdila je prisutnost gelske mreže koja se sastoji od izduženih niti i traka nanometarskih dimenzija i duljine niti u mikrometrima. TEM mikrografije hidrogela **6** ukazuju na smjesu ravnih niti i traka promjera 50-500 nm i duljine desetak mikrometara što znači da je preferirana linerana agregacija molekula u gelu (Slika 22.).



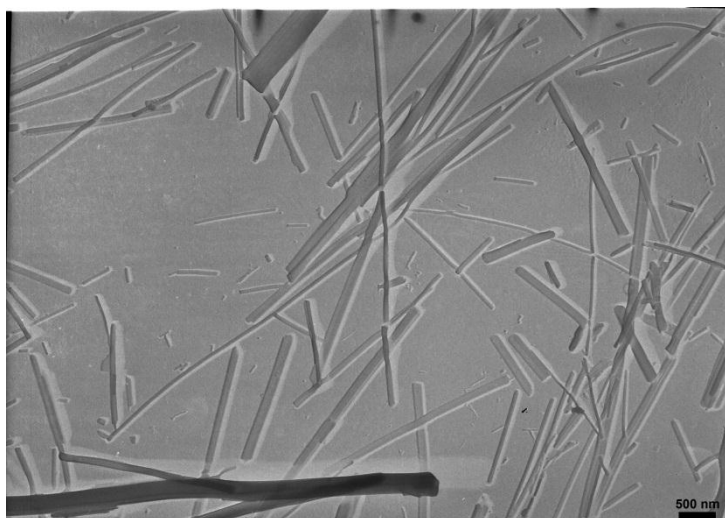
a)



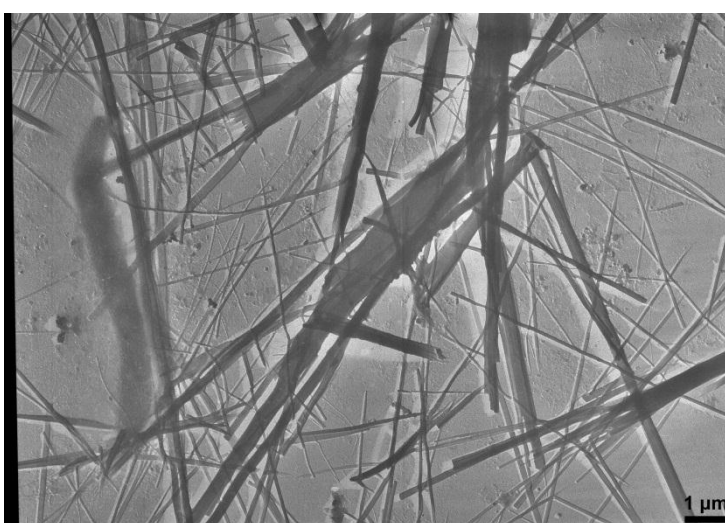
b)

Slika 22. TEM mikrografije hidrogela **6**: a) kontrastiranog s pWk, b) sjenčanog paladijem.

Strukture gelskih mreža **6**/DMSO-H₂O i **6**/CH₃CN gelova su vrlo slične. Sastoje se od ravnih traka i niti promjera 60-250 nm (Slika 23).



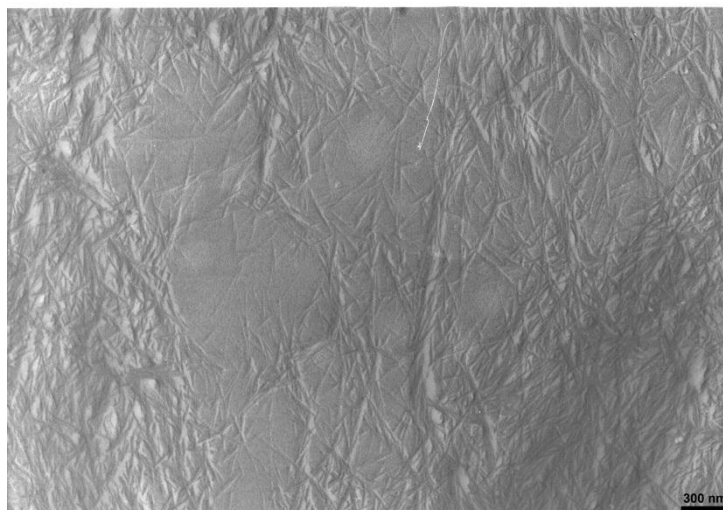
a)



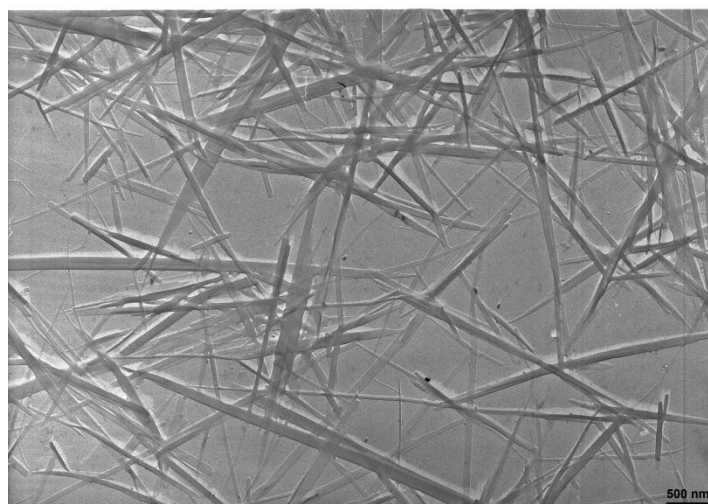
b)

Slika 23. TEM mikrografije gelova **6** (sjenčano paladijem) u a) DMSO-H₂O i b) CH₃CN.

Spoj **6** u etanolu stvara čvrst, stabilan i proziran gel. TEM mikrografije gela u etanolu pokazuju prisustvo tankih niti promjera 15 nm koje se uglavnom nalaze u nakupinama promjera 50-100 nm (Slika 24a.). Spoj **6** gelira i smjesu vode i etanola pri čemu se takva gelska mreža sastoji od ravnih traka promjera 50-250 nm (Slika 25b.)



a)

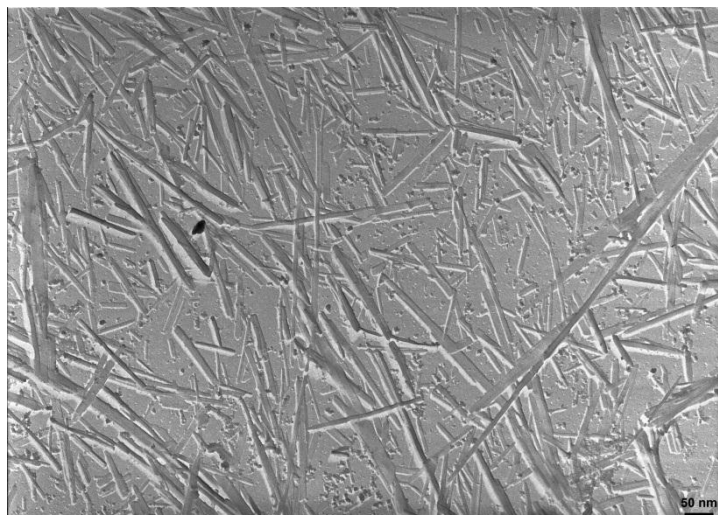


b)

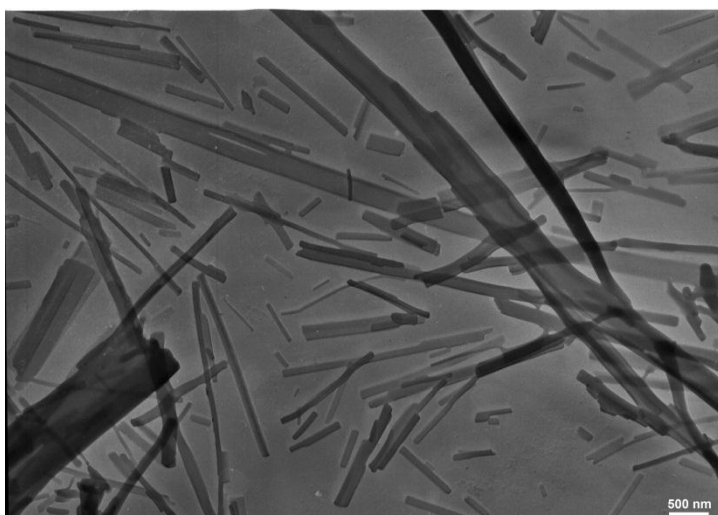
Slika 24. TEM mikrografije gela **6** (sjenčano paladijem) u a) etanolu i b) smjesi etanola i vode.

6 u metanolu tvori štapičaste niti promjera 10-30 nm te različitih duljina (60-700 nm) dok u smjesi metanola i vode nastaje gelska mreža koja se sastoji od kratkih štapičastih niti promjera 20-60 nm i širokih traka promjera 200-600 nm (Slika 25.)

Iz priloženog se uočava da se je morfologija gelova tripeptida **6** slična u polarnim otapalima te se povećanjem polarnosti povećava udio traka kao i njihova širina.



a)

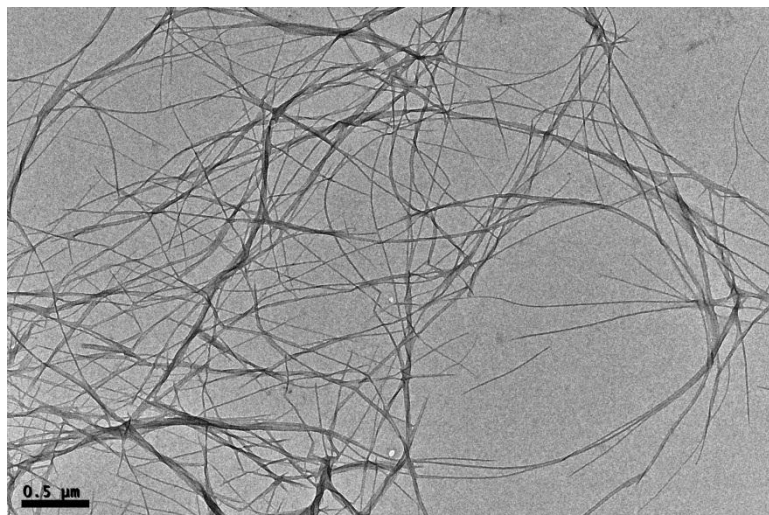


b)

Slika 25. TEM mikrografije gela **6** (sjenčano paladijem) u a) metanolu i b) smjesi metanola i vode.

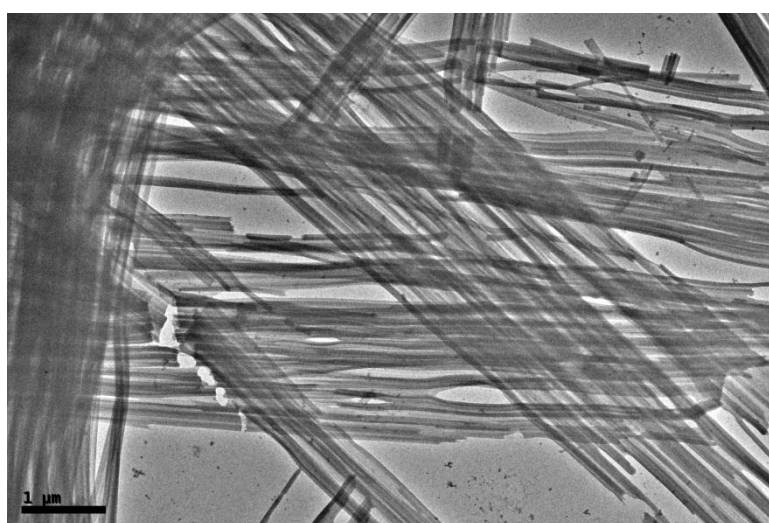
Metilni ester **5** je lipofilniji gelator od amida **6** i efikasno gelira aromatska otapala (*o*-, *m*- i *p*-ksilen) te dekalin.

5 gelira dvostruko manji volumen vode no nastali hidrogel je jako stabilan. Zanimljivo je da je TEM pokazao drugačiju morfologiju gelske mreže u vodi za razliku od amida. Ona se sastoji od isprepletenih i savijenih tankih niti promjera 5-20 nm (Slika 26.).



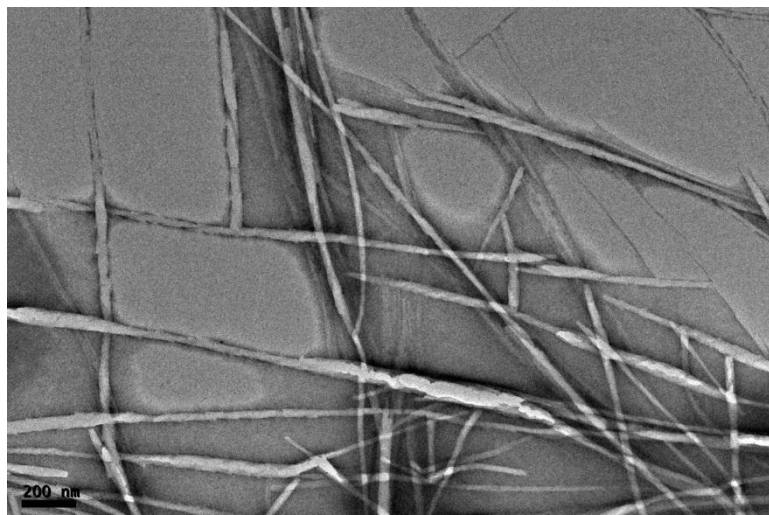
Slika 26. TEM mikrografija hidrogela **5** (sjenčano s Pt).

TEM mikrografija gela **5** u acetonitrilu pokazuje prisutnost mreže ravnih slijepljenih niti višeslojne strukture promjera 30-50 nm (Slika 27.)



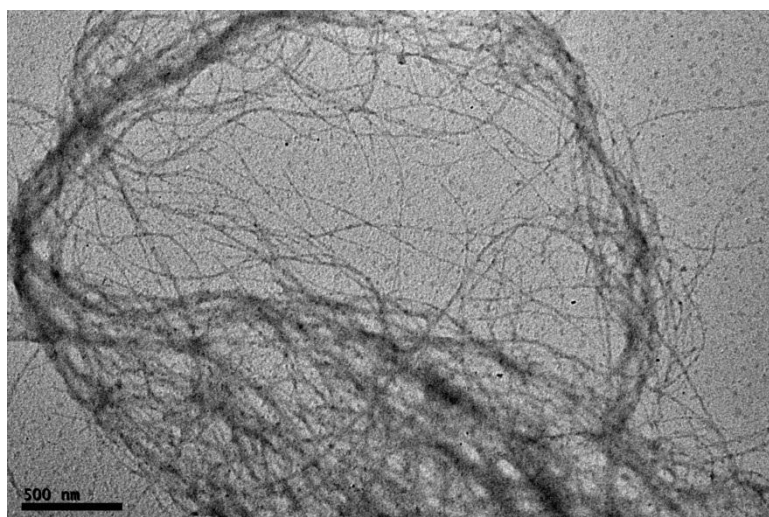
Slika 27. TEM mikrografija gela **5** u acetonitrilu (kontrastirano s pWk).

Od polarnih otapala, **5** gelira i etil-acetat. Gelska mreža **5** u etil-acetatu sastoji se od traka promjera 20-70 nm (Slika 28.) Manjim dijelom su prisutne uzvojite niti što upućuje da je došlo do prijenosa kiralne organizacije od molekule na gelski agregat.



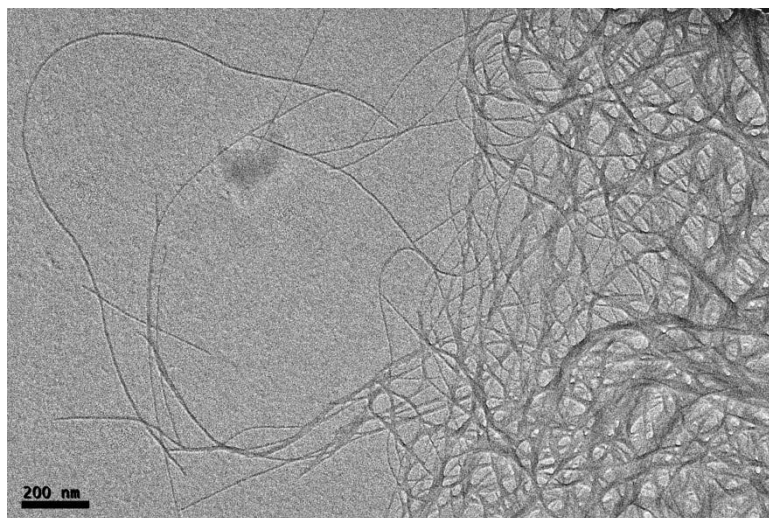
Slika 28. TEM mikrografija gela **5** u etil-acetatu (kontrastirano s pWk).

Metilni ester, **5** se u aromatskim otapalima slično organizira. Gelska mreža **5** u *o*-ksilenu sastoji se od tankih, savitljivih i međusobno isprepletenih niti promjera 10-50 nm te nakupina promjera oko 200 nm (Slika 29.)



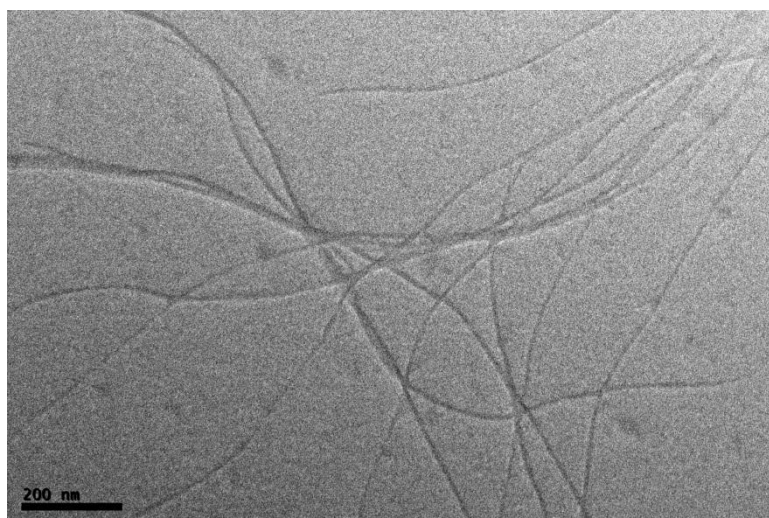
Slika 29. TEM mikrografija gela **5** u *o*-ksilenu (sjenčano s Pt).

Gel **5** u *m*-ksilenu ukazuje na prisutnost vrlo tankih fleksibilnih niti promjera oko 5 nm koje se međusobno sljepljuju u veće nakupine promjera oko 50 nm i pritom čine gustu gelsku mrežu (Slika 30.)



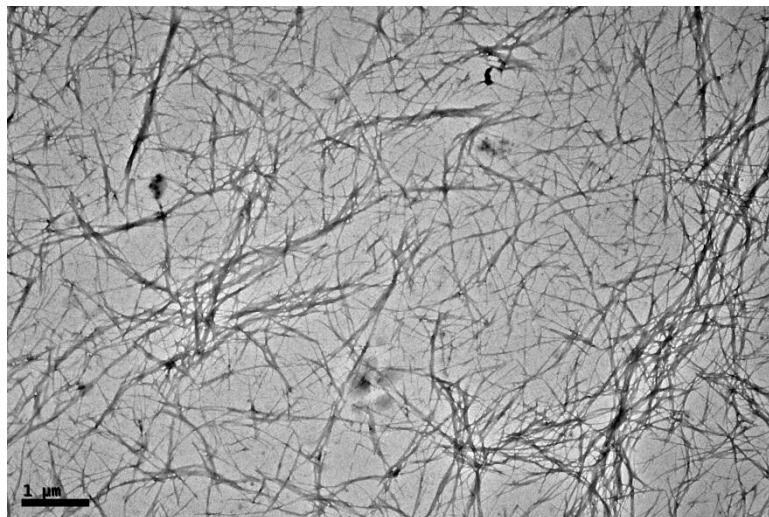
Slika 30. TEM mikrografija gela **5** u *m*-ksilenu (sjenčano s Pt).

Gelska mreža **5** u *p*-ksilenu sastoji se od tankih i fleksibilnih niti relativno uniformnog promjera 6 nm (Slika 31.).



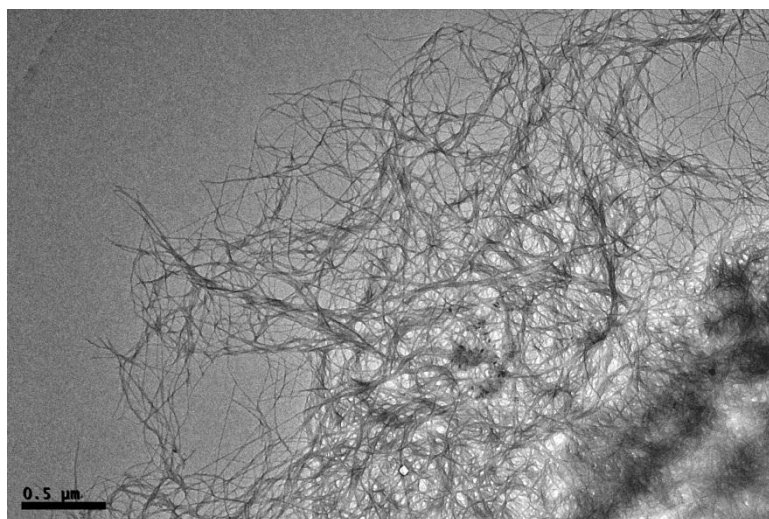
Slika 31. TEM mikrografija gela **5** u *p*-ksilenu (sjenčano s Pt).

Spoj **5** efikasno gelira dekalin (dekahidronaftalen, cis + trans). Mreža dekalinskog gela sastoji se od niti promjera 20-40 nm međusobno isprepletenih u nakupine promjera 70-100 nm (Slika 32.)



Slika 32. TEM mikrografija gela **5** u dekalinu (sjenčano s Pt).

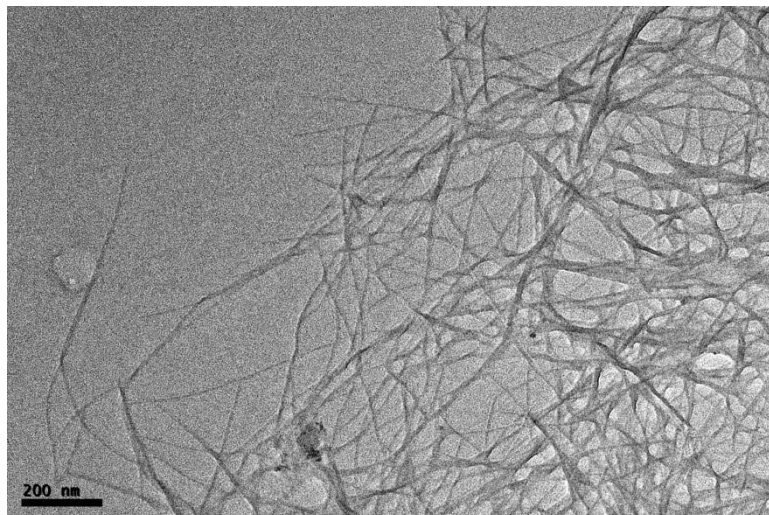
Spoj **5** gelira i mali volumen tetralina (1 mL) u kojem se samoorganizira u tanke fleksibilne niti promjera 10 nm međusobno isprepletene u gustu gelsku mrežu (Slika 33.)



Slika 33. TEM mikrografija gela **5** u tetralinu (sjenčano s Pt).

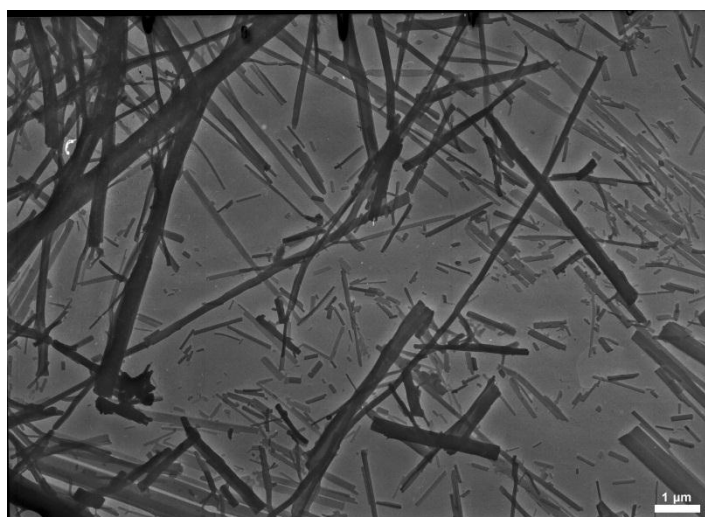
Za razliku od tripeptida **5** i **6** koji su pokazali raznolika gelirajuća svojstva, acetilni derivati tripeptida sa aminokiselinskim sekvencama FAF i AFF su vrlo slabi gelatori. Iz tog razloga određena je samo morfologija gela **11** u tetralinu i gela **17** u smjesi otapala DMSO-H₂O.

Tripeptid **11** se u tetralinu jako slično samoorganizira kao i **5**. Gusta gelska mreža se sastoji od pojedinačnih savijenih niti promjera oko 10 nm međusobno isprepletenih u vlaknaste nakupine promjera 70-120 nm (Slika 34.).



Slika 34. TEM mikrografija gela **11** u tetralinu (sjenčano s Pt).

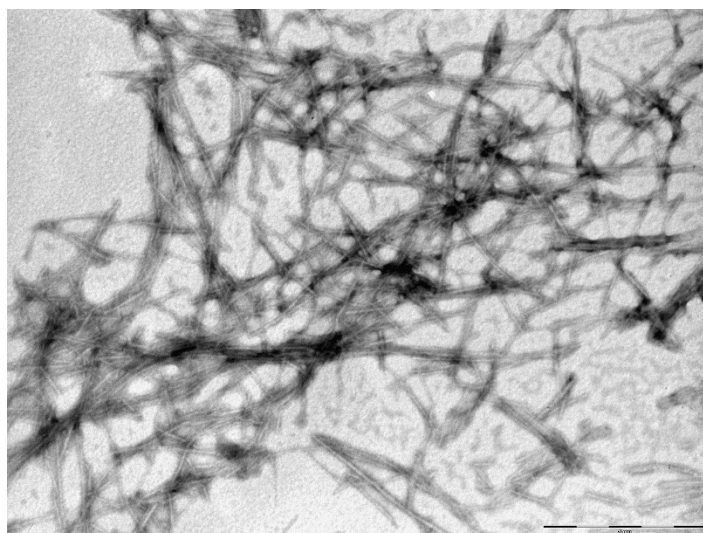
Na slici 35. prikazana je TEM mikrografija gelske mreže **17** u smjesi otapala DMSO-H₂O koja se sastoji od traka različitih promjera (30-500 nm) te različitih duljina (1-15 μm). Iz navedenog možemo zaključiti da se sva tri navedena tripeptida jako slično samoorganiziraju u smjesi otapala DMSO-H₂O.



Slika 35. TEM mikrografija gela **17** u DMSO-H₂O (sjenčano s Pd).

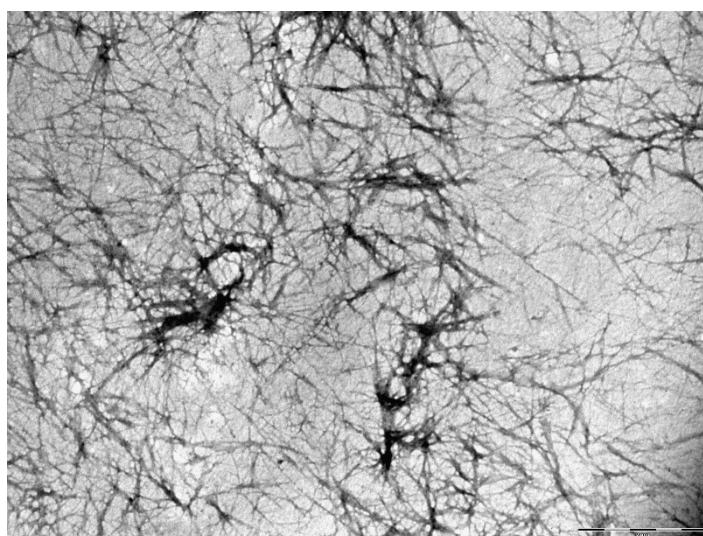
4.3.2. Butirilni derivati tripeptida

Novi butirilni derivati tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA, **22** i **23** su također pokazali slaba gelirajuća svojstva pa je zbog toga određena morfologija samo tri dobivena gela. Tripeptid **22** gelira samo mali volumen etil-acetata. U etil-acetatu gelska mreža **22** se sastoji od tankih niti promjera oko 10 nm i različitih duljina (0.2-2 μm) (Slika 36.).



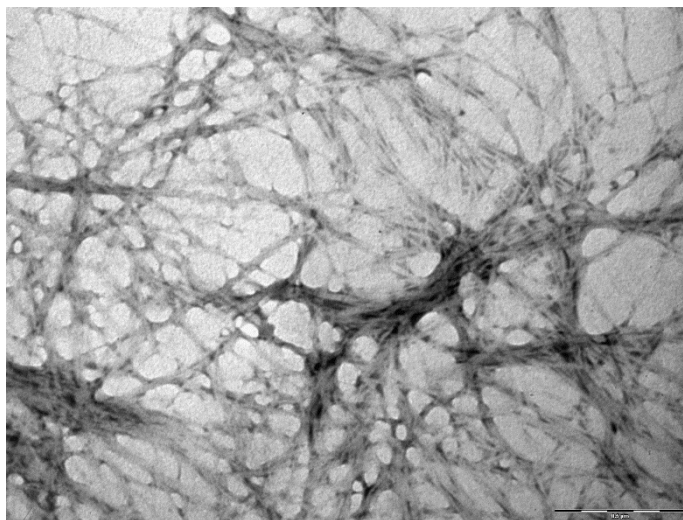
Slika 36. TEM mikrografija gela **22** u etil-acetatu (kontrastirano s pWk).

Tripeptid **23** gelira vrlo mali volumen DMSO-H₂O i etanola. U smjesi otapala DMSO-H₂O (1:1) organizira se u relativno uniformne niti promjera 10 nm koje ispreplitanjem i umrežavanjem stvaraju vlaknaste nakupine promjera 80-250 nm (Slika 37.)



Slika 37. TEM mikrografija gela **23** u DMSO-H₂O (kontrastirano s pWk).

Spoj **23** se vrlo slično samoorganizira i u etanolu u kojem su vidljive gelske niti promjera oko 15 nm koje stvaraju vlaknaste nakupine promjera 50-250 nm (Slika 38.).

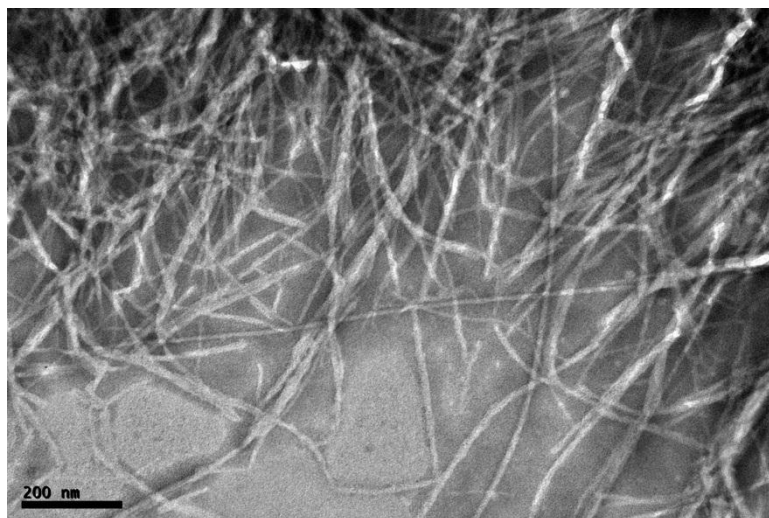


Slika 38. TEM mikrografija gela **23** u etanolu (kontrastirano s pWk).

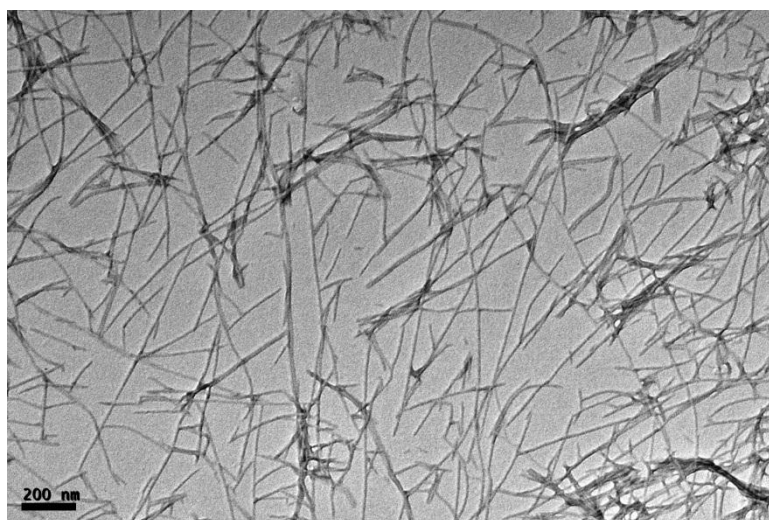
4.3.3. Z-zaštićeni derivati tripeptida

Novi tripeptidni derivati sa benziloksikarbonilom (Z) kao zaštitnom skupinom na *N*-terminalnom kraju su jako efikasni gelatori aromatskih otapala (*o*-, *m*- i *p*-ksilena i tetralina) te dekalina.

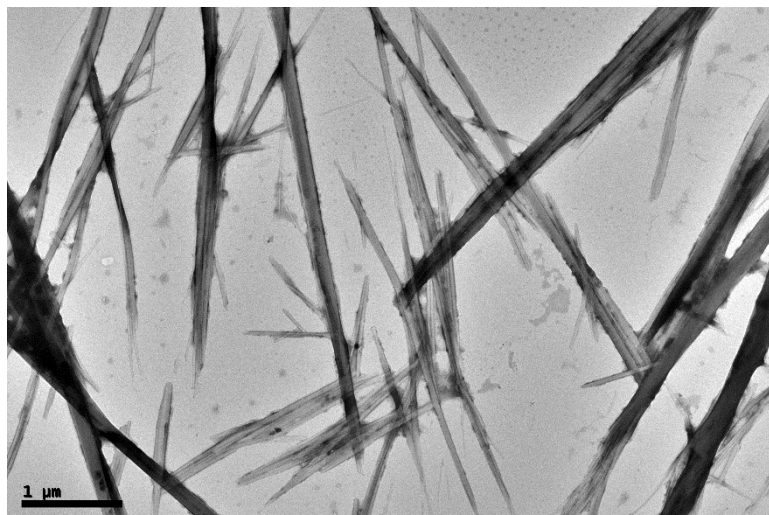
Od polarnih otapala, **28** i **32** geliraju acetonitril dok samo **28** gelira smjesu otapala DMSO-H₂O. Gelator **28** se u acetonitrilu samoorganizira u niti promjera 7-20 nm (Slika 39.) dok se gelska mreža **32** u acetonitrilu sastoji od sitnih niti promjera oko 5 nm i vlaknastih nakupina promjera 20-50 nm (Slika 40.). Kod gela **28** u smjesi otapala DMSO-H₂O zamijećen je nastanak višeslojnih traka promjera 50-200 nm (Slika 41.).



Slika 39. TEM mikrografija **28** u acetonitrilu (kontrastirano s pWk).

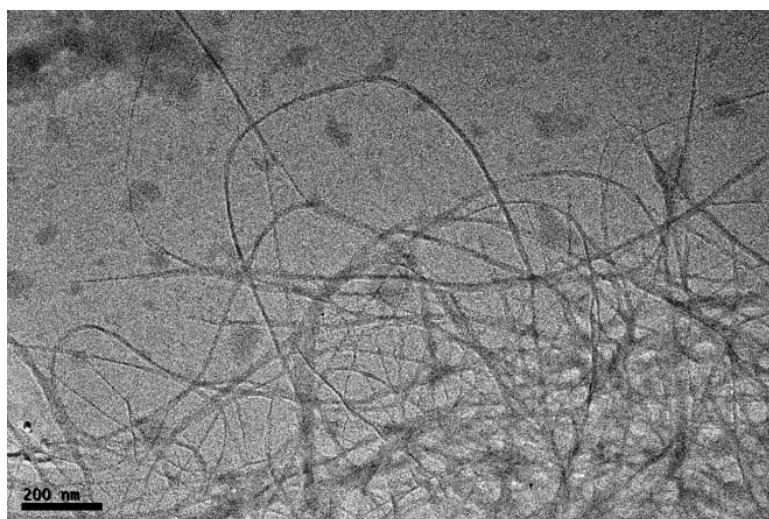


Slika 40. TEM mikrografija **32** u acetonitrilu (kontrastirano s pWk).

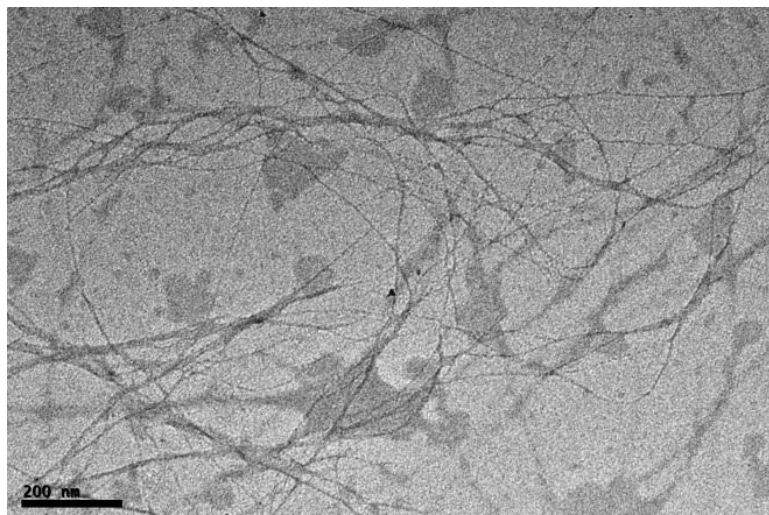


Slika 41. TEM mikrografija **28** u smjesi otapala DMSO-H₂O (kontrastirano s pWk).

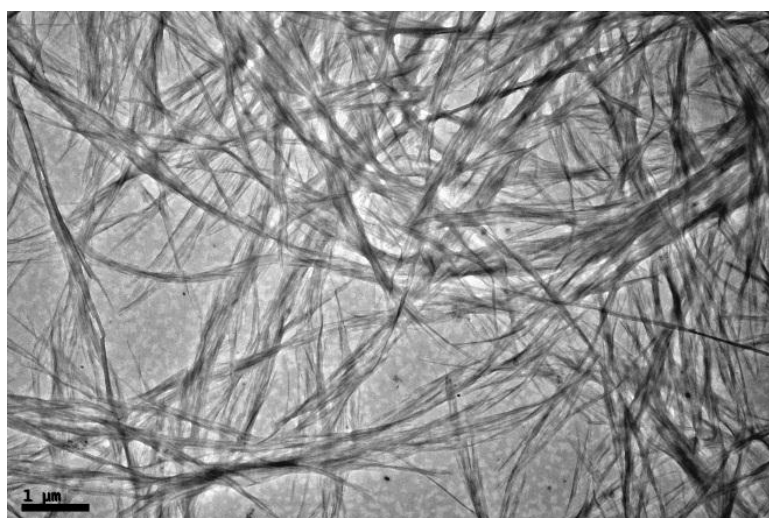
Sva tri tripeptida se slično samoorganiziraju u izomerima ksilena. U *o*-ksilenu tripeptidi stvaraju gelsku mrežu koja se sastoji od međusobno isprepletenih savitljivih niti prosječnog promjera 10 nm i vlaknastih snopova promjera 50-100 nm (Slika 42.)



a)



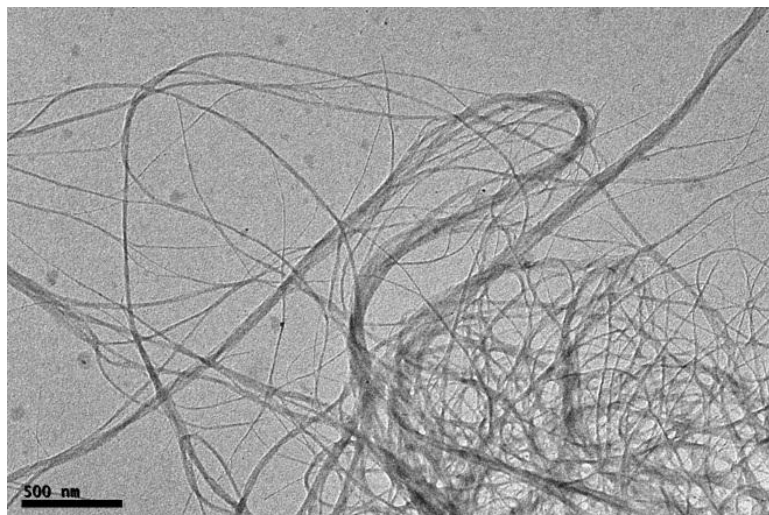
b)



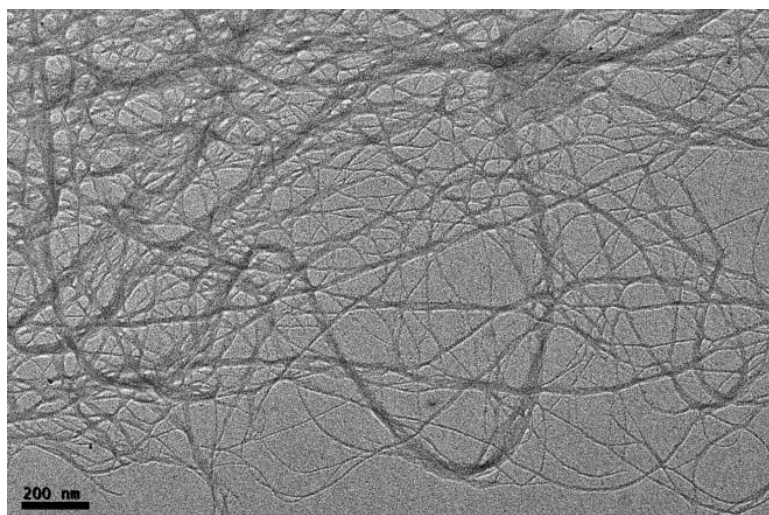
c)

Slika 42. TEM mikrografije gelova u *o*-ksilenu sjenčanih platinom za spojeve: a) **28**, b) **32** i c) **37**.

Tripeptidi **28** i **32** se slično samoorganiziraju u *m*-ksilenu. Njihove gelske mreže u *m*-ksilenu se sastoje od pojedinačnih fleksibilnih tankih niti promjera 10-20 nm koje izgledom podsjećaju na vlasi kose te od snopova niti promjera 50-70 nm što zajedno čine vrlo gustu i kompaktnu mrežu (Slika 43).



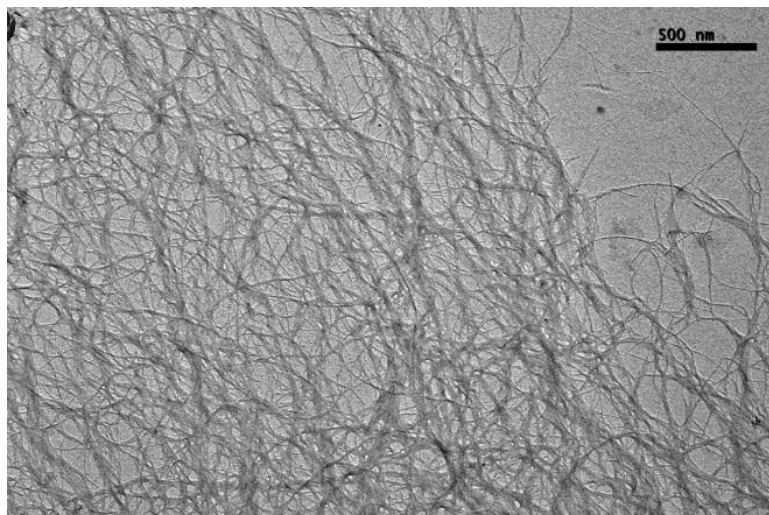
a)



b)

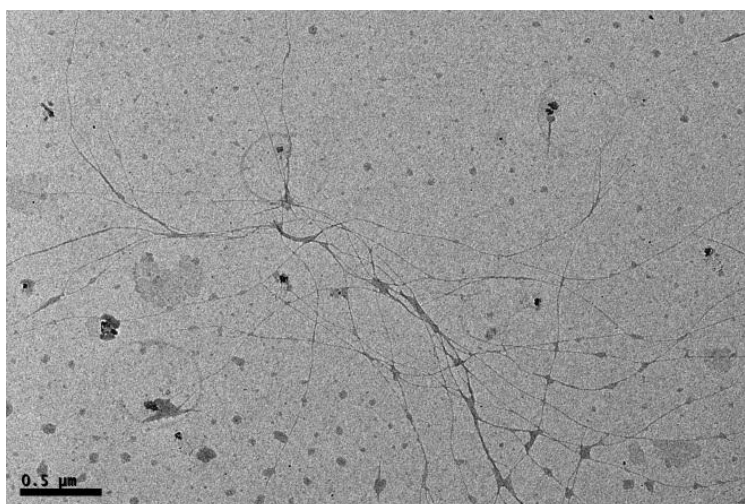
Slika 43. TEM mikrografije gelova u *m*-ksilenu sjenčanih platinom za spojeve: a) **28** i b) **32**.

Spoj **32** jedini vrlo efikasno gelira *p*-ksilen. U *p*-ksilenu su zamijećene sitne niti promjera 5-10 nm i snopovi niti promjera 20-50 nm (Slika 44.).

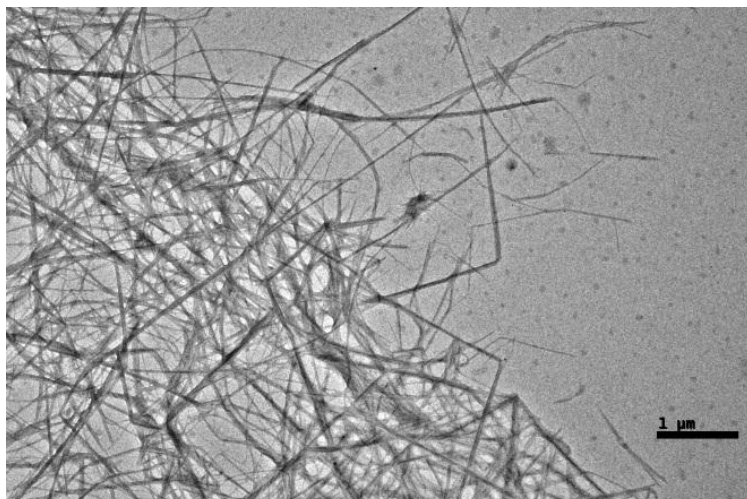


Slika 44. TEM mikrografija gela **32** u *p*-ksilenu (sjenčano s Pt).

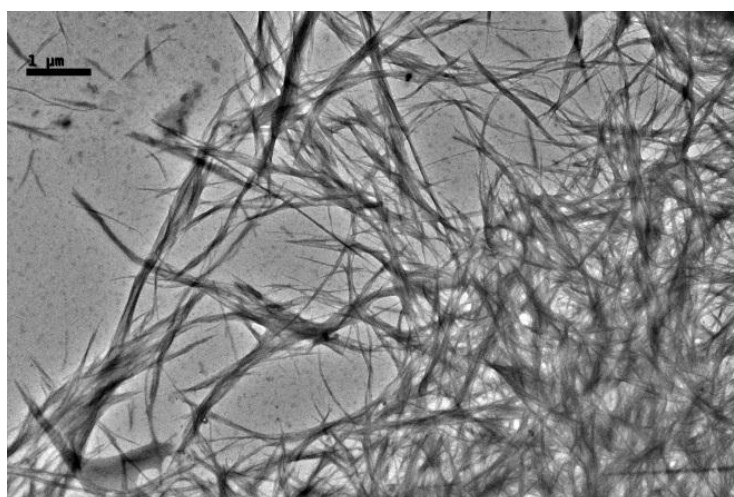
Sva tri tripeptida podjednako efikasno geliraju tetralin te se na sličan način samoorganiziraju u tetralinu. Gelska mreža **28** u tetralinu se sastoji od relativno fleksibilnih i finih niti promjera 5-7 nm koje se međusobno sljepljuju u vlaknaste snopove promjera 50 nm (Slika 45a) dok tripeptid **32** se u tetralinu samoorganizira u krute niti promjera 20 nm i sljepljene u snopove promjera oko 70 nm (Slika 45b). Gelske niti tripeptida **37** promjera 5-10 nm u tetralinu uglavnom formiraju vlaknaste snopove promjera 30-700 nm gusto pakirane u gelskoj mreži (Slika 45c).



a)



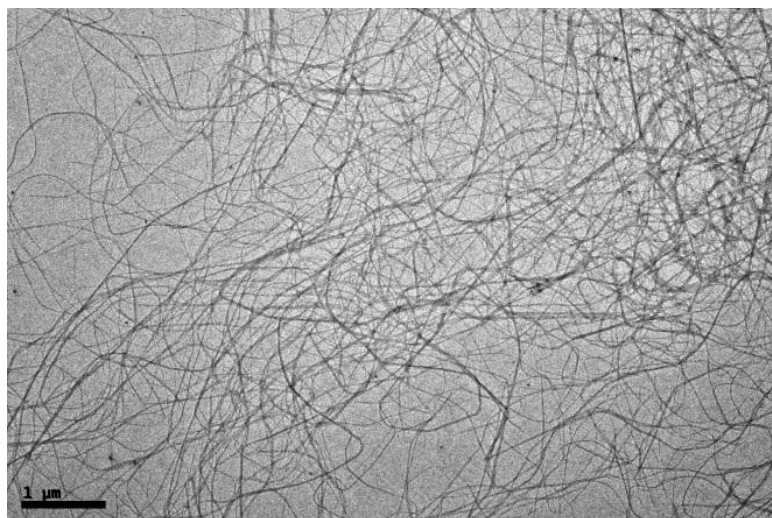
b)



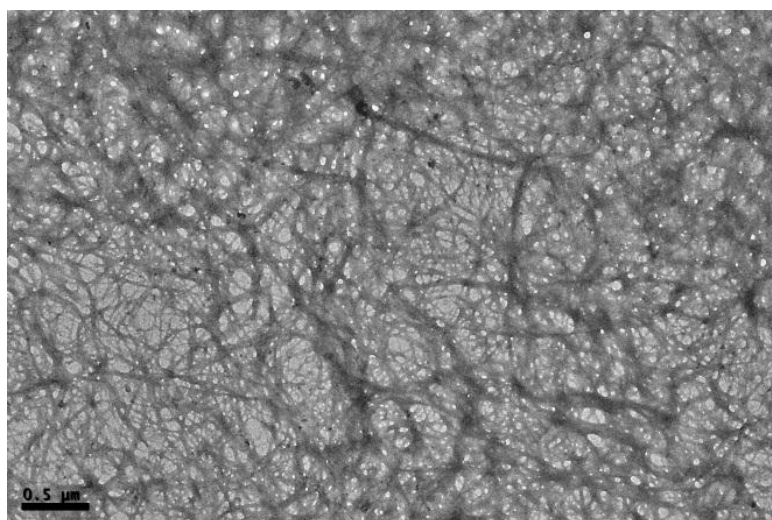
c)

Slika 45. TEM mikrografije gelova u tetralinu sjenčanih platinom za spojeve: a) **28**, b) **32** i c) **37**.

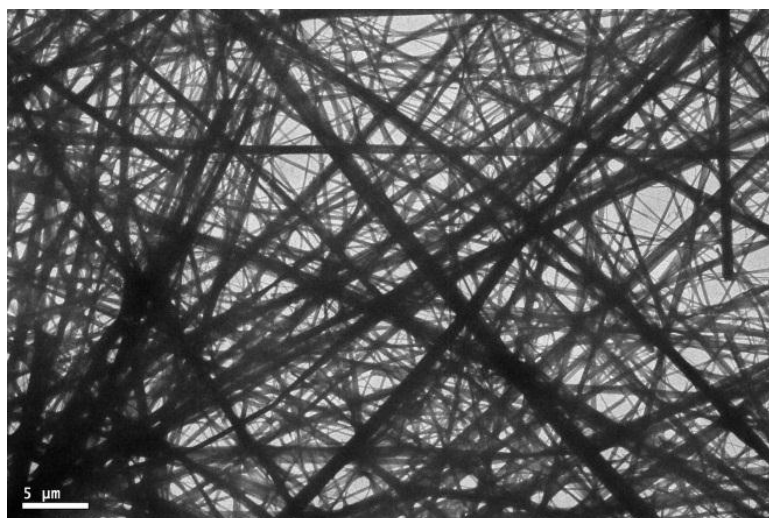
Z-zaštićeni tripeptidi su vrlo efikasni gelatori dekalina pri čemu se posebno izdvaja tripeptid **32** koji kao najefikasniji gelator dekalina imobilizira veliki volumen otapala. Mreža dekalinskog gela tripeptida **28** sastoji se od međusobno „zapetljanih“ fleksibilnih i finih niti promjera 5-10 nm (Slika 46a) dok kod tripeptida **32** možemo zamijetiti vrlo gustu i kompaktnu gelsku mrežu koja se sastoji od tankih niti promjera 10 nm i snopova niti promjera 20-70 nm (Slika 46b). Za razliku od navedenih tripeptida, **37** se u dekalinu samoorganizira u ravne trake višeslojne strukture promjera 300-1500 nm (Slika 46c).



a)



b)

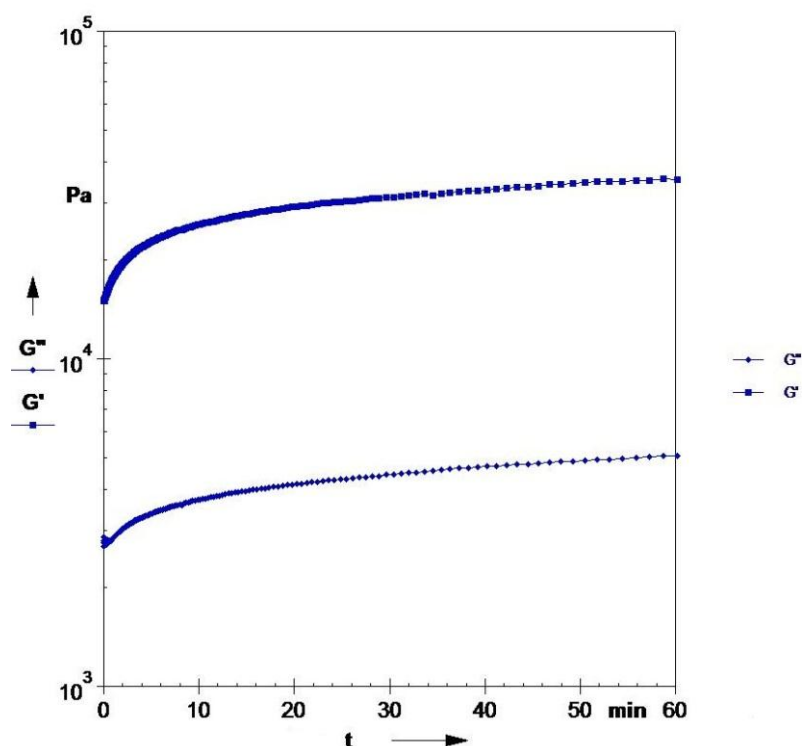


c)

Slika 46. TEM mikrografije gelova u dekalinu kontrastiranih s pWk za spojeve: a) **28**, b) **32** i c) **37**.

4.4. Reološka mjerenja hidrogela

Osnovna reološka mjerenja su pokazala da je tripeptidni hidrogel **6** umjereno čvrst viskoelastični materijal odnosno da ima slična mehanička svojstva kao i ostali mali peptidni hidrogelovi koji se upotrebljavaju u tkivnom inženjersvu.⁷³ Viskoelastično ponašanje hidrogela tripeptida **6** prikazano je na dijagramu ovisnosti dinamičkog opterećenja o vremenu (Slika 47.). Modul pohrane (G') je uz konstantno 2%-tno naprezanje 6 puta veći od modula gubitka (G'') što je pokazatelj viskoelastičnog materijala.⁷⁴



Slika 47. Ovisnost dinamičkog opterećenja o vremenu kod hidrogela tripeptida **6** (G' - modul pohrane, G'' - modul gubitka).

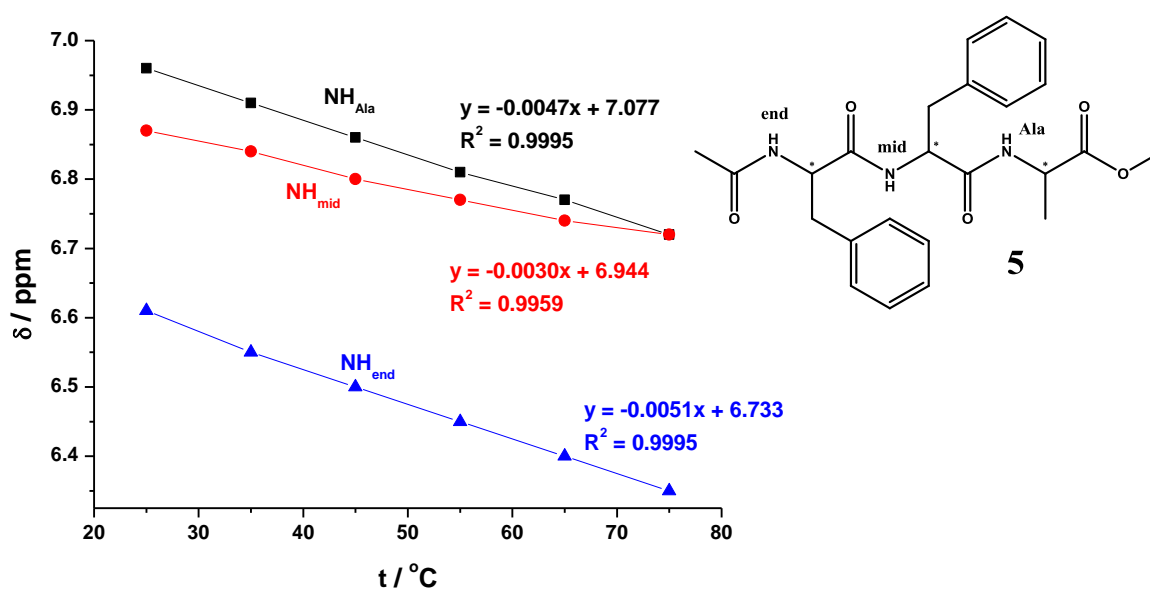
4.5. Ispitivanje supramolekularnih interakcija u gelovima

4.5.1. NMR spektroskopija

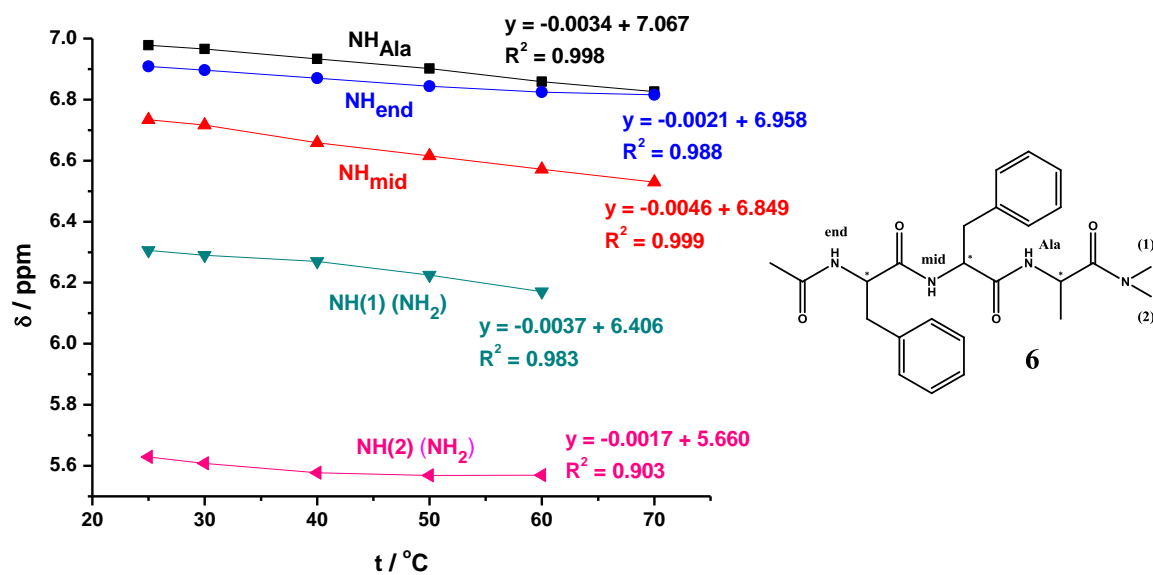
1D i 2D NMR spektroskopske metode pokazale su se kao vrlo korisne metode za razmatranje samoudruživanja molekula i praćenje supramolekularnih interakcija u otopini u u gelu.⁷⁵ U ovom poglavlju razmatrat će se kemijski pomaci različitih NH skupina tijekom grijanja gelova uslijed deagregacije gelske mreže u manje agregate, a NOESY eksperimenti će omogućiti uvid u nekovalentne interakcije između različitih skupina u tripeptidima i pomoći pri određivanju mogućeg motiva samoudruživanja.

Na slici 48. prikazana je temperaturna ovisnost kemijskih pomaka različitih NH protona gelova tripeptida **5** i **6** u d_3 -acetonitrilu. Unutar temperaturnog intervala od 25 °C do 75 °C za gel tripeptida **5** u d_3 -acetonitrilu dolazi do ukupnog kemijskog pomaka od 0.24 ppm prema višem magnetskom polju za skupinu NH_{Ala} te do ukupnog kemijskog pomaka 0.26 ppm

prema višem magnetskom polju za skupinu NH_{end} . U istom temperaturnom intervalu skupina NH_{mid} se pomiče za 0.15 ppm prema višem magnetskom polju. Nema velike razlike u nagibu pravaca ovisnosti kemijskih pomaka o temperaturi određenim za skupine NH_{Ala} i NH_{end} u gelu tripeptida **5** u d_3 -acetonitrilu (Slika 48a). Iz jednadžbe pravca vidljivo je da su nagibi pravaca za kemijske pomake skupina NH_{Ala} i NH_{end} približno jednaki te skoro dvostruko veći u odnosu na nagib pravca za skupinu NH_{mid} . Iz navedenih podataka jasno je da su skupine NH_{Ala} i NH_{end} uključene u vodikovoj vezi između molekula tripeptida **5** dok skupina NH_{mid} nije izložena otapalu i nije u vodikovoj vezi.



a)



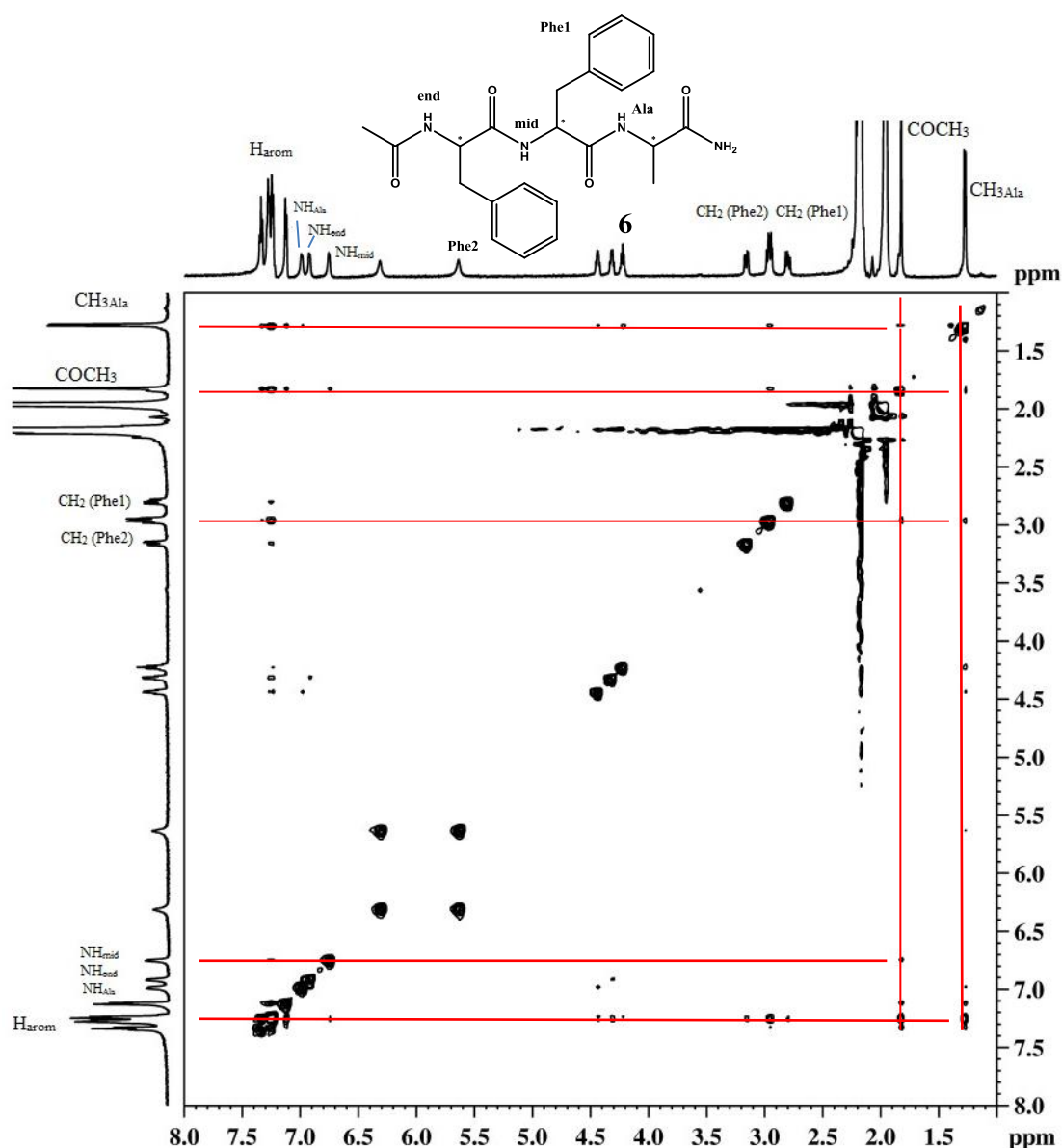
b)

Slika 48. Ovisnost promjene kemijskih pomaka o temperaturi za različite NH protone gelova u d_3 -acetonitrilu za tripeptide a) **5** i b) **6**.

Grijanjem gela tripeptida **6** u d_3 -acetonitrilu dolazi do kemijskog pomaka svih amidnih protona prema višem magnetskom polju. Vidljivo je da je u temperaturnom intervalu od 25 °C do 70 °C izrazito mali ukupni kemijski pomak prema višem magnetskom polju skupine NH_{end} ($\Delta\delta = 0.09$ ppm). Ukupni kemijski pomak skupine NH_{mid} prema višem magnetskom polju je puno veći u odnosu na skupinu NH_{end} ($\Delta\delta = 0.4$ ppm) što potvrđuje i jednadžba pravca iz koje je vidljivo da je nagib pravca za ukupni kemijski pomak skupine NH_{mid} dvostruko veći u odnosu na nagib pravca za skupinu NH_{end} (Slika 48b). Unutar temperaturnog intervala od 25 °C do 75 °C za gel tripeptida **6** u d_3 -acetonitrilu dolazi do ukupnog kemijskog pomaka od 0.14 ppm prema višem magnetskom polju za skupinu $NH(1)$ te do izrazito malog kemijskog pomaka od 0.06 ppm prema višem magnetskom polju za skupinu $NH(2)$. Navedeni kemijski pomaci pokazuju da su skupine NH_{Ala} , NH_{mid} i $NH(1)$ uključene u vodikovoj vezi između molekula tripeptida **6** dok skupina NH_{end} i $NH(2)$ nisu uključene u vodikovoj vezi.

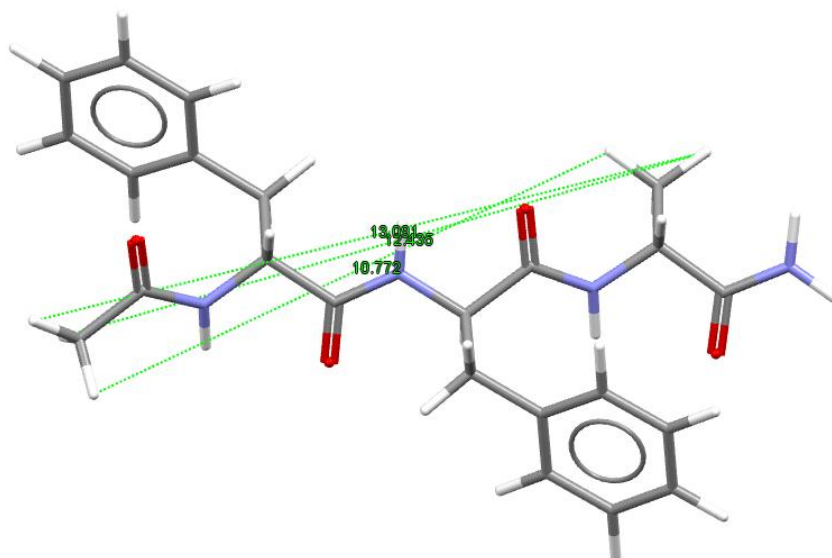
NOESY (engl. nuclear Overhauser enhancement spectroscopy) je homonuklearna tehnika koja se temelji na dipolarnom sprezanju protona kroz prostor. U NOESY spektru prisutni su

signali za dipolarno spregnute protone koji su u prostoru međusobno blizu te njihov NOE efekt je jak. NOESY spektroskopija se pokazala kao vrlo korisna metoda za određivanje intermolekulskih interakcija, posebno u slučajevima gdje nije baš jasno na koji način dolazi do samoudruživanja molekula. NOESY spektar gela **6** u d_3 -acetonitrilu prikazuje prostorne interakcije između metilne skupine alanina i sljedećih skupina: COCH_3 , CH_2 (Phe2) i H_{arom} . U NOESY spektru gela tripeptida **6** u d_3 -acetonitrilu prisutne su i prostorne interakcije između signala acetilne skupine (COCH_3) i signala skupina: CH_2 (Phe1), NH_{mid} i H_{arom} . (Slika 49.)

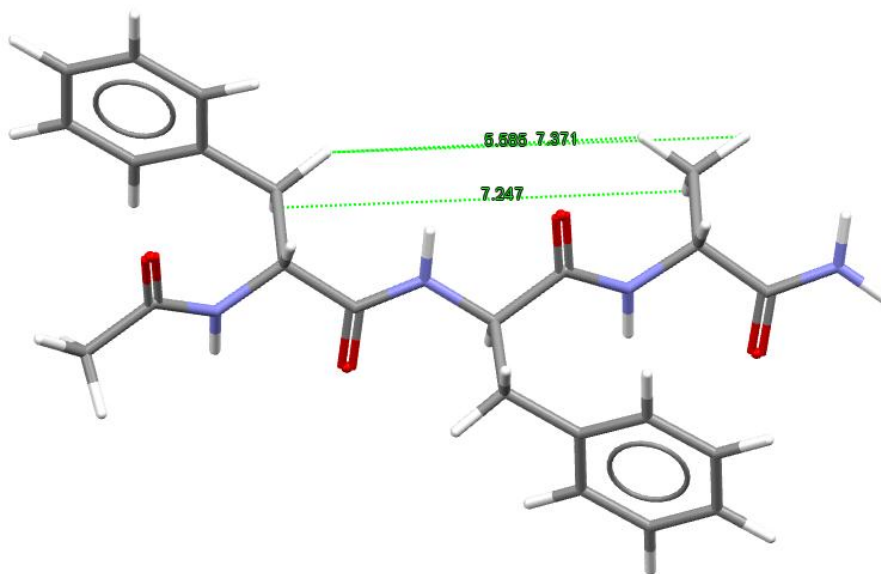


Slika 49. NOESY spektar gela tripeptida **6** u d_3 -acetonitrilu na 25 °C. Označene su intermolekularne interakcije.

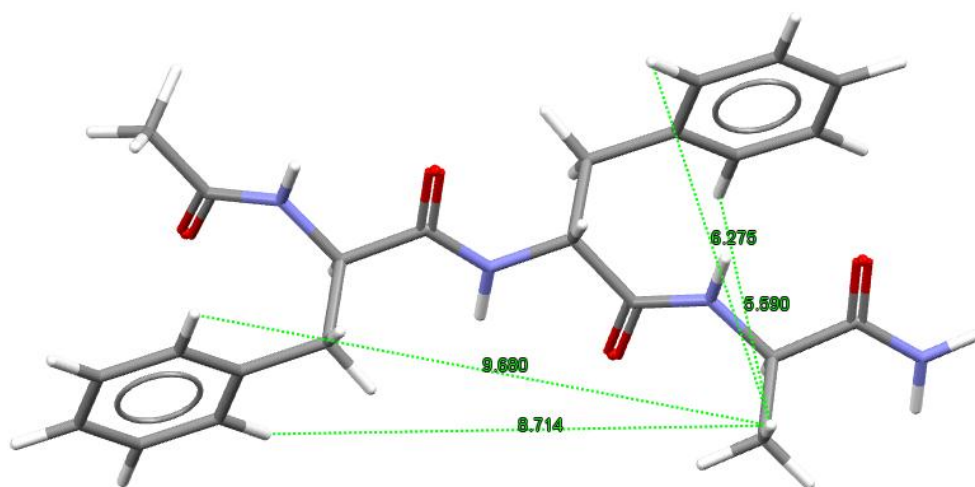
Poznato je da se u NOESY spektrima intermolekularne interakcije između različitih signala nalaze na udaljenosti manjoj od 4 Å. Kako bi se utvrdilo da li su navedene NOE interakcije intermolekularne ili intramolekularne, izmjerene su udaljenosti između navedenih skupina unutar molekule (intramolekularne udaljenosti) na minimiziranoj strukturi tripeptida **6** (Slika 50.)



a)



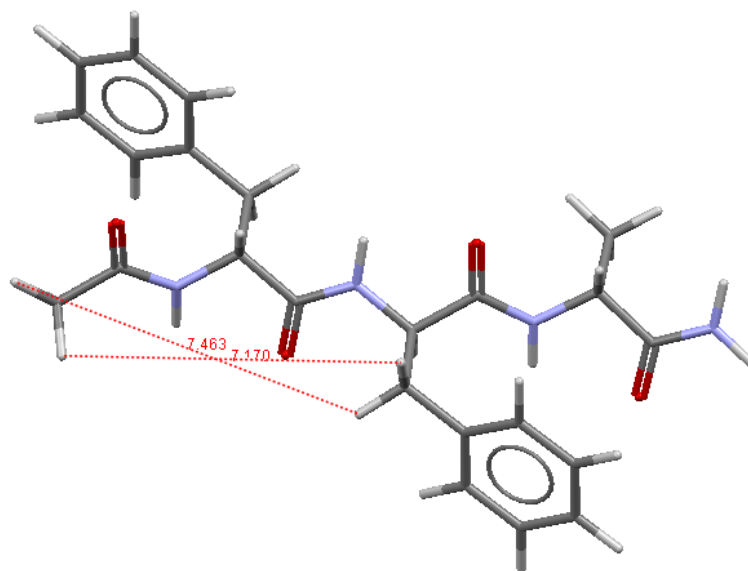
b)



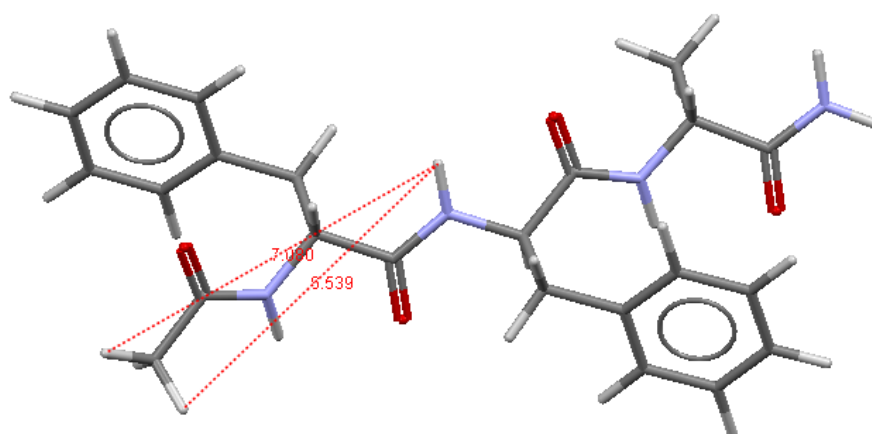
c)

Slika 50. Minimizirana struktura tripeptida **6** (struktura sa minimalnom energijom) i izračunate vrijednosti intramolekularnih udaljenosti između metilnih skupina alanina i skupina: a) COCH_3 , b) CH_2 (Phe2) i c) H_{arom} .

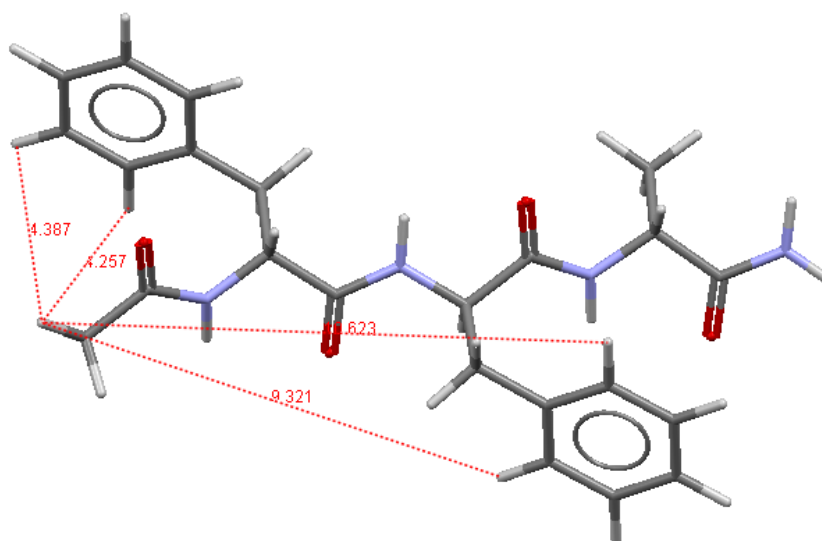
Na slici 50. je vidljivo da su izmjerene intramolekularne udaljenosti između pojedinih skupina veće od 4 Å i zbog toga se navedene NOE interakcije između metilnih skupina alanina i skupina COCH_3 , CH_2 (Phe2) i aromatskih vodika ne mogu ostvariti unutar iste molekule. Na minimiziranoj strukturi tripeptida **6** izračunate su i udaljenosti između acetilne skupine (COCH_3) i skupina CH_2 (Phe1), NH_{mid} i aromatskih vodika. Sve izračunate udaljenosti su veće od 4 Å (Slika 51.) Navedene NOE interakcije između spomenutih skupina ne mogu se ostvariti unutar iste molekule nego između molekula tripeptida **6** u acetonitrilnom gelu (intermolekularne interakcije).



a)



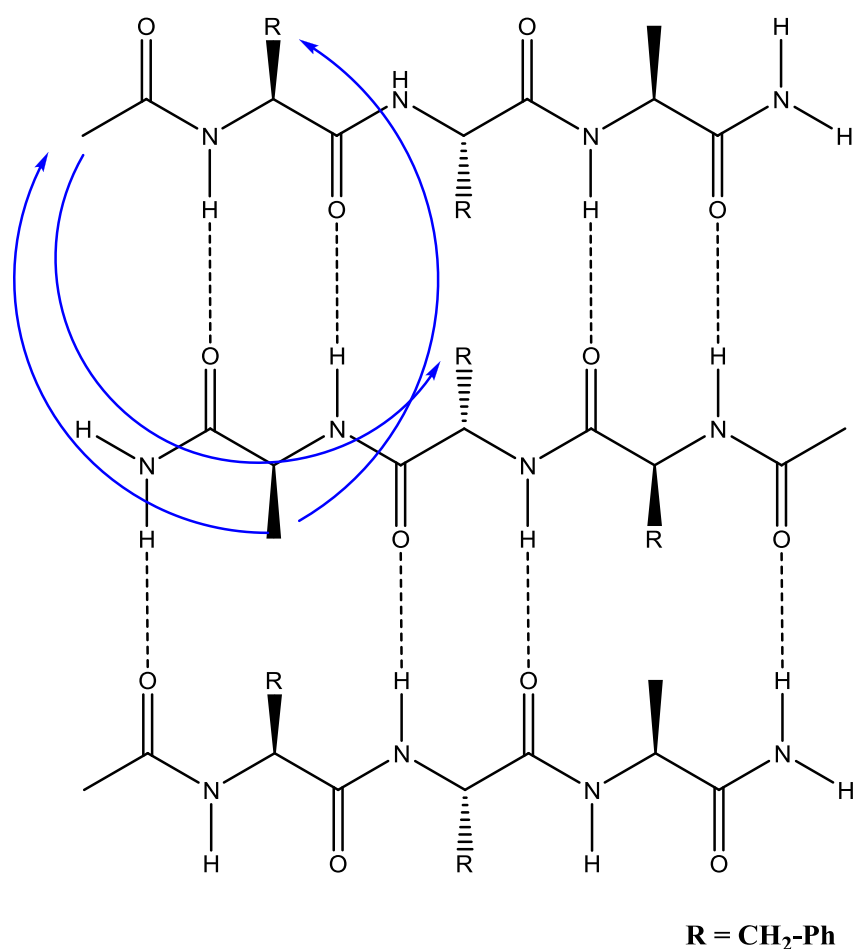
b)



c)

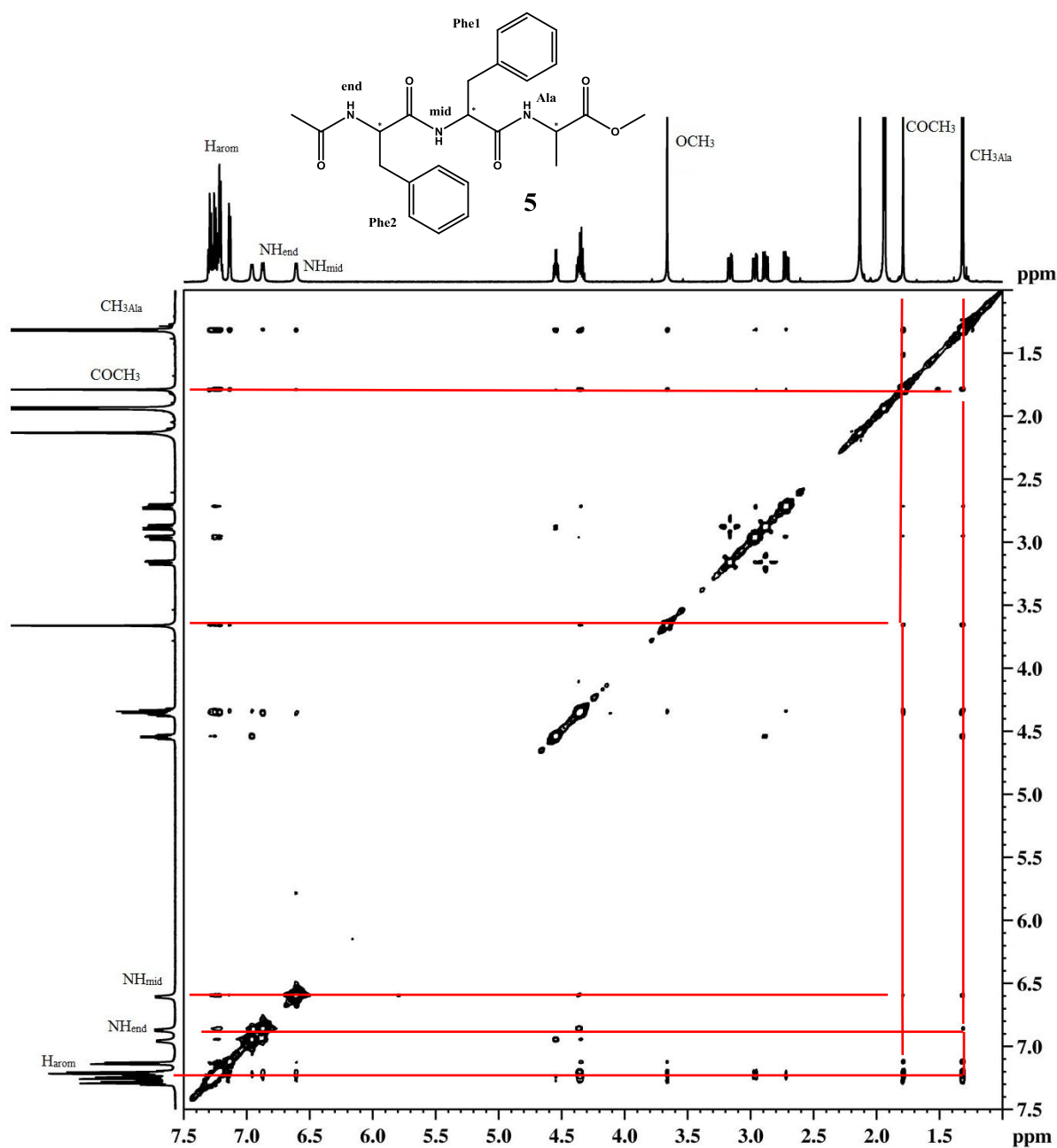
Slika 51. Minimizirana struktura tripeptida **6** (struktura sa minimalnom energijom) i izračunate vrijednosti intramolekularnih udaljenosti između acetilnih skupina (COCH_3) i skupina: a) $\text{CH}_2(\text{Phe1})$, b) NH_{mid} i c) H_{arom} .

NOESY spektar gela tripeptida **6** u d_3 -acetonitrilu ukazuje na moguću antiparalelnu orijentaciju molekula tripeptida **6** u gelu odnosno na antiparalelnu orijentaciju β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama. Na slici 52. je prikazan shematski prikaz pretpostavljenog modela antiparalelne β -nabrane ploče u acetonitrilnom gelu tripeptida **6** i navedene specifične intermolekularne NOE interakcije između skupina. Molekule tripeptida **6** su povezane vodikovim vezama između amidnih protona i karbonilnih kisika. Grafički prikaz ovisnosti promjene kemijskih pomaka o temperaturi za različite NH protone gela tripeptida **6** u d_3 -acetonitrilu ukazuje na uključenost amidnih protona u vodikovoj vezi što je u skladu s pretpostavljenim modelom antiparalelne β -nabrane ploče prikazanim na slici 52.



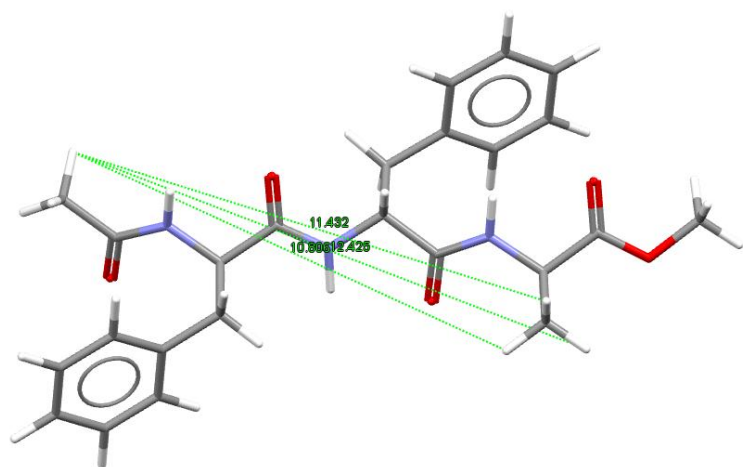
Slika 52. Shematski prikaz pretpostavljenog modela antiparalelne β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama za tripeptid **6**. Označene su specifične intermolekularne NOE interakcije.

NOESY spektar gela **5** u d_3 -acetonitrilu prikazuje prostorne interakcije između metilne skupine alanina (CH_3_{Ala}) i sljedećih skupina: COCH_3 , NH_{end} i H_{arom} . U NOESY spektru gela tripeptida **5** u d_3 -acetonitrilu prisutne su i prostorne interakcije između signala acetilne skupine (COCH_3) i signala skupina: OCH_3 , NH_{mid} i H_{arom} (Slika 53.). Izmjerene su udaljenosti između navedenih skupina unutar molekule (intramolekularne udaljenosti) na minimiziranoj strukturi tripeptida **5** (Slika 54.-55.).

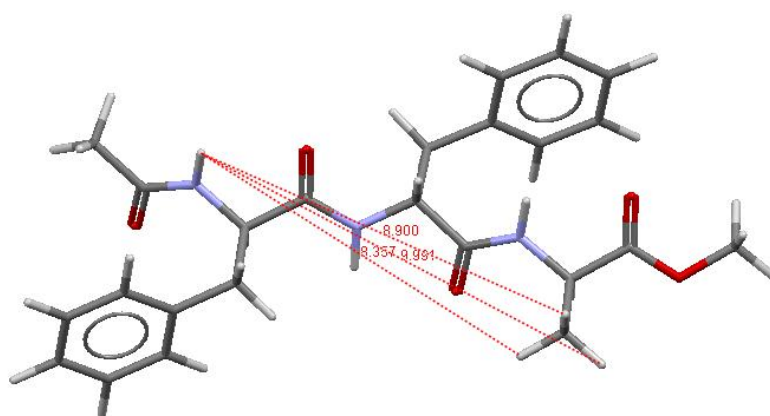


Slika 53. NOESY spektar gela tripeptida **5** u d_3 -acetonitrilu na 25 °C. Označene su intermolekularne interakcije.

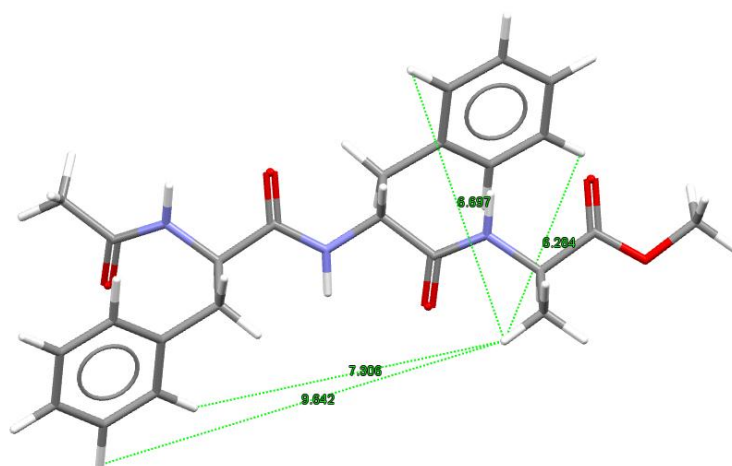
Na strukturi tripeptida **5** s minimalnom energijom izmjerene su udaljenosti između navedenih skupina unutar molekule (intramolekularne udaljenosti). Sve izmjerene intramolekularne udaljenosti su veće od 4 Å pa se navedene interakcije između spomenutih skupina ne mogu ostvariti unutar iste molekule već između molekula tripeptida **5** (Slika 54.-55.).



a)

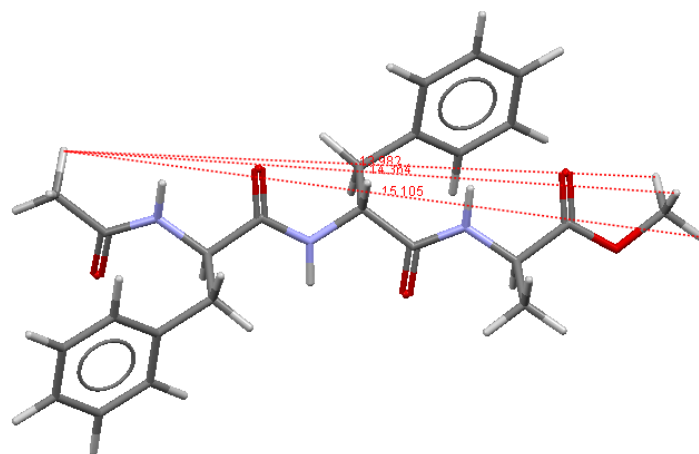


b)

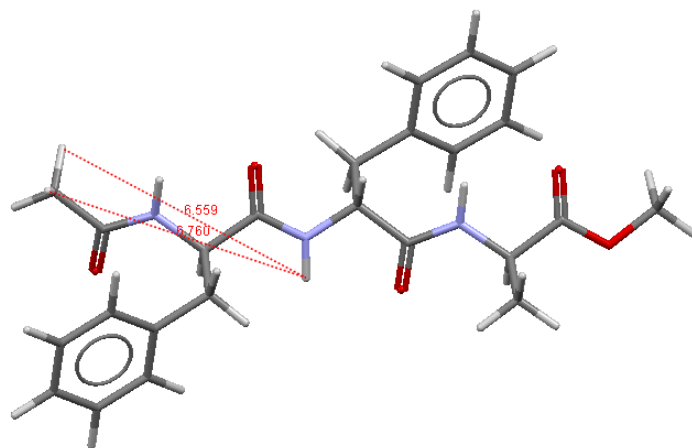


c)

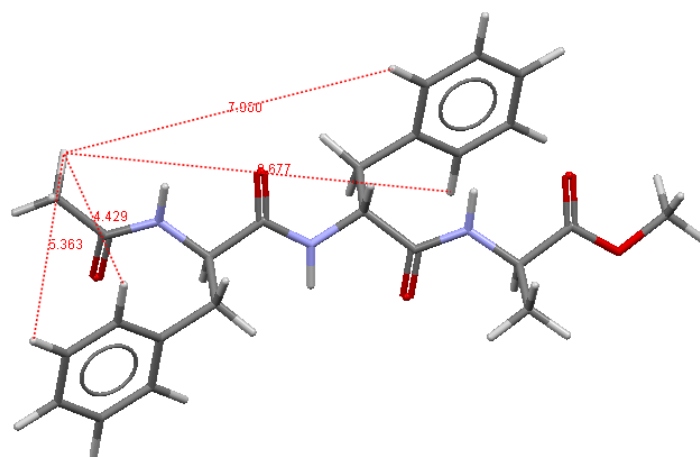
Slika 54. Struktura tripeptida **5** s minimalnom energijom) i izračunate vrijednosti intramolekularnih udaljenosti između metilnih skupina alanina i skupina: a) COCH_3 , b) NH_{end} i c) H_{arom} .



a)



b)

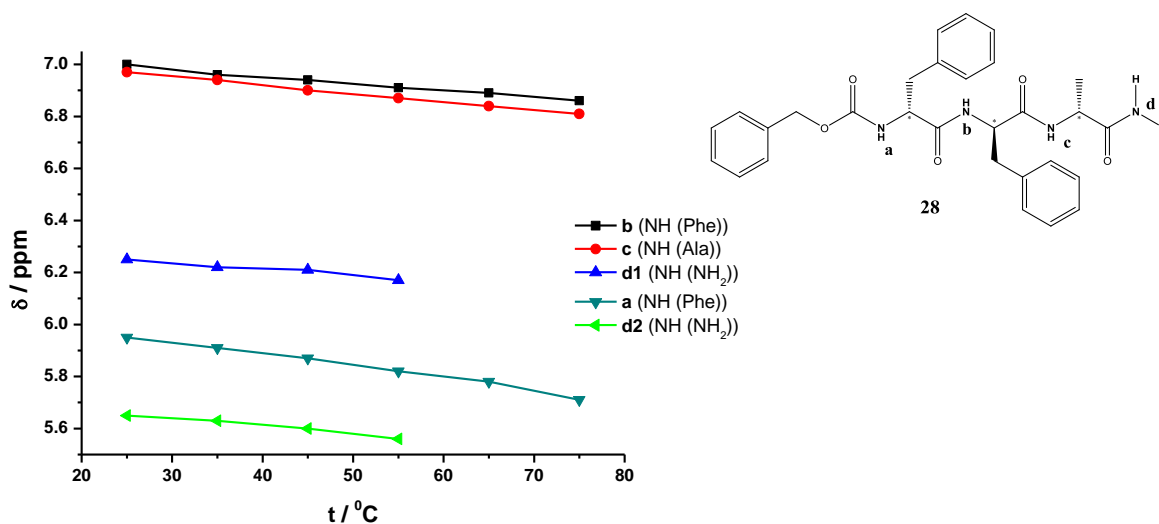


c)

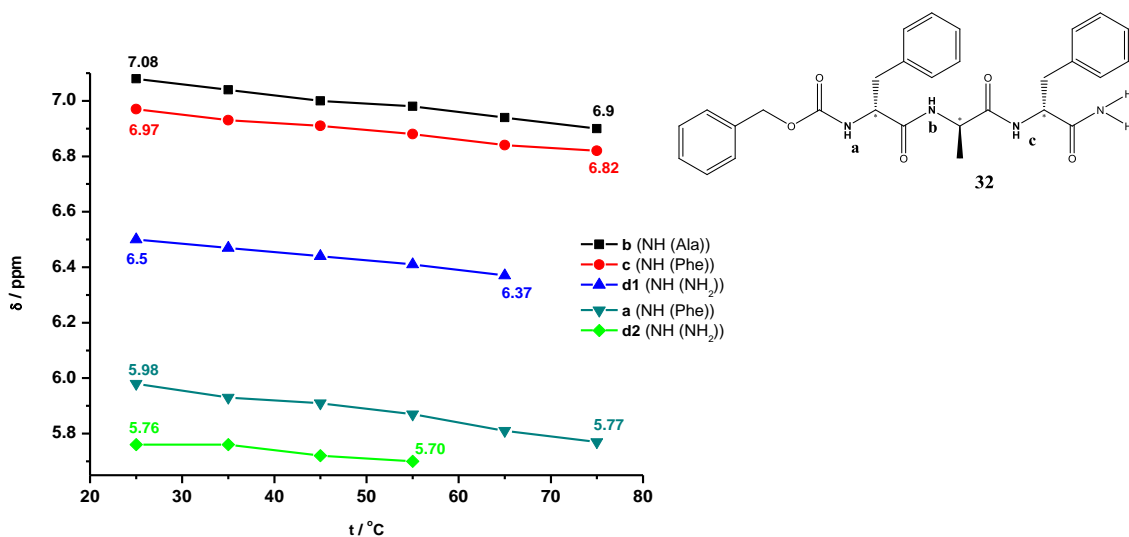
Slika 55. Struktura tripeptida **5** s minimalnom energijom i izračunate vrijednosti intramolekularnih udaljenosti između acetilne skupine (COCH₃) i skupina: a) OCH₃, b) NH_{mid} i c) H_{arom}.

NOESY spektar gela tripeptida **5** u d_3 -acetonitrilu ukazuje na potencijalnu strukturu antiparalelne β -nabrane ploče. Molekule tripeptida **5** se u acetonitrilnom gelu međusobno povezuju vodikovim vezama što je vidljivo na grafičkom prikazu ovisnosti kemijskih pomaka o temperaturi za različite NH protone gela tripeptida **5** u d_3 -acetonitrilu.

Z-zaštićeni tripeptidi **28** i **32** također geliraju acetonitril. Snimljeni su ^1H NMR spektri gelova **28** i **32** u d_3 -acetonitrilu u temperaturnom intervalu od 25 °C do 75°C. Grijanjem gelova dolazi do pomaka amidnih protona (NH) u viša magnetska polja što upućuje na uključenost amidnih protona u vodikovoj vezi između molekula tripeptida u acetonitrilnom gelu. Na slici 56. prikazana je ovisnost promjena kemijskih pomaka o temperaturi za različite NH protone gelova tripeptida **28** i **32** u d_3 -acetonitrilu te odgovarajuće kemijske strukture tripeptida u d_3 -acetonitrilu s prikazom amidnih protona koji sudjeluju u vodikovim vezama. Temperaturno ovisnim ^1H NMR spektrima tripeptida **28** u d_3 -acetonitrilu (Slika 56a) utvrđeno je da nema velikih razlika u nagibu pravca ovisnosti kemijskih pomaka o temperaturi, određenim za skupine b (NH_{Phe}) i c (NH_{Ala}) te za skupine d koje odgovaraju amidnim protonima CONH_2 . U temperaturnom intervalu od 25 °C do 75°C, ukupni kemijski pomaci prema višem magnetskom polju za skupine b i c su slični i iznose 0.14 ppm (b) i 0.16 ppm (c). U navedenom temperaturnom intervalu izrazito su mali ukupni kemijski pomaci amidnih protona d (CONH_2) i iznose 0.08 odnosno 0.09 ppm. Važno je napomenuti da je nagib pravca za kemijski pomak skupine a (NH_{Phe}) skoro dvostruko veći u odnosu na nagib pravca za ostale skupine što potvrđuje i ukupni kemijski pomak navedene skupine koji iznosi 0.24 ppm. Iz navedenih podataka o ukupnom kemijskom pomaku različitih NH protona gela tripeptida **28** u d_3 -acetonitrilu vidljivo je da su skupine a (NH_{Phe}), b (NH_{Phe}) i c (NH_{Ala}) uključene u vodikovoj vezi između molekula tripeptida **28** u acetonitrilnom gelu dok NH skupine d1 i d2 nisu uključene u vodikovoj vezi.



a)



b)

Slika 56. Ovisnost promjene kemijskih pomaka o temperaturi za različite NH protone gelova u d_3 -acetonitrilu za tripeptide a) **28** i b) **32**.

S obzirom na isti temperaturni interval grijanja gela moguće je usporediti temperaturno ovisni ^1H NMR spektar tripeptida **32** u d_3 -acetonitrilu s temperaturno ovisnim ^1H NMR spektrom tripeptida **28** u d_3 -acetonitrilu. Utvrđeno je da nema velikih razlika u nagibu pravaca ovisnosti kemijskih pomaka o temperaturi kod gela **32** u d_3 -acetonitrilu, određenim za skupine b (NH_{Ala}) i c (NH_{Phe}) te za skupine d koje odgovaraju amidnim protonima CONH_2 . U temperaturnom intervalu od 25 °C do 75 °C za gel **32** u d_3 -acetonitrilu (Slika 56b) izrazito je

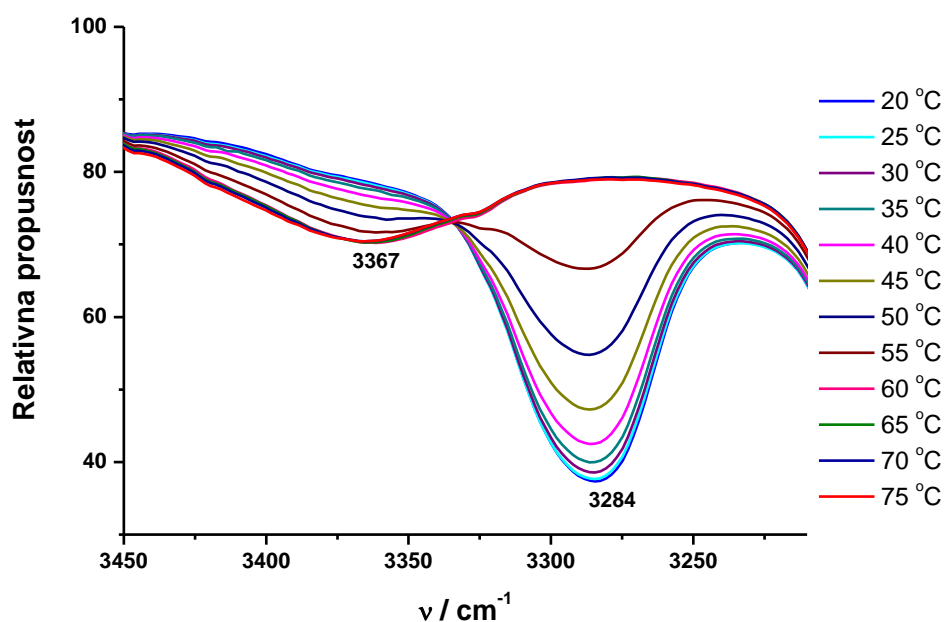
mali ukupni kemijski pomak za amidne protone d (CONH₂) i iznosi 0.13 ppm (d1) odnosno 0.06 ppm (d2). U spomenutom temperaturnom intervalu ukupni kemijski pomaci prema višem magnetskom polju za skupine b (NH_{Ala}) i c (NH_{Phe}) su slični i iznose 0.18 ppm (b) i 0.15 ppm (c). Kao i kod gela tripeptida **28**, nagib pravca za kemijski pomak skupine a (NH_{Phe}) u gelu tripeptida **32** u *d*₃-acetonitrilu je skoro dvostruko veći u odnosu na nagib pravca za ostale skupine što potvrđuje i ukupni kemijski pomak navedene skupine koji iznosi 0.21 ppm. Vrijednosti ukupnih kemijskih pomaka amidnih protona dobivenih u temperaturno ovisnim ¹H NMR spektrima gela **32** u *d*₃-acetonitrilu ukazuju da su skupine a (NH_{Phe}), b (NH_{Ala}), c (NH_{Phe}) i d1 (NH(NH₂)) uključene u vodikovoj vezi između molekula tripeptida **32** u *d*₃-acetonitrilu. Amidni proton d2 (NH(NH₂)) ima izrazito mali kemijski pomak i nije uključen u vodikovoj vezi između molekula tripeptida **32** u acetonitrilnom gelu.

4.5.2. FTIR spektroskopija

FTIR spektroskopija je vrlo značajna metoda za praćenje intermolekulskih interakcija jer se mogu pratiti određene interakcije u sustavu, posebno vodikove veze i njihove promjene pod utjecajem temperature.⁷⁶ Poznate su karakteristične frekvencije istezanja skupina koje se nalaze u vodikovoj vezi u gelu i skupina koje su solvatirane. Za asignaciju vrpce karakteristične se apsorpcije amidne skupine označavaju rimskim brojevima. U čvrstom stanju nalazimo vrpcu C=O između 1680 i 1630 cm⁻¹ (amid I) uz kontrolnu pojedinačnu vrpcu ν (NH) pri 3300 cm⁻¹. Slaba popratna vrpca pri 3100 cm⁻¹ je viši ton karakteristične i jake vrpce pri 1550 cm⁻¹ (amid II) koja potječe iz interakcije vibracija ν(C-N) i δ(C-N-H).

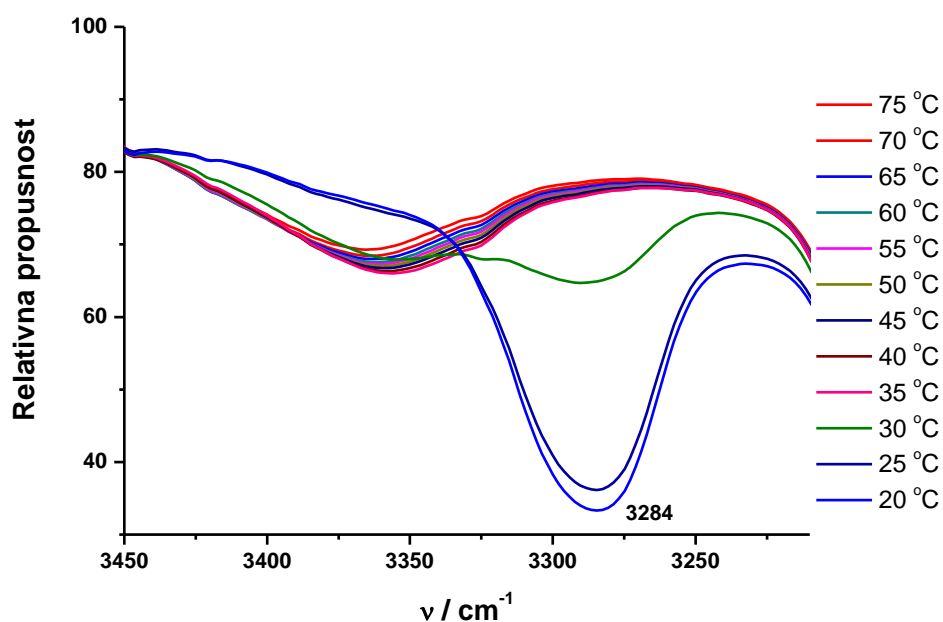
Promatranje supramolekularnih interakcija u gelovima

Iz temperaturno ovisnih FTIR spektara gela **5** u acetonitrilu mjerenih u intervalu 20 °C -75 °C, vidljivo je da grijanjem polako dolazi do narušavanja strukture gela i pomicanja ravnoteže u smjeru nastanka slobodnih solvatiranih molekula što je vidljivo iz povećanja intenziteta vrpce koje odgovaraju istezanju skupina koje nisu u vodikovoj vezi, a najviše je izraženo za NH istezanja (Slika 57.).



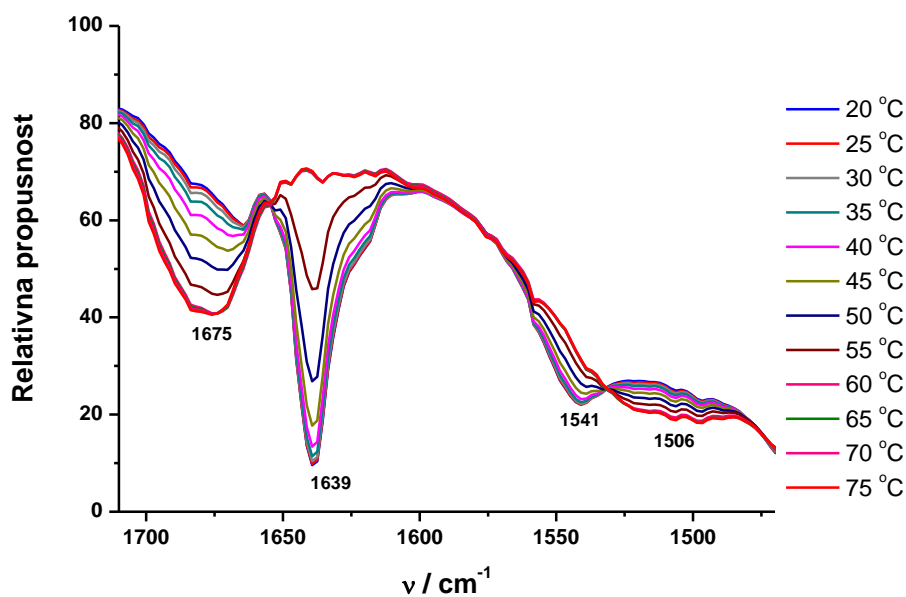
Slika 57. Temperaturna ovisnost FTIR vrpce za istežanje NH skupina kod grijanja gela **5** u acetonitrilu (20 °C - 75 °C).

Povećanjem temperature intenzitet vrpce na 3284 cm^{-1} polako se smanjuje, a intenzitet vrpce na 3367 cm^{-1} raste. Pri temperaturi od 60 °C gel se rastalio i molekule su otopljene u otapalu. Također, hlađenjem nastale otopine može se pratiti samoorganizacija molekula odnosno ponovno nastajanje vrpce na 3284 cm^{-1} pri temperaturi 30 °C i nagli porast te vrpce do temperature 20 °C (Slika 58.)



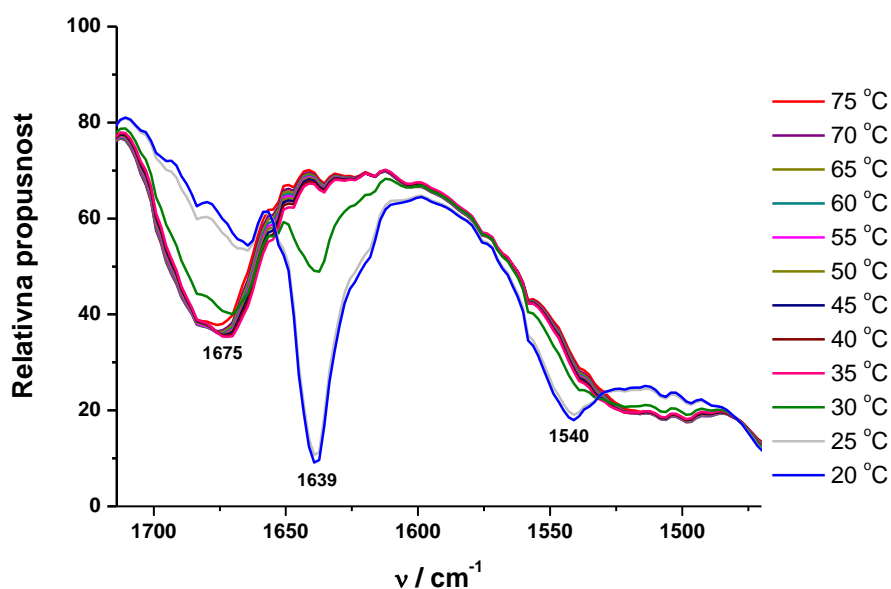
Slika 58. Temperaturna ovisnost FTIR vrpce za istežanje NH skupina kod hlađenja gela **5** u acetonitrilu (75 °C - 20 °C).

Istežanje amid I vrpce karbonilnih skupina u vodikovoj vezi u gelu na 20 °C zamijećeno je na 1639 cm^{-1} te amid I vrpce na 1675 cm^{-1} pri 100 °C koja odgovara istežanju slobodne karbonilne skupine solvatiranih molekula (Slika 59.). Također je vidljivo istežanje amid II vrpce samoorganizirane molekule u gelu na 1541 cm^{-1} te istežanje amid II vrpce za slobodne molekule na 1506 cm^{-1} .



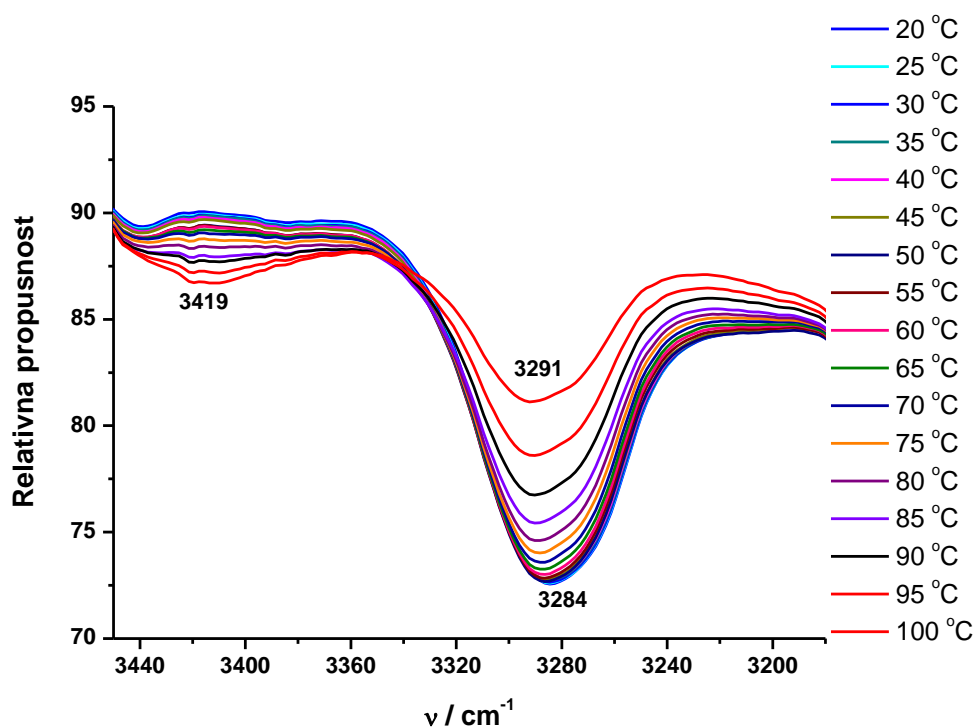
Slika 59. Temperaturna ovisnost amid I i amid II vrpci kod grijanja gela **5** u acetonitrilu (25 °C - 75 °C).

Hlađenjem otopine dolazi do ponovnog nastajanja vrpci istezanja amid I i amid II skupine uključene u vodikovu vezu što upućuje na to da je gel **5** u acetonitrilu termoreverzibilan (Slika 60.).



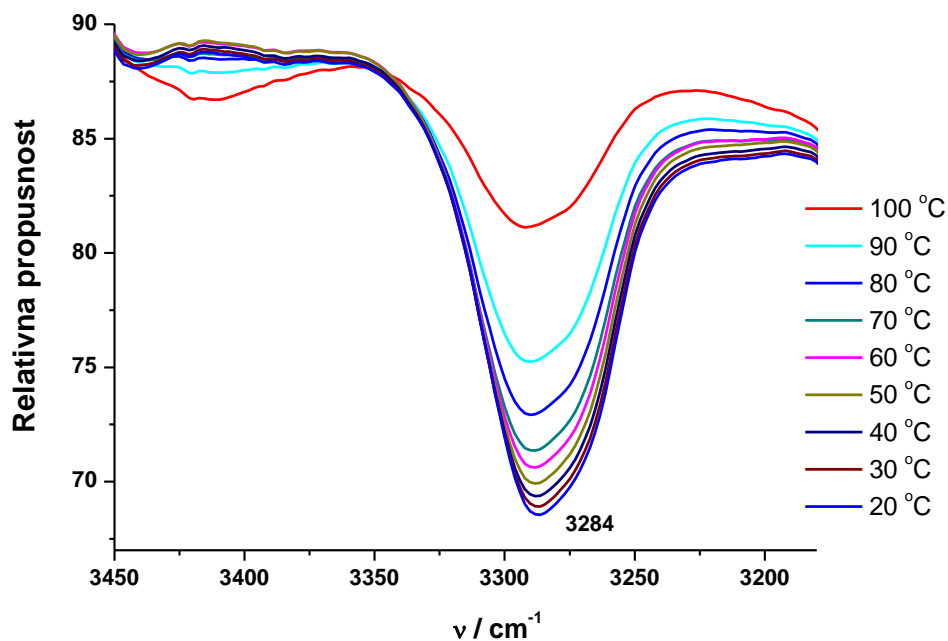
Slika 60. Temperaturna ovisnost amid I i amid II vrpci kod hlađenja gela **5** u acetonitrilu (75 °C - 25 °C).

Temperaturno ovisni FTIR spektri gela **5** u toluenu ukazuju da grijanjem gela dolazi do postepenog smanjenja intenziteta vrpce koje odgovaraju istežanjima skupina koje su u vodikovoj vezi i porasta intenziteta vrpce istežanja skupina solvatiranih molekula. Navedeni toluenski gel s obzirom na visoku koncentraciju tripeptida potrebnu kod snimanja FTIR spektara, ima visoku temperaturu tališta ($T_g \sim 90\text{ }^\circ\text{C}$) pa zbog toga nije došlo do potpunog otapanja gela već je prisutan određen dio agregata. To je vidljivo iz temperaturne ovisnosti pomaka FTIR vrpce za istežanje NH skupina gela **5** u toluenu (Slika 61.) Pri $20\text{ }^\circ\text{C}$ je prisutna vrpca na 3284 cm^{-1} koja odgovara istežanju NH skupina uključenih u vodikovu vezu. Povećanjem temperature dolazi do smanjenja intenziteta te vrpce i porasta intenziteta vrpce na 3419 cm^{-1} . Pri najvišoj temperaturi ($100\text{ }^\circ\text{C}$) uz navedenu vrpcu na 3419 cm^{-1} koja odgovara istežanju NH skupina slobodnih molekula još uvijek postoji vrpca istežanja NH skupina molekula u vodikovoj vezi na 3291 cm^{-1} .



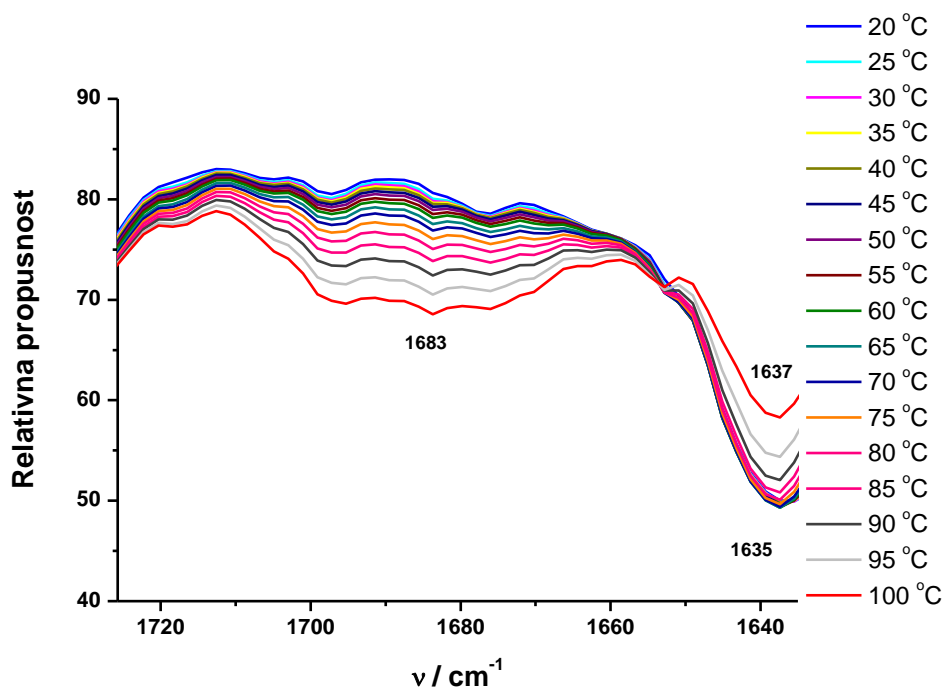
Slika 61. Temperaturna ovisnost FTIR vrpce za istežanje NH skupina kod grijanja gela **5** u toluenu ($20\text{ }^\circ\text{C}$ - $100\text{ }^\circ\text{C}$).

Proces je termoreverzibilan tako da su promjene sol-gel stanja zabilježene u ciklusu hlađenja (Slika 62.).



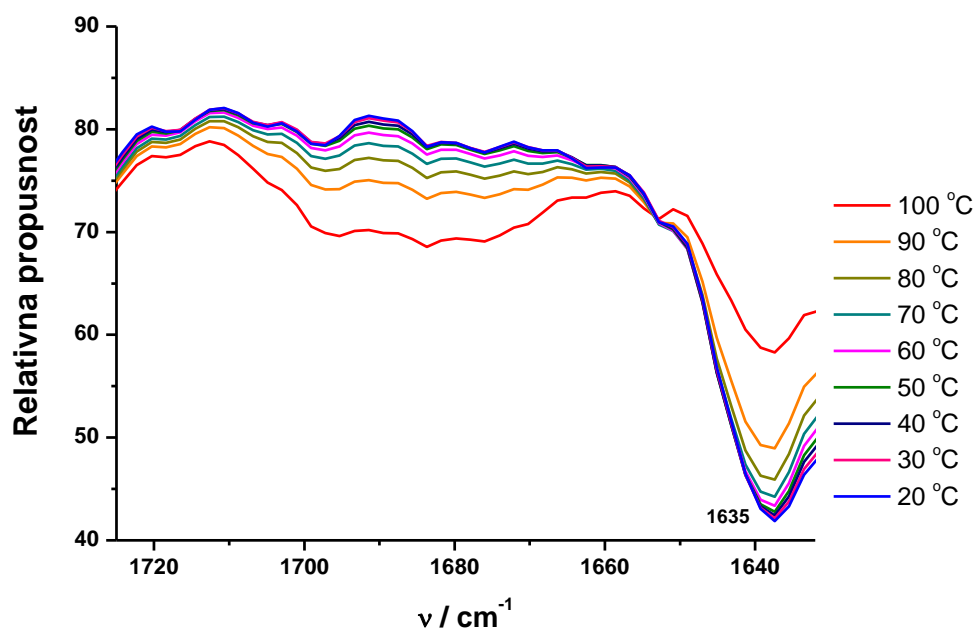
Slika 62. Temperaturna ovisnost FTIR vrpce za istežanje NH skupina kod hlađenja gela **5** u toluenu (100 °C - 20 °C).

Na temperaturno ovisnim FTIR spektrima gela **5** u toluenu također su vidljiva istežanja amid I vrpce karbonilnih skupina u vodikovoj vezi u gelu na 1635 cm^{-1} (20 °C) te istežanja amid I vrpce za slobodne molekule na 1683 cm^{-1} (100 °C). Zbog visoke temperature tališta gela, na 100 °C je prisutan određen dio agregata na što ukazuje istežanje amid I vrpce u vodikovoj vezi na 1637 cm^{-1} (Slika 63.). Istežanja amid II vrpce su prekrivena vrpcom toluena i nisu vidljiva u spektru.



Slika 63. Temperaturna ovisnost amid I vrpci kod grijanja gela **5** u toluenu (20 °C - 100 °C).

Hlađenjem otopine dolazi do ponovnog nastajanja gela i nastajanja vrpci istezanja amid I skupine uključene u vodikovu vezu (Slika 64.) što ukazuje na činjenicu da je gel tripeptida **5** u toluenu termoreverzibilan.

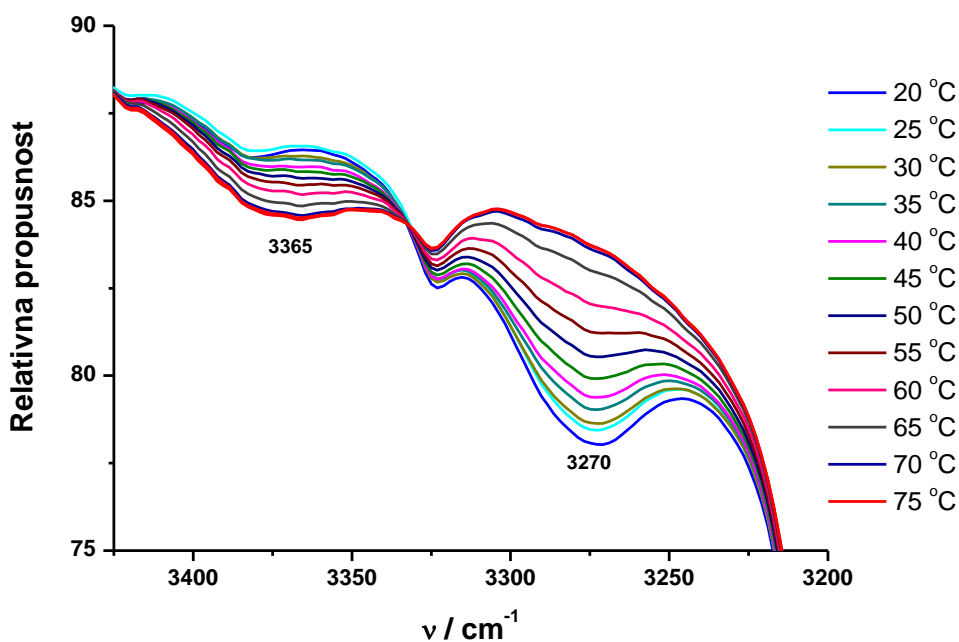


Slika 64. Temperaturna ovisnost amid I vrpce kod hlađenja gela **5** u toluenu (100 °C - 20 °C).

U FTIR spektroskopiji za sekundarnu strukturu β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama su karakteristična istežanja amida I (C=O) oko 1640 cm^{-1} i amida II (NH) oko 1540 cm^{-1} .

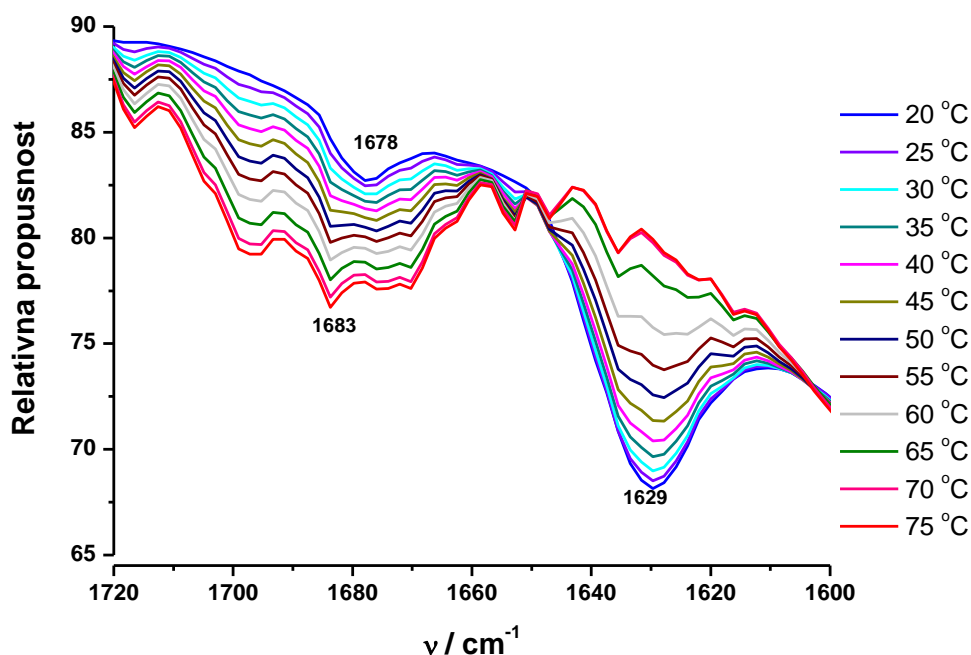
FTIR spektri gelova **5** u acetonitrilu i toluenu ukazuju na potencijalnu strukturu β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama.

Temperaturni FTIR spektar gela **6** u acetonitrilu sadrži karakteristične vrpce za istežanje NH skupina te amid I vrpce. Na 20 °C prisutna je vrpca istežanja NH skupina koje se nalaze u vodikovoj vezi (3270 cm^{-1}). Grijanjem gela do 75 °C dolazi do smanjenja intenziteta te vrpce i porasta intenziteta vrpce na 3365 cm^{-1} (Slika 65.).



Slika 65. Temperaturna ovisnost FTIR vrpci za istežanje NH skupina kod grijanja gela **6** u acetonitrilu (20 °C - 75 °C).

Istežanje amid I vrpci karbonilnih skupina u vodikovoj vezi u gelu na 20 °C zamijećeno je na 1629 cm^{-1} dok je na 1683 cm^{-1} vrpca koja odgovara istežanju slobodne karbonilne skupine (75 °C) (Slika 66.) Važno je napomenuti da na 20 °C uz istežanje karbonilnih skupina u gelskim agregatima postoji i slaba vrpca na 1678 cm^{-1} koja odgovara istežanju slobodnih odnosno nevezanih karbonilnih skupina koje nisu uključene u vodikove veze.

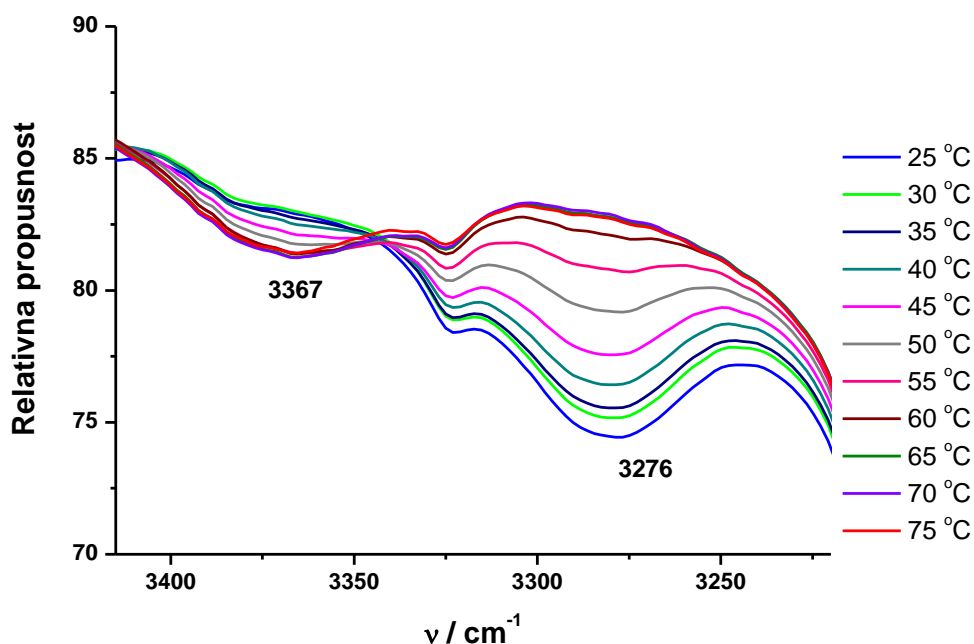


Slika 66. Temperaturna ovisnost amid I vrpce kod grijanja gela **6** u acetonitrilu (20 °C - 75 °C).

FTIR spektar gela **6** u acetonitrilu upućuje na potencijalnu strukturu paralelno orijentirane β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama.

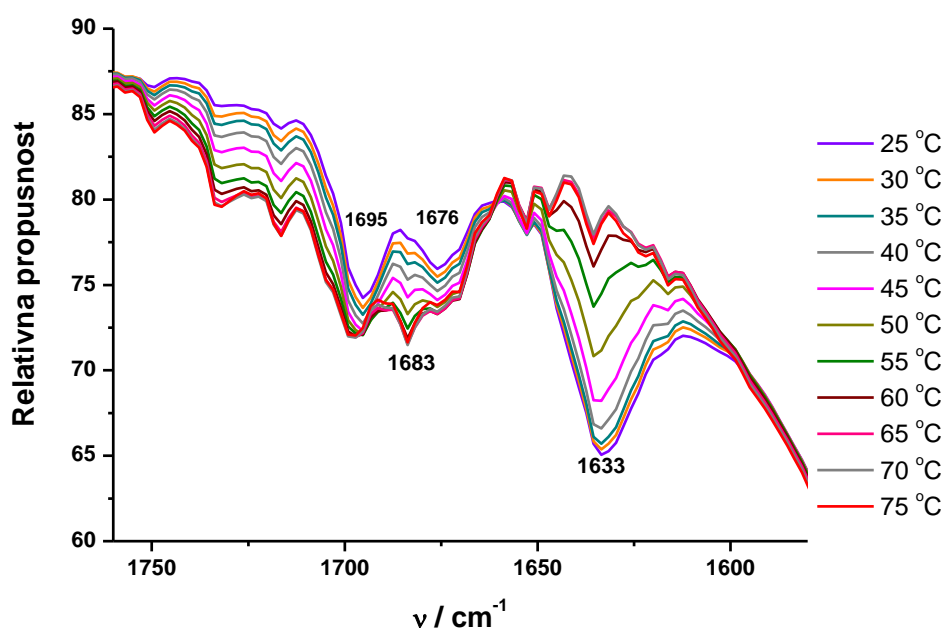
FTIR spektroskopijom su praćene interakcije gela **28** i gela **32** u acetonitrilu. Temperaturni FTIR spektri gelova sadrže karakteristične vrpce za istežanje NH skupina te amid I vrpce. U oba slučaja, vrpce amida II nije moguće asignirati zbog asporpcije otapala.

Iz temperaturno ovisnih FTIR spektara gela **28** mjenjenih u temperaturnom intervalu od 25 °C do 75 °C, vidljivo je da povećanjem temperature dolazi do smanjenja intenziteta vrpce na 3276 cm^{-1} koja odgovara istežanjima NH skupina uključenih u vodikovoj vezi. Istovremeno raste intenzitet vrpce koja odgovara istežanjima NH skupina slobodnih molekula na 3367 cm^{-1} (Slika 67.)



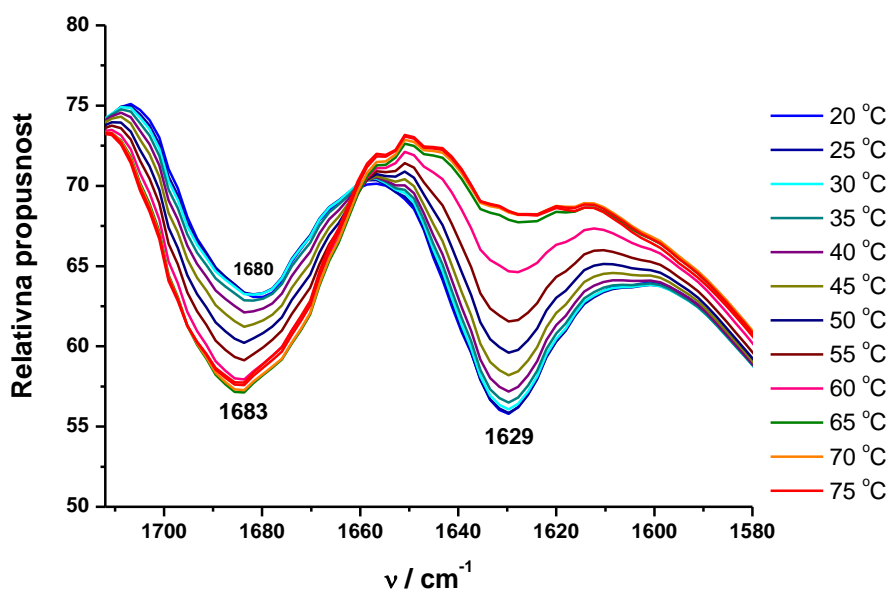
Slika 67. Temperaturna ovisnost FTIR vrpci za istežanje NH skupina kod grijanja gela **28** u acetonitrilu (25 °C - 75 °C).

Istežanje amid I vrpci karbonilnih skupina u vodikovoj vezi u gelu **28** u acetonitrilu primjećeno je na 1633 cm^{-1} te vrpce na 1683 cm^{-1} koja odgovara istežanju slobodne karbonilne skupine (Slika 68.). FTIR spektar gela također pokazuje slabu vrpcu na 1695 cm^{-1} te vrpcu na 1676 cm^{-1} koja odgovara slobodnim karbonilnim skupinama koje nisu povezane vodikovim vezama u gelu. FTIR spektar gela **28** u acetonitrilu upućuje na potencijalnu strukturu β -nabrane ploče. Proces stvaranja gela je termoreverzibilan pa su tako promjene sol-gel stanja zabilježene i u ciklusu hlađenja.



Slika 68. Temperaturna ovisnost amid I vrpce kod grijanja gela **28** u acetonitrilu (25 °C - 75 °C).

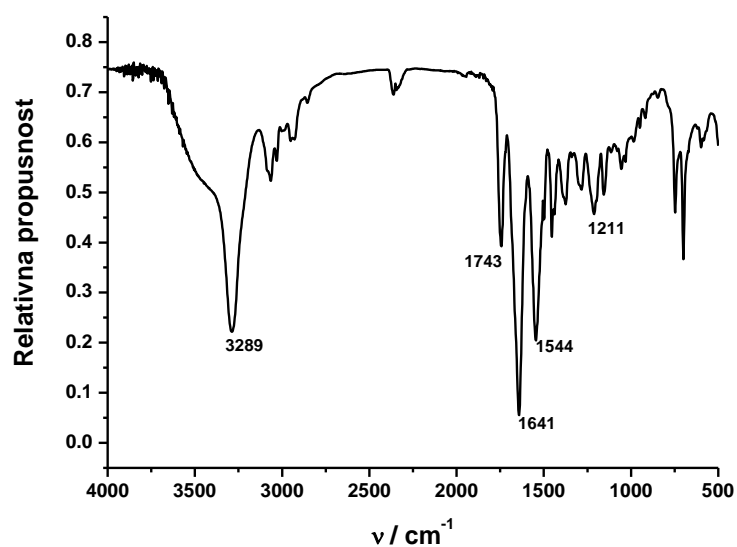
U FTIR spektru gela **32** u acetonitrilu karakteristične vrpce za istežanje NH skupina nije bilo moguće asignirati zbog apsorpcije otapala. Amid I vrpca za istežanje karbonilnih skupina u vodikovoj vezi u gelu je prisutna na 1629 cm^{-1} , a vrpca na 1683 cm^{-1} odgovara istežanju slobodne karbonilne skupine u otopini (Slika 69.). Na 1680 cm^{-1} prisutna je vrpca istežanja slobodnih karbonilnih skupina koje nisu uključene u vodikovim vezama. Proces nastajanja gela **32** u acetonitrilu je termoreverzibilan i promjene sol- gel stanja su zabilježene i u ciklusu hlađenja. FTIR spektar gela **32** u acetonitrilu upućuje na potencijalnu strukturu β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama.



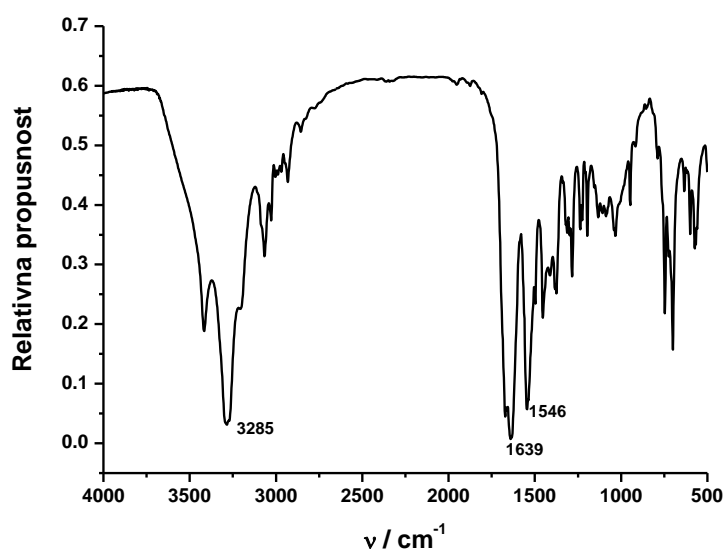
Slika 69. Temperaturna ovisnost amid I vrpci kod grijanja gela **32** u acetonitrilu (20 °C - 75 °C).

Budući da je ispitana samoorganizacija gelatora u različitim otapalima, zbog apsorpcije samih otapala neke od vrpci se nisu mogle asignirati s obzirom da su ih prekrile vrpce samih otapala. Zbog toga se određivala sekundarna struktura tripeptidnih gelatora u kserogelovima (osušenim gelovima).

FTIR spektri kserogelova **5** i **6** iz vode ukazuju na potencijalnu strukturu β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama (Slika 70.) Za tripeptid **5** karakteristične su frekvencije istezanja NH skupina koje se nalaze u vodikovoj vezi pri 3289 cm^{-1} , frekvencije istezanja amida I pri 1641 cm^{-1} te amida II pri 1544 cm^{-1} . Metilni ester **5** se prepoznaje i po jakoj karbonilnoj vrpici pri 1743 cm^{-1} i kontrolnoj vrpici asimetrične istezne vibracije fragmenta C-O-C pri 1211 cm^{-1} (Slika 70a). Za tripeptid **6** su vidljive karakteristične frekvencije istezanja NH skupina koje se nalaze u vodikovoj vezi pri 3285 cm^{-1} , frekvencije istezanja amida I pri 1639 cm^{-1} , a amida II pri 1546 cm^{-1} (Slika 70b).



a)



b)

Slika 70. FTIR spektri kserogelova iz vode za tripeptide: a) **5** i b) **6**.

Snimljeni su FTIR spektri kserogelova tripeptida **5** i tripeptida **6** iz acetonitrila i uspoređeni s FTIR spektrima odgovarajućih gelova iz acetonitrila.

U usporedbi sa FTIR spektrom gela **5** u acetonitrilu, FTIR spektar kserogela **5** iz acetonitrila također pokazuje karakteristične frekvencije istezanja vrpce amida I i amida II koja upućuju na strukturu β -nabrane ploče (Tablica 7.)

Tablica 7. Karakteristične vrpce istezanja (ν/cm^{-1}) za tripeptid **5** u kserogelu i gelu ($c = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$).

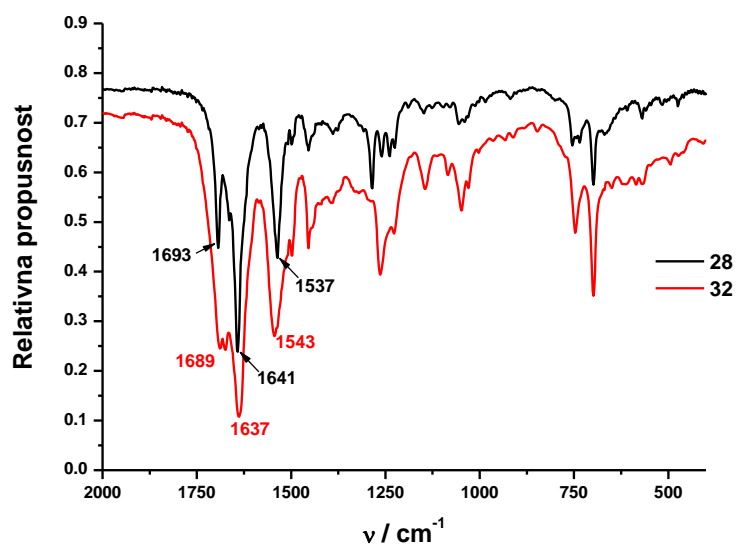
	NH	Amid I	Amid II
kserogel	3285	1642	1544
Gel,	3284 (gel)	1639 (gel)	1541 (gel)
acetonitril,	3367 (otopljene	1675 (otopljene	1506 (otopljene
25 °C	molekule)	molekule)	molekule)

FTIR spektar gela **6** u acetonitrilu te FTIR spektar kserogela **6** iz acetonitrila pokazuju karakteristične frekvencije istezanja vrpce amida I specifične za potencijalnu strukturu β -nabrane ploče (Tablica 8.). Zbog apsorpcije samog otapala, nije bilo moguće asignirati vrpce amida I.

Tablica 8. Karakteristične vrpce istezanja (ν/cm^{-1}) za tripeptid **6** u kserogelu i gelu ($c = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$).

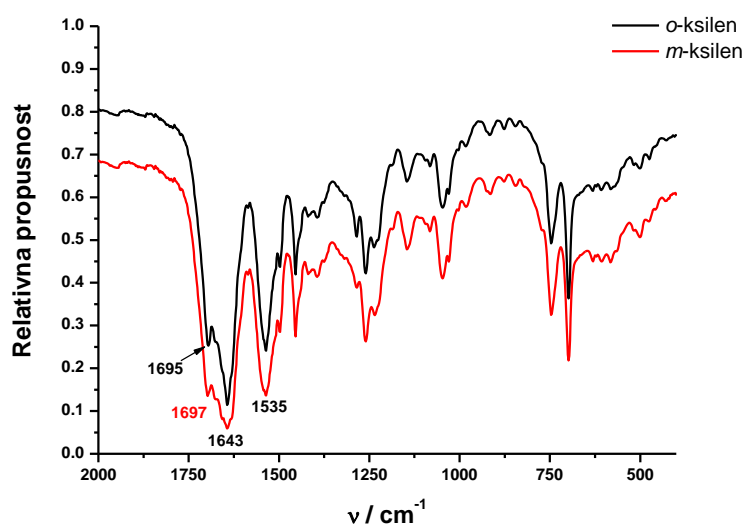
	NH	Amid I	Amid II
kserogel	3280	1637 1678 (slaba vrpca)	1544
Gel,	3276 (gel)	1629 (gel)	prekriveno vrpcom otapala
acetonitril,	3367 (otopljene	1678 (slaba vrpca)	
25 °C	molekule)	1683 (otopljene molekule)	

FTIR spektri kserogelova tripeptida **28** i **32** iz acetonitrila ukazuju na strukturu β -nabrane ploče (Slika 71.). Za oba tripeptida karakteristična su istezanja amida I oko 1640 cm^{-1} i amida II oko 1540 cm^{-1} koja upućuju na postojanje sekundarne strukture β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama.

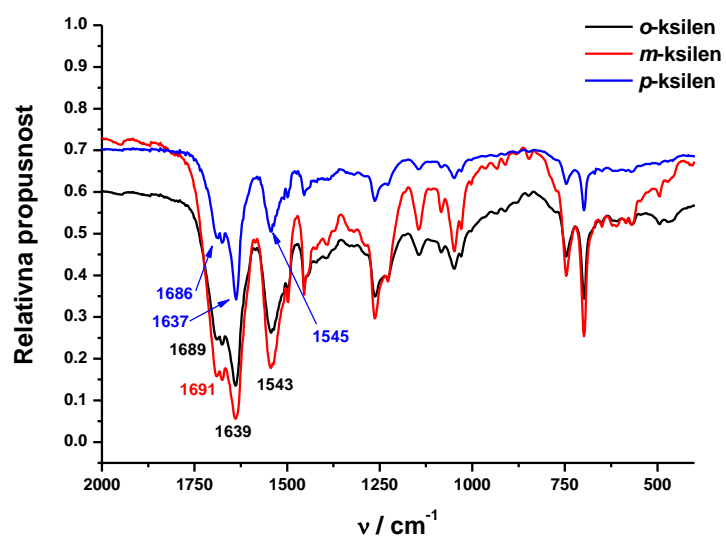


Slika 71. FTIR spektri kserogelova tripeptida **28** i **32** iz acetonitrila (prikazan je amidni dio spektra zbog bolje preglednosti).

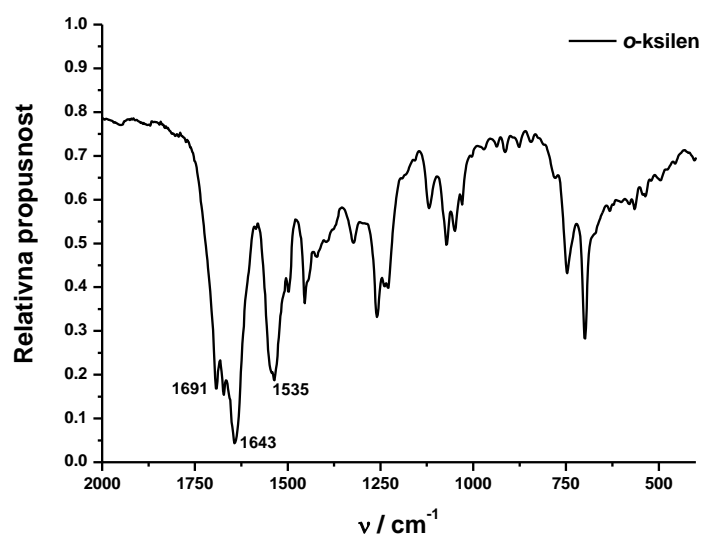
Na slici 72. su prikazana amidna područja FTIR spektara kserogelova *Z*-zaštićenih tripeptida iz izomera ksilena te su označene karakteristične vrpce istezanja (amid I i amid II). Kao i kod kserogelova iz acetonitrila, FTIR spektri kserogelova iz *o*-, *m*- i *p*-ksilena upućuju na potencijalnu strukturu β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama u ksilenskim gelovima.



a)



b)

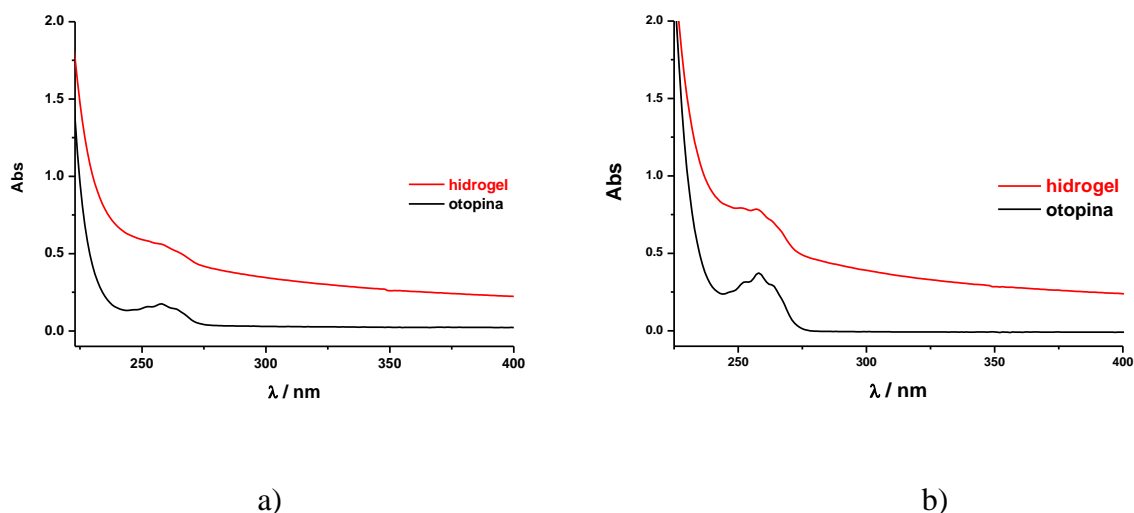


c)

Slika 72. FTIR spektri kserogelova iz izomera ksilena za tripeptide: a) **28**, b) **32** i c) **37** (prikazan je amidni dio spektra zbog bolje preglednosti).

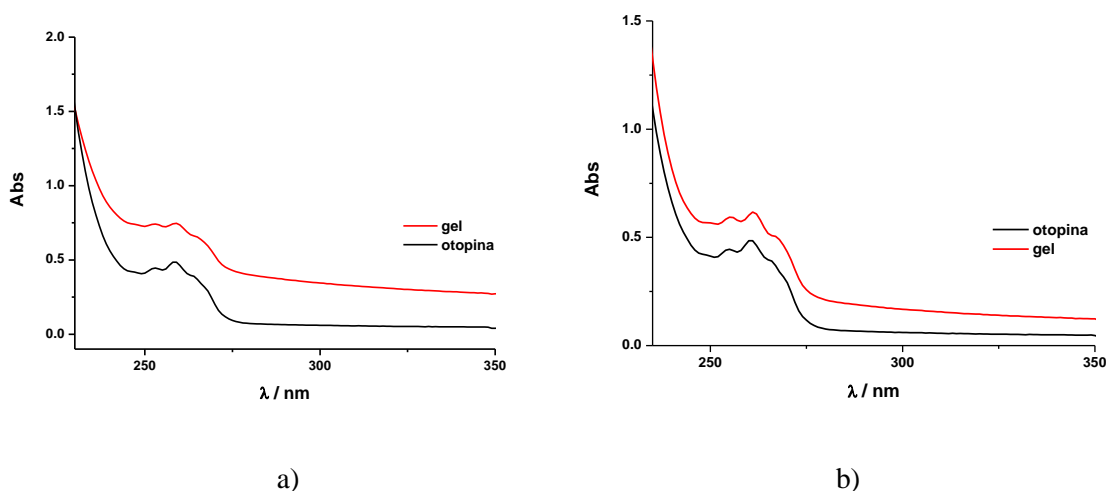
4.5.3. UV/Vis i CD spektroskopija

UV/Vis spektar vodene otopine tripeptida **5** i **6** pokazuje tripletni maksimum apsorpcije na 258 nm što je uobičajeno za aromatske kromofore kod sekvence Phe-Phe.⁷⁷ U UV-Vis spektru hidrogela tripeptida **5** i **6** dolazi do proširenja maksimuma apsorpcije što može biti posljedica aromatskih π - π interakcija (Slika 73.)



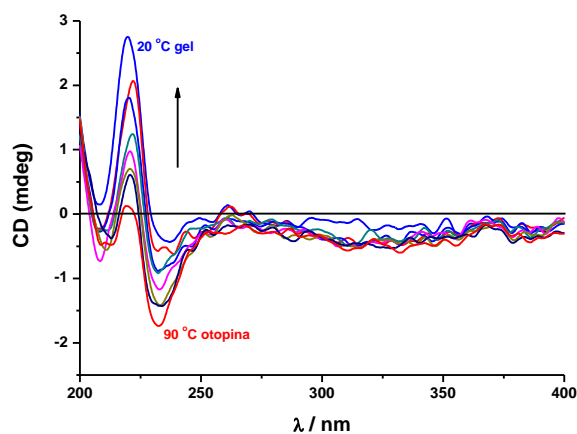
Slika 73. UV/Vis apsorpcijski spektri vodene otopine i hidrogela tripeptida a) **5** i b) **6**.

Snimljeni su UV/Vis spektri otopine tripeptida **5** i **6** u acetonitrilu te spektri gelova tih tripeptida u acetonitrilu (Slika 74.). UV/Vis spektri tripeptida u gelu i otopini pokazuju tripletni maksimum apsorpcije na 258 nm. Ne dolazi do promjene spektra u gelu u odnosu na otopinu tripeptida **5** i **6** u acetonitrilu.



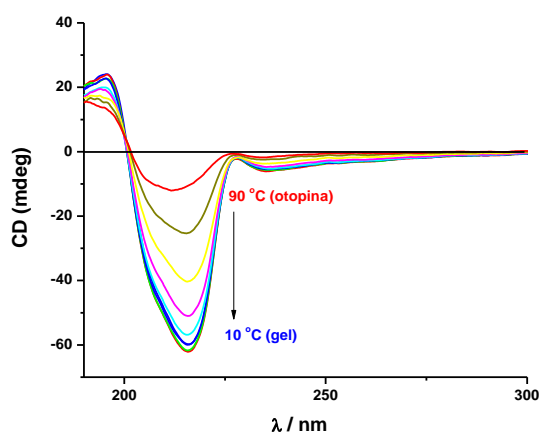
Slika 74. UV/Vis apsorpcijski spektri vodene otopine i hidrogela tripeptida a) **5** i b) **6**.

Spektroskopija cirkularnog dikroizma često se koristi za ispitivanje sekundarne i tercijarne strukture proteina i peptida.⁷⁸ CD spektar proteina u području valnih duljina < 250 nm daje informacij o sekundarnoj strukturi proteina. Spektroskopijom cirkularnog dikroizma (CD) istraživane su konformacijske strukture gelskih agregata. CD spektri hidrogela tripeptida **6** upućuju na postojanje pozitivnog Cottonovog efekta na 220 nm i negativnog signala na 237 nm. Zagrijavanjem gela od 20 °C - 90 °C dolazi do smanjenja intenziteta CD signala i gubi se kiralnost gelske samoorganizacije (Slika 75.). Postojanje pozitivnog i negativnog Cottonovog efekta u području valnih duljina < 250 nm upućuje na prisutnost sekundarne strukture β -nabrane ploče u hidrogelu tripeptida **6**.⁷⁹



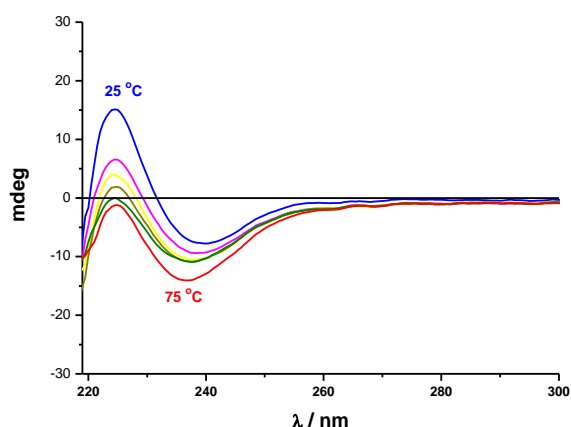
Slika 75. Temperaturno ovisni CD spektri hidrogela **6**.

CD spektar hidrogela tripeptida **5** pokazuje negativan signal na 216 nm. Grijanjem gela i prelaskom u sol stanje dolazi do smanjenja intenziteta signala (Slika 76.).

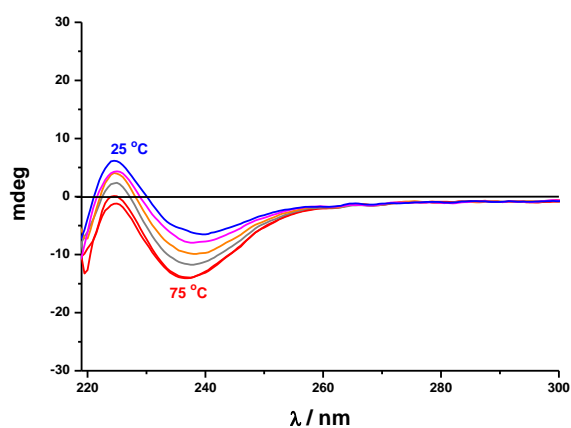


Slika 76. Temperaturno ovisni CD spektri hidrogela **5**.

CD spektroskopijom praćena je i kiralna organizacija gelova tripeptida **28** i **32** u acetonitrilu. Kod tripeptida **28** možemo uočiti pozitivan Cottonov efekt na 224 nm i negativan CD signal na 239 nm što može upućivati na tipičnu strukturu β -nabrane ploče. Zagrijavanjem gela od 25°C-75°C dolazi do smanjenja intenziteta CD signala i gubi se kiralnost gelske samoorganizacije (Slika 77a). Proces je reverzibilan, pri hlađenju otopine dolazi do formiranja gela i pojave pozitivnog signala na 224 nm što upućuje na ponovnu sličnu orijentaciju u gelu (Slika 77b).



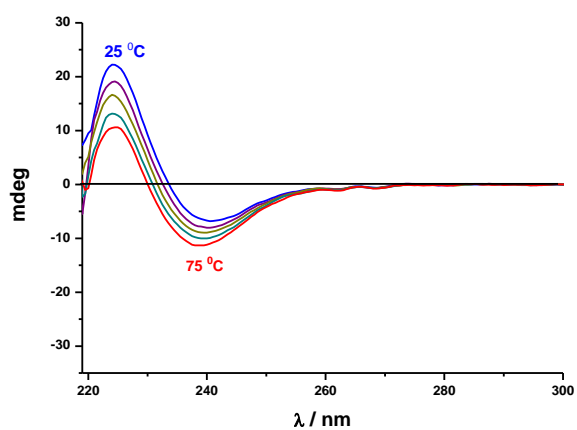
a)



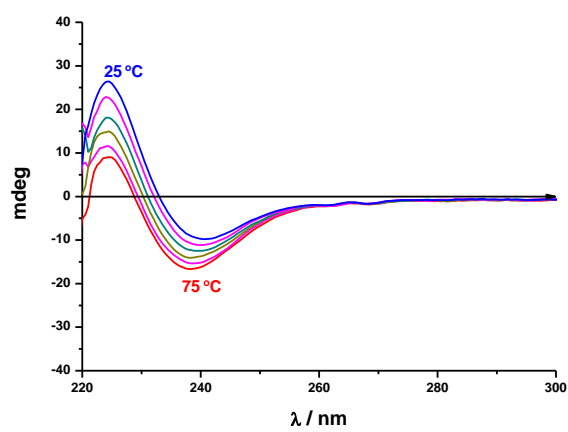
b)

Slika 77. Temperaturno ovisni CD spektri gela **28** u acetonitrilu prilikom a) grijanja i b) hlađenja.

Zagrijavanjem gela tripeptida **32** u acetonitrilu također dolazi do smanjenja intenziteta pozitivnog signala na 224 nm (Slika 78a). Hlađenjem dolazi do porasta intenziteta signala i formiranja gela sa sličnom organizacijom (Slika 78b).



a)



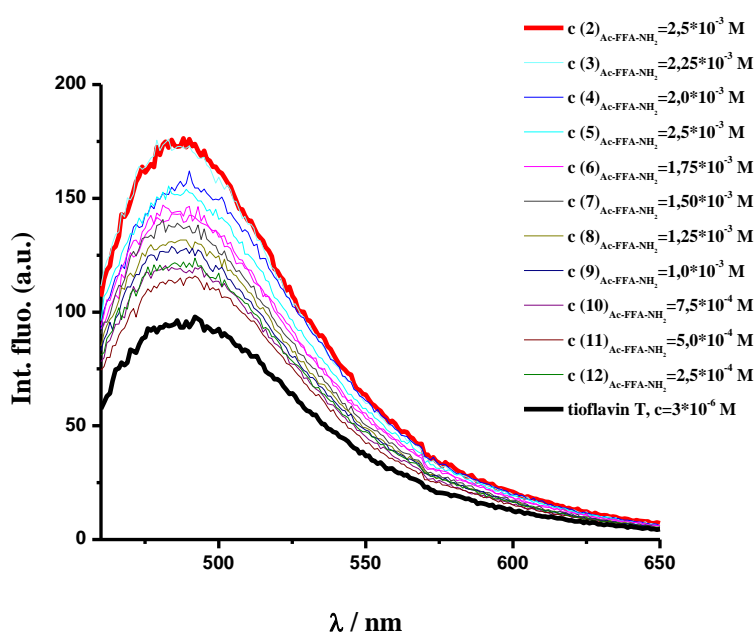
b)

Slika 78. Temperaturno ovisni CD spektri gela **32** u acetonitrilu prilikom a) grijanja i b) hlađenja.

4.6. Interkacija tripeptidnih gelatora s amiloidnim bojama

4.6.1. Interakcija s tioflavinom T

Fluorescencijskom titracijom vodene otopine tripeptida **6** s tioflavinom T dolazi do porasta emisije te boje i formiranja kompleksa stehiometrije 1:1 s konstantom stabilnosti $\log K = 2,48$ (Slika 79.)

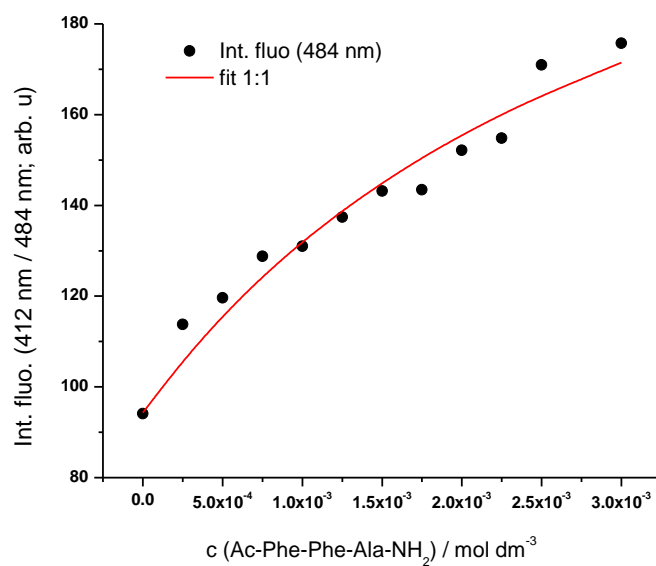


Slika 79. Spektrofotometrijska titracija tripeptida **6** ($c = 3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tioflavinom T ($c = 3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u vodi; $l = 1 \text{ cm}$, $\vartheta = 25^{\circ}\text{C}$.

Konstanta stabilnosti K_s za kompleks ThT/Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ dobivena je obradom emisijskih spektara pomoću programa SPECFIT metodom nelinearne regresije (Tablica 9.). Računato je bez spektra br. 12 ($c_{\text{tripeptida}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$). Najbolje slaganje između eksperimentalnih i izračunatih podataka dobiveno je za stehiometriju kompleksa 1 : 1 (Slika 80.).

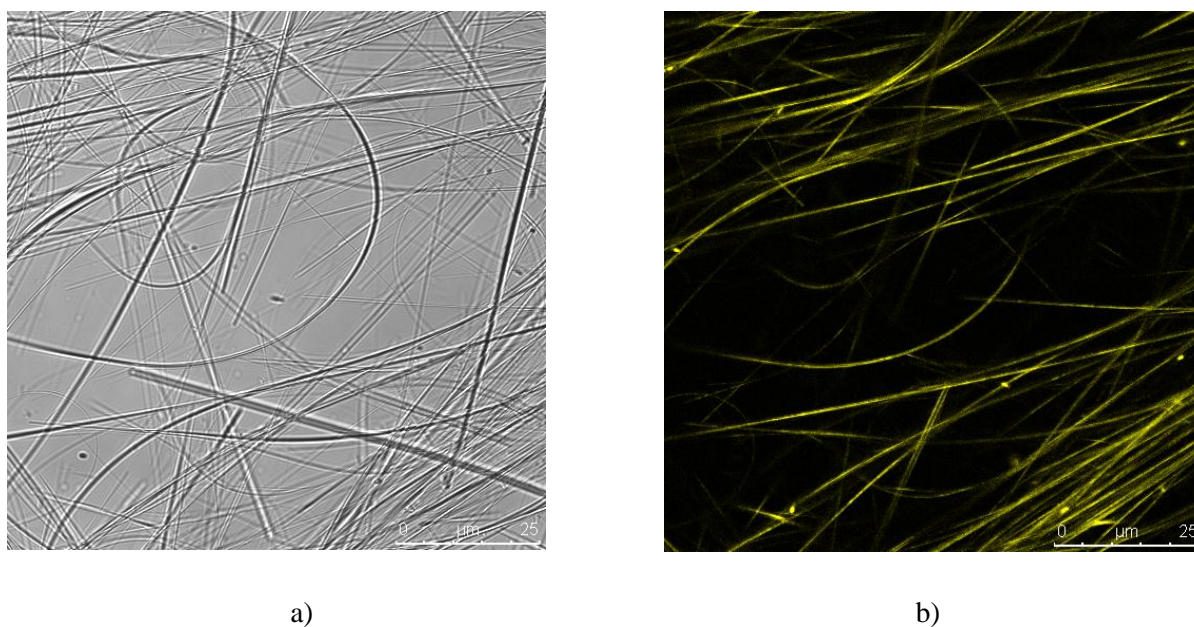
Tablica 9. Podaci dobiveni obradom fluorescencijskih spektara kod titracije tripeptida **6** s tioflavinom T (ThT) u vodi pomoću programa SPECFIT.

$\lambda_{\text{exc}} = 412 \text{ nm}$	SPECFIT
I_0 (računato, čisti ThT)	98
I_{lim} (računato, 11Y, za 100% nastalog kompleksa)	261
ΔI_{tot}	163
%	+167 %
K_{11}	302
$\log K_{11}$	2,48 ± 0,09



Slika 80. Podudaranje eksperimentalnih i izračunatih podataka prilikom titracije ThT-a s tripeptidom **6**.

U literaturi je poznato da se boja tioflavin T veže na minimalno četiri uzastopne β -nabrane ploče pri čemu dolazi do porasta emisije fluorescencije.⁸⁰ Tioflavin T se aromatskim interakcijama veže odnosno interkalira u tzv. hidrofobno-aromatski utor između susjednih fenilnih prstenova. Tioflavin T se veže i na hidrogelske niti tripeptida **6** što je i pokazano laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopijom (Slika 81.). Vodena otopina tioflavina T ($c = 3 \times 10^{-6}$ M) je stavljena iznad pripremljenog hidrogela ($c = 7 \times 10^{-3}$ M). Nakon tri dana boja je penetrirala unutar gela i obojila gelske niti. Na slici 81b gelske niti obojane tioflavinom T su jako dobro vidljive što upućuje da je značajno porasla emisija fluorescencije tioflavina T prilikom vezanja na gelske niti.

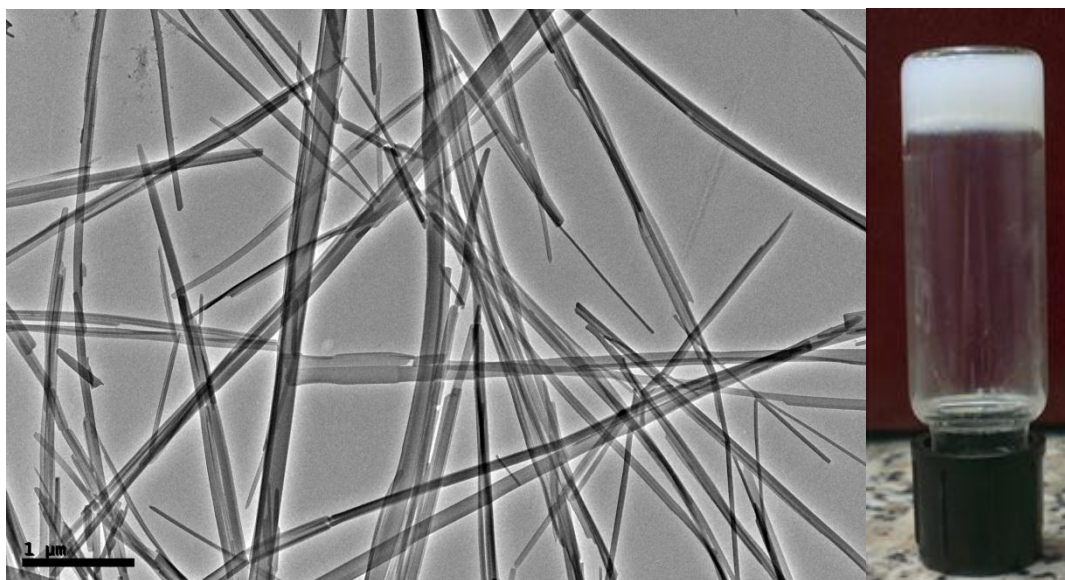


Slika 81. a) slika hidrogelskih niti tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3}$ M) obojenih tioflavinom T ($c = 3 \times 10^{-6}$ M) snimljena laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom u reflektiranom svjetlu; b) slika obojenih hidrogelskih niti snimljena laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom pomoću fluorescencije.

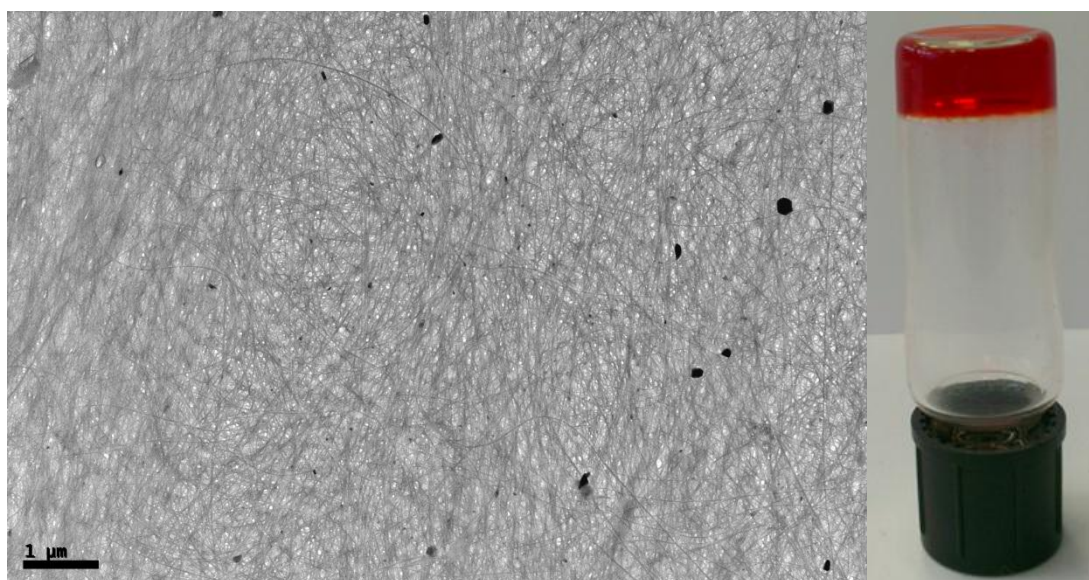
4.6.2. Interakcija tripeptida **6** s kongo-crvenilom

Spektrofluorimetrijskom titracijom vodene otopine tripeptida **6** s kongo-crvenilom ne dolazi do značajnijeg porasta emisije te boje. Kongo-crvenilo ne stvara kompleks s tripeptidom **6** u vodenoj otopini nego s njime tvori proziran gel. Ukoliko se tripeptid **6** zagrijavanjem otopi u vodenoj otopini kongo-crvenila, hlađenjem nastaje stabilan proziran gel. TEM

mikroskopijom je pokazano da dolazi do promjene u morfologiji gelova (Slika 82.). Gel tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3}$ M) s ugrađenim kongo-crvenilom ($c = 1,5 \times 10^{-4}$ M) se sastoji od guste mreže tankih niti promjera 10-15 nm dok TEM mikrografija mutnog hidrogela **6** ($c = 7 \times 10^{-3}$ M) prikazuje prisutnost ravnih širokih traka promjera 50-500 nm.



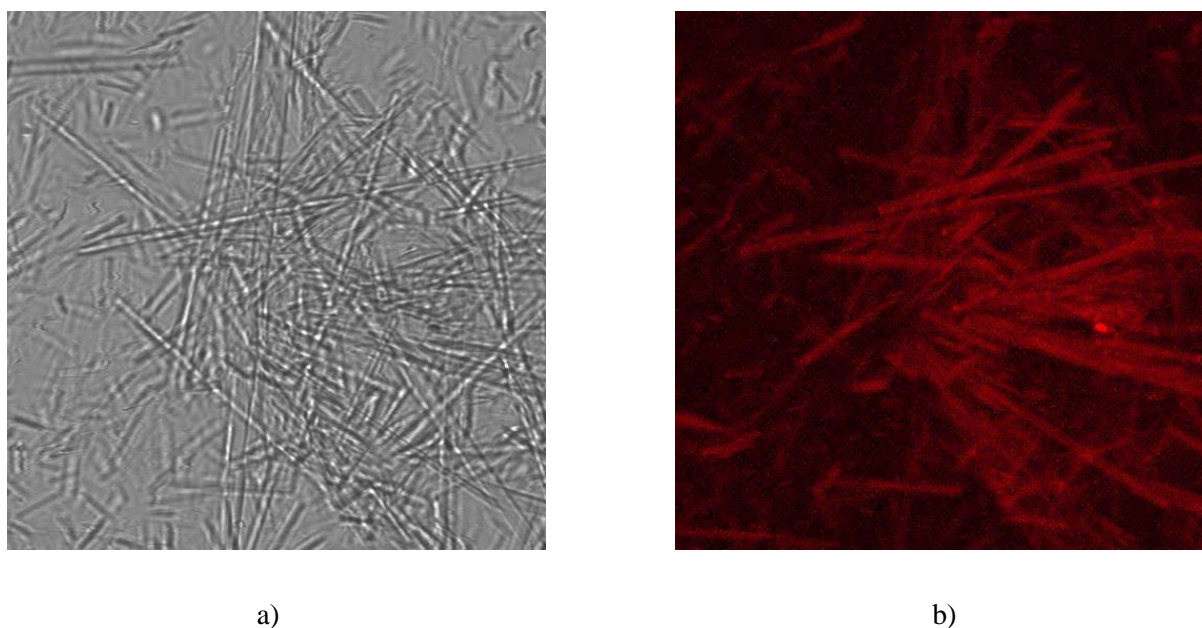
a)



b)

Slika 82. TEM mikrografije sjenčane platinom a) hidrogela tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3}$ M) i b) gela tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3}$ M) s ugrađenim molekulama kongo-crvenila ($c = 1,5 \times 10^{-4}$ M).

Kao i tioflavin T, kongo-crvenilo se također veže na hidrogelske niti što je i pokazano laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopijom, no pritom ne mijenja morfologiju niti (Slika 83.). U usporedbi s tioflavinom T ne dolazi do velike emisije fluorescencije kongo-crvenila prilikom vezanja na niti na što upućuje slabija „vidljivost“ gelskih niti obojenih tom bojom na fluorescentnom mikroskopu (Slika 83b).



Slika 83. a) slika hidrogelskih niti tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3}$ M) obojenih kongo-crvenilom ($c = 1,5 \times 10^{-4}$ M) snimljena laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom u reflektiranom svjetlu; b) slika obojenih hidrogelskih niti snimljena laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom pomoću fluorescencije.

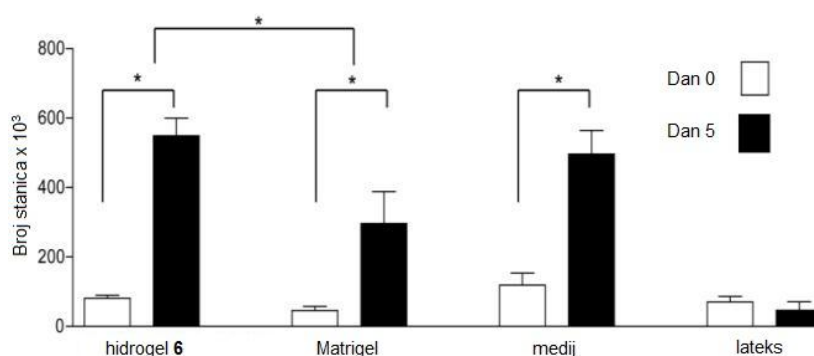
4.7. *In vitro* procjena biokompatibilnosti hidrogela tripeptida Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ - potencijalna primjena u tkivnom inženjerstvu

Kako bi se provjerila biokompatibilnost tripeptidnog hidrogela **6** kao novog biomaterijala napravljeno je serija eksperimenata sa HEK293T - embrionalnim matičnim stanicama bubrega (*eng.* „Human Embryonic Kidney cells“). Eksperimenti su napravljeni u suradnji sa istraživačkom grupom dr.sc. Srećka Gajovića sa Hrvatskog instituta za istraživanje mozga u Zagrebu.

Stanična linija ljudskih embrionalnih matičnih stanica bubrega (HEK) široko je primjenjivana stanična linija još od njene prvotne izolacije 70-ih godina prošlog stoljeća. Ovaj stanični tip se

najčešće koristi u transfekcijama zbog velikog postotka uspješnosti te velike stabilnosti i jednostavnog rukovanja stanicama. Izvor stanica bio je zdrav, abortiran fetus, a staničnu liniju uzgojio je znanstvenik Alex Van der Eb u svom laboratoriju na Sveučilištu u Leidenu u Nizozemskoj. Transformaciju je izvršio Frank Graham, znanstvenik iz istoga laboratorija koji je osmislio tehniku transformacije stanica pomoću kalcijeva fosfata.⁸¹ Ime HEK293T proizlazi iz činjenice da je to bio Grahamov 293 eksperiment. Godinama se smatralo da su HEK293T stanice epidermalnog porijekla. Prisutnost značajnih količina neurofilamentnih (NF) podjedinica tipičnih za živčane stanice, podupire hipotezu da su HEK293T stanice ipak živčanog porijekla i pokazuju svojstva nezrelih neurona te su prema tome prikladne za biološka ispitivanja u živčanom tkivnom inženjerstvu.⁸² S obzirom da su reproducibilan stanični tip, HEK293T stanice su jednostavan stanični model često upotrebljavan u istraživanjima citokompatibilnosti hidrogelova kao biomaterijala.⁸³

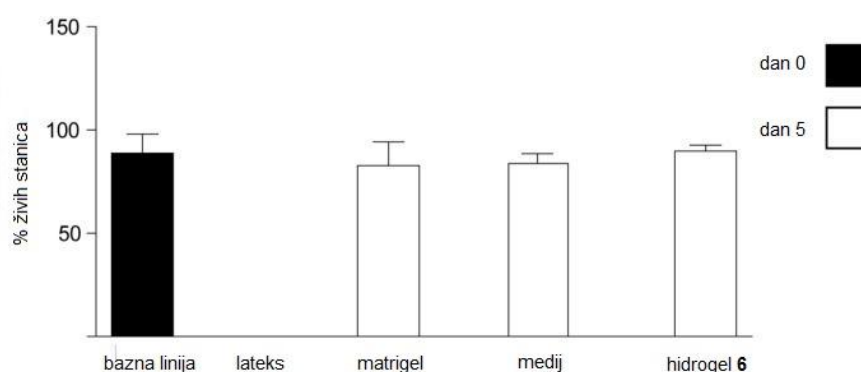
U Eksperimentalnom dijelu rada opisan je pokus u kojem su stanice HEK293T pomiješane s otopinom tripeptida **6** u fiziološkoj otopini. Stanice HEK293T su miješanjem sa otopinom tripeptida potaknule samoudruživanje molekula u hidrogel i preživjele stvaranje trodimenzionalne mreže niti okolo njih. Rezultati testa PicoGreen su pokazali da stanice HEK293T dobro proliferiraju unutar mreže niti u hidrogelu jer je peti dan ukupni broj stanica bio značajno veći u odnosu na nulti dan (Slika 84.).



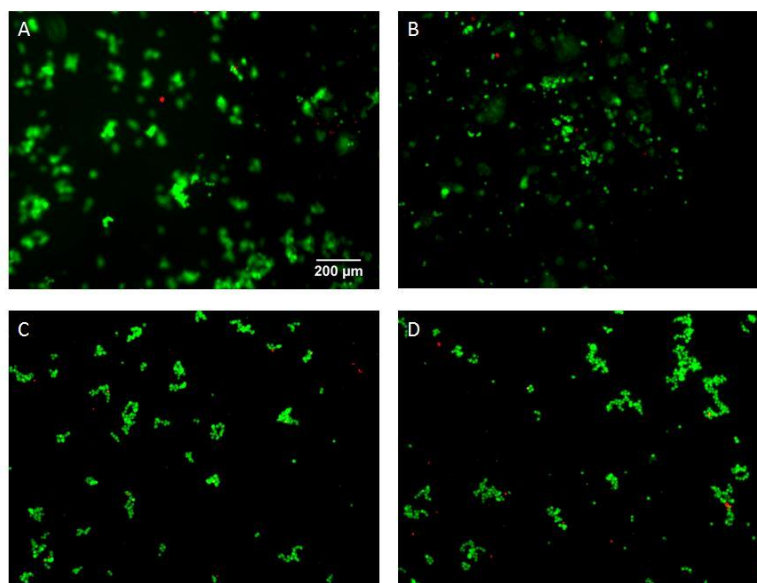
Slika 84. Grafički prikaz povećanja broja stanica HEK293T u hidrogelu **6** u odnosu na ostale medije. Broj stanica u hidrogelu, Matrigelu i lateksu je određen testom Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA na dan 0 i 5. Rezultati pokazuju srednje vrijednosti rezultata \pm SD za 4 nezavisna eksperimenta izvedena tri puta.

Kao što je bilo očekivano, ukupan broj stanica se značajno povećao kod dvije pozitivne kontrolne grupe (Matrigel i medij) te smanjio u negativnoj kontrolnoj grupi (lateks). Broj stanica je peti dan mjerenja bio značajno veći u uzorcima hidrogela tripeptida **6** u odnosu na Matrigel (549.20 ± 25.17 vs. 296.40 ± 92.11 , t-test, $p < 0.05$). Hidrogel se pokazao učinkovit u povećanju proliferacije stanica do 5 dana uzgajanja. Osim toga, dobiveni rezultati ukazuju na prednost tripeptidnog hidrogela u odnosu na Matrigel u smislu uzgoja i rasta stanica. Za vrijeme eksperimenta manji dio stanica je istaložio na dnu jažica, no velika većina stanica je ostala u hidrogelu i stvorila aglomerate. Matrigel se dosada pokazao kao prikladan medij za kultiviranje stanica, no s obzirom da je to prirodni material nije reproducibilan. Takav nedostatak se može ukloniti upotrebom sintetičkih biomaterijala kao što je hidrogel tripeptida **6**.

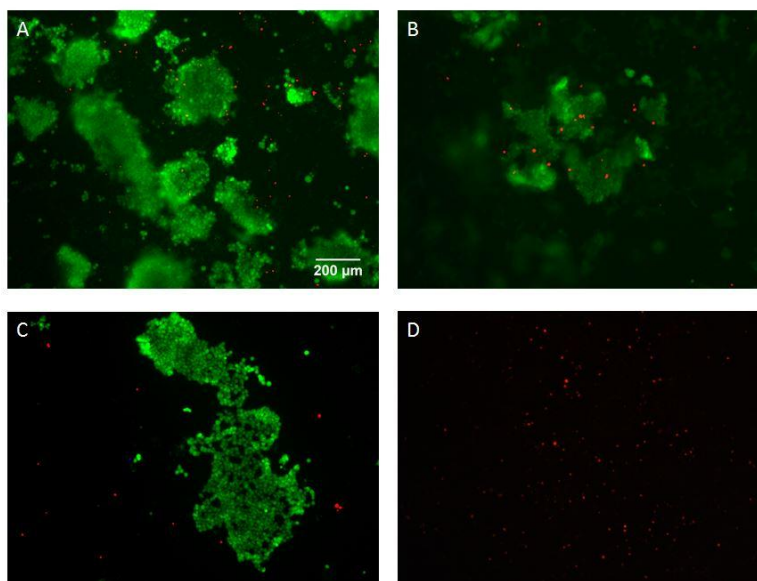
Preživljenje stanica je ispitano posebnim test za određivanje živih i mrtvih stanica (*eng.* LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay) i izraženo je kao postotak živih stanica u ukupnom broju stanica. Preživljenje HEK293T stanica je bilo visoko u svim uzorcima osim kod lateksa gdje nije bilo preživjelih stanica petog dana mjerenja (Slike 85. - 87.).



Slika 85. Grafički prikaz preživljenja stanica u tripeptidnom hidrogelu, mediju, Matrigelu i lateksu. Postotak živih stanica određen je testom (LIVE/DEAD assay) na nulti i 5. dan za stanice HEK293T unutar hidrogela tripeptida **6** te stanice uzgojene an matrigelu, lateksu ili u mediju. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica i prikazuju srednju vrijednost \pm SD za 4 nezavisna eksperimenta izvedena tri puta.



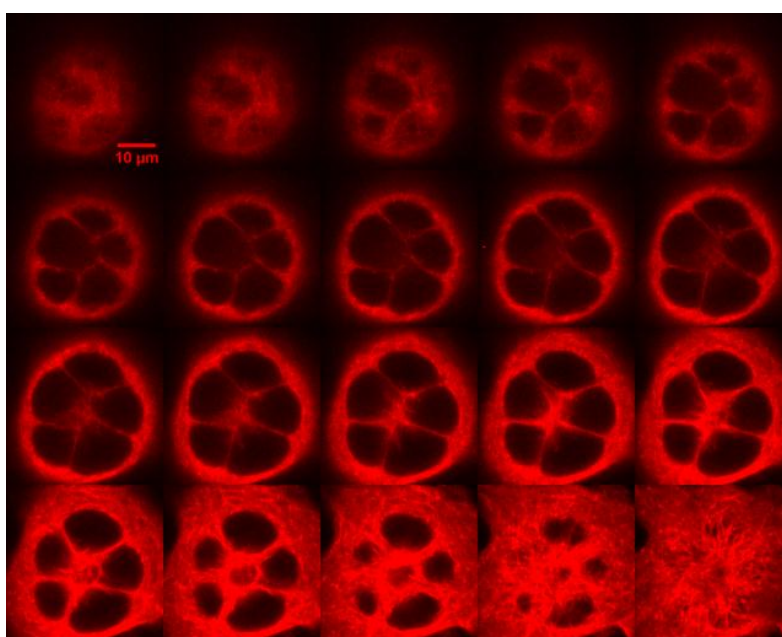
Slika 86. Stanice HEK293T u A) hidrogelu **6**, B) Matrigelu, C) mediju, D) lateksu. Nulti dan eksperimenta. Žive stanice su zelene, a mrtve crvene. Povećanje 10x, mjerna skala se odnosi na sve slike.



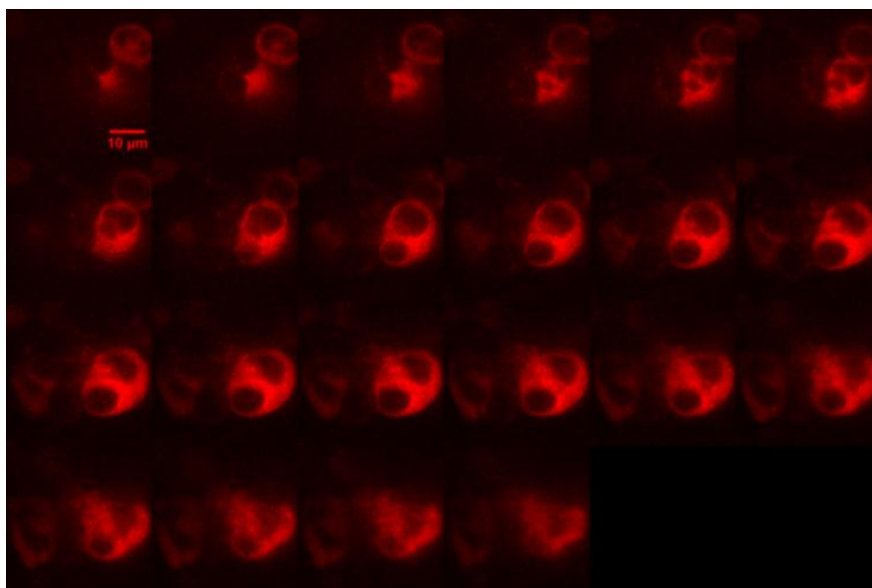
Slika 87. Stanice HEK293T u A) hidrogelu **6**, B) Matrigelu, C) mediju, D) lateksu. 5. dan eksperimenta. Žive stanice su zelene, a mrtve crvene. Povećanje 10x, mjerna skala se odnosi na sve slike.

Nije bilo značajnije razlike u postotku živih stanica između stanica HEK293T kultiviranih u matrigelu ($82,7 \pm 5,79\%$), mediju ($83,78 \pm 1,43\%$) ili tripeptidnom hidrogelu **6** ($89,78 \pm$

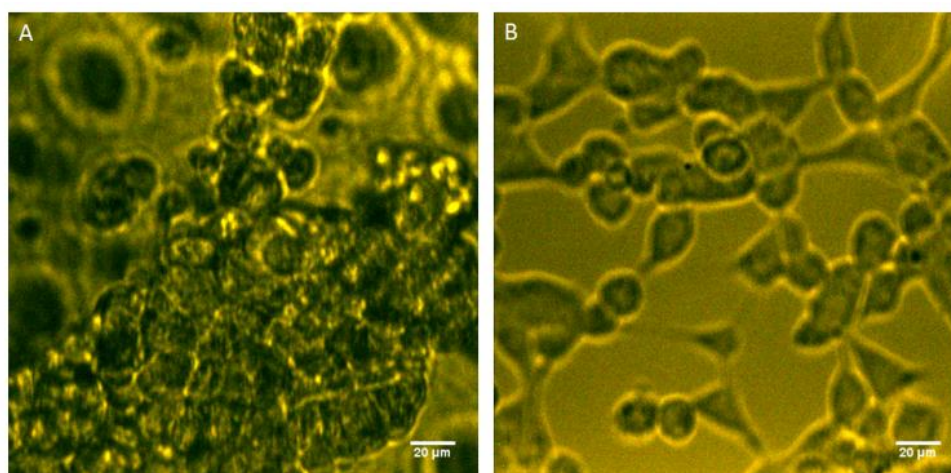
1,43%). Konfokalnim mikroskopom promatrana je morfolgija stanica transfeciranih s plazmidom tubulin-mCherry u tripeptidnom hidrogelu u usporedbi sa stanicama uzgojenim u mediju. Stanice uzgojene u hidrogelu stvaraju agregate koji su vidljivi u rasponu različitih z ravnina dok stanice uzgajane u mediju se priljepe za površinu jažice i vidljive su u istim z ravninama (Slike 88. i 89.). Uz to, stanice su vizualizirane pod jarkim svjetlom te se stanice koje pripadaju jednom agregatu unutar hidrogela jasno razlikuju od stanica iz drugih agregata tj, u fokusu su mikroskopa dok su ostale „mutne“ (Slika 90.).



Slika 88. Stanice HEK293T transfecirane sa plazmidom tubulin-mCherry, uzgojene u mediju i promatrane na konfokalnom mikroskopu nakon 72 h. Stanice su na dnu jažice i vidljive su u istim z ravninama. Povećanje 100x, mjerna skala se odnosi na sve slike.



Slika 89. Stanice HEK293T transfecirane sa plazmidom tubulin-mCherry, uzgojene u hidrogelu **6** i promatrane na konfokalnom mikroskopu nakon 72 h. Stanice stvaraju agregate unutar hidrogela i vidljive su u različitim z ravninama. Povećanje 100x, mjerna skala se odnosi na sve slike.



Slika 90. Stanice HEK293T uzgojene u: A) hidrogelu **6** i B) mediju promatrane 72 h nakon enkapsulacije. Jasni dijelovi slike s mikroskopa pokazuju stanične agregate unutar hidrogela dok su stanice uzgojene u mediju priljepljene uz površinu. Povećanje 20x.

5. ZAKLJUČAK

Koristeći klasične sintetske metode peptidne kemije u otopini sintetizirano je dvadesetak novih tripeptida koji u svojoj strukturi sadrže različite kombinacije aminokiselinske sekvence (FFA, FAF, AFF) s različitim zaštitnim grupama na *N* i *C* terminalnim završecima. Ispitana su gelirajuća svojstva novih spojeva u vodi, organskim otapalima i smjesama različitih otapala. Acetilni tripeptidi s aminokiselinskom sekvencom FFA (Phe-Phe-Ala) pokazali su se kao dobri gelatori vode i polarnih otapala, ali i aromatskih otapala. Amidni tripeptid **6** je dobar gelator vode (hidrogelator) i polarnih otapala. Njegov lipofilniji derivat, metilni ester **5** slabije gelira vodu, ali je dobar gelator aromatskih otapala. Acetilni tripeptidi s ostalim aminokiselinskim sekvencama (FAF i AFF) bez obzira što su hidrofilni kao i tripeptid **6** pokazali su izrazito slaba gelirajuća svojstva. Tripeptid **11** (FAF) gelira samo tetralin dok tripeptid **18** (AFF) gelira samo smjesu otapala DMSO-H₂O. Ovi rezultati dokazuju da je za samoudruživanje gelatora u nitaste agregate najpovoljnija sekvenca FFA. Novi butirilni tripeptidi s aminokiselinskom sekvencom FFA su također pokazali slaba gelirajuća svojstva. Od butirilnih tripeptida, **22** gelira samo etil-acetat dok tripeptid **23** gelira etanol i smjese otapala, EtOH-H₂O i DMSO-H₂O. Lipofilni tripeptidi s benziloksikarbonilom (*Z*) kao zaštitnom skupinom na *N*-terminalnoj strani (**28**, **32** i **37**) su se pokazali kao jako efikasni gelatori aromatskih otapala (*o*-, *m*- i *p*-ksilena i tetralina) te dekalina. Od polarnih otapala tripeptidi **28** i **32** geliraju acetonitril dok **28** gelira i smjesu otapala DMSO-H₂O.

Morfologija gelskih niti određena je transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM). Opažena je jasna ovisnost morfologije gelova o utjecaju otapala različite polarnosti. Povećanjem polarnosti otapala povećava se udio traka u gelu kao i njihova širina. Ovo opažanje može se objasniti solvacijskim efektima, koji u slučaju polarnih otapala induciraju nastanak vrlo širokih traka višeslojne strukture da bi se izbjegla nepovoljna solvatacija vanjske lipofilne površine agregata. Gelatori koji tvore guste gelske mreže koje se sastoje od vrlo tankih niti vrlo efikasno geliraju velike količine otapala. TEM mikroskopija je kod svih gelova potvrdila prisutnost gelske mreže koja se sastoji od izduženih niti ili traka nanometarskih dimenzija tj. promjera i duljine niti u mikrometrima.

Samoorganizacija molekula i supramolekularne interakcije u tripeptidnim gelovima studirana je NMR, FTIR, UV-Vis i CD spektroskopijom. Temperaturno ovisni ^1H NMR spektri gelova tripeptida **5**, **6**, **28** i **32** u acetonitrilu su pokazali kemijske pomake amidnih protona u viša magnetska polja s povećanjem temperature od 25 °C (gel) do 75 °C(sol) uslijed deagregacije gelske mreže u manje agregate što upućuje na uključenost amidnih protona u intermolekularne vodikove veze između molekula gelatora. ^1H NMR NOESY spektri tripeptida **5** i **6** u d_3 -acetonitrilu ukazuju na jake NOE interakcije. Pomoću računalnog programa SYBYL minimizirane su strukture tripeptida **5** i **6** (strukture s minimalnom energijom) i izmjerene udaljenosti između skupina unutar iste molekule koje su u NOESY spektrima pokazale interakcije. Sve izmjerene intramolekularne udaljenosti su veće od 4 Å pa se navedene interakcije između spomenutih skupina ne mogu ostvariti unutar iste molekule već između molekula tripeptida (intermolekularne interakcije). NOESY spektroskopija ukazuje na potencijalnu strukturu antiparalelno orijentirane β -ploče acetonitrilnih gelova tripeptida **5** i **6**. Temperaturno ovisni ^1H NMR spektri su potvrdili uključenost pojedinih amidnih protona u vodikovim vezama između molekula tripeptida **5** i **6** u acetonitrilnim gelovima. FTIR spektroskopijom su praćene intermolekulske interakcije u gelovima, posebno vodikove veze i njihove promjene pod utjecajem temperature. Snimljeni su temperaturno ovisni FTIR spektri gelova tripeptida **5**, **6**, **28** i **32** u acetonitrilu te tripeptida **5** u toluenu. Iz temperaturno ovisnih FTIR spektara gelova navedenih spojeva u acetonitrilu i toluenu, vidljivo je da njihovim grijanjem polako dolazi do narušavanja strukture gela i pomicanja ravnoteže u smjeru nastanka slobodnih solvatiranih molekula što je vidljivo iz povećanja intenziteta vrpce koje odgovaraju istežanju amidnih skupina koje nisu u vodikovoj vezi. Proces stvaranja gela je termoreverzibilan pa su tako promjene sol-gel stanja zabilježene i u ciklusu hlađenja. FTIR spektri gelova navedenih tripeptida u acetonitrilu i toluenu ukazuju na potencijalnu strukturu β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama. Snimljeni su FTIR spektri kserogelova (osušenih gelova). FTIR spektri kserogelova **5** i **6** iz vode (osušenih hidrogelova) te gelova tripeptida **5** i **6** iz acetonitrila ukazuju na potencijalnu strukturu β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama. Karakteristične vrpce istežanja amida I i amida II u FTIR spektrima kserogelova **5** i **6** iz vode te iz acetonitrila su vrlo slične što ukazuje na mogućnost sekundarne strukture β -nabrane ploče. S obzirom da je NOESY spektroskopija potvrdila antiparalelnu orijentaciju β -nabrane ploče u acetonitrilnim gelovima tripeptida **5** i **6**, takva struktura je vrlo vjerojatno zastupljena i u hidrogelovima **5** i **6** s

obzirom na sličnost FTIR spektara kserogelova tih tripeptida iz acetonitrila i vode. Vrpce istezanja amida I i amida II u FTIR spektrima kserogelova *Z*-zaštićenih tripeptida **28**, **32** i **37** iz acetonitrila i izomera ksilena ukazuju na sekundarnu strukturu β -nabrane ploče. UV/Vis spektri hidrogelova tripeptida **5** i **6** u usporedbi s vodenom otopinom ukazuju na postojanje slabih aromatskih π - π interakcija u hidrogelovima koji zajedno s vodikovim vezama doprinose sekundarnoj strukturi β -nabrane ploče u hidrogelovima **5** i **6**. Temperaturno ovisni spektri cirkularnog dikroizma (CD) hidrogela tripeptida **6** te tripeptida **28** i **32** u acetonitrilu upućuju na potencijalnu sekundarnu strukturu β -nabrane ploče u gelovima. Osnovna reološka mjerenja su pokazala da je tripeptidni hidrogel **6** umjereno čvrst viskoelastični materijal. Zbog sličnih mehaničkih svojstava s ostalim malim peptidnim hidrogelovima koji se upotrebljavaju u tkivnom inženjersvu, hidrogel tripeptida **6** bi mogao pronaći potencijalnu primjenu kao novi biomaterijal u biomedicini.

Tripeptid **6**, kao najefikasniji gelator vode u fiziološkim uvjetima veže amiloidne boje, tioflavin T i kongo-crvenilo. Fluorescencijskom titracijom vodene otopine tripeptida **6** s tioflavinom T dolazi do porasta emisije boje i nastajanja kompleksa stehiometrije 1:1 s konstantom stabilnosti $\log K = 2.48$. Spektrofluorimetrijskom titracijom vodene otopine tripeptida **6** s kongo-crvenilom ne dolazi do značajnijeg porasta emisije te boje. Kongo-crvenilo ne stvara kompleks s tripeptidom **6** u vodenoj otopini, već se ugrađuje u vlakna i pri tome mijenja morfolofiju vlakana tvoreći proziran gel. Zapaženo je da tripeptid **6** otopljen u vrućoj vodenoj otopini kongo-crvenila, hlađenjem te otopine daje stabilan proziran gel. Molekule kongo-crvenila se ugrađuju u hidrogel i mijenjaju način slaganja tripeptida u gelu što pokazuje promjena u morfologiji hidrogela. TEM je pokazao da ugradnjom kongo-crvenila u tripeptidni hidrogel dolazi do stvaranja gelske mreže koja se sastoji od tankih niti promjera 10-15 nm. Hidrogelska mreža tripeptida **6** se sastoji od ravnih traka i niti promjera 50-100 nm. Tioflavin T uspješno penetrira u hidrogel i pritom se veže na hidrogelske niti pri čemu se povećava emisija fluorescencije pa se tako obojene niti jako dobro mogu pratiti laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom. U literaturi je poznato da se tioflavin T jako dobro veže na β -nabrane ploče uz povećanje emisije fluorescencije. Navedeno svojstvo je u suglasnosti sa spektroskopskim mjerenjima (FTIR, NMR, CD) koja su pokazala da se hidrogel sastoji od β -nabranih ploča. Laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom dokazano je da se kongo-crvenilo također veže na hidrogelske niti pritom im ne mijenjajući morfolofiju. Prilikom vezanja na hidrogelske niti ne dolazi do značajne emisije fluorescencije

što je rezultirano smanjenom „vidljivošću“ obojenih niti pod fluorescentnim konfokalnim mikroskopom.⁸⁴

Hidrogel tripeptida **6** omogućio je u fiziološkim uvjetima preživljenje i proliferaciju stanica HEK293T *in vitro* te se pokazao kao obećavajući novi kandidat za primjenu u tkivnom inženjerstvu.⁸⁵ Dosadašnja istraživanja su pokazala da bi novosintetizirani bioinspirirani hidrogelator **6** mogao izdvojiti kao potencijalni minimalistički model agregiranog A β -proteina i omogućiti razvoj i dizajn novih efikasnijih molekula inhibitora ili detektora agregiranja.

6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – alanin

Abs – apsorbancija

A β – amiloid- β protein

Ac – acetilna skupina

AFM – *eng.* Atomic Force Microscopy (spektroskopija atomskih sila)

APP – amiloid-prekursorski protein

bs – *eng.* broad singlet (prošireni singlet)

Boc – *tert*-butiloksikarbonilna zaštitna skupina

Cbz - benziloksikarbonilna zaštitna skupina

CD – cirkularni dikroizam

COSY – *eng.* correlation spectroscopy

d – dublet u NMR spektroskopiji

Da – dalton

DAPI – 4', 6-diamidin-2-fenilindol

DCC – *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

DCHU – *N,N'*-dickloheksilurea

dd – dublet dubleta u NMR spektroskopiji

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – *eng.* deoxyribonucleic acid (deoksiribonukleinska kiselina)

dt – dublet tripleta u NMR spektroskopiji

E – glutaminska kiselina

EM – elektronska mikroskopija

ESEM – *eng.* Environmental Scanning Electron Microscopy

Et₃N – trietilamin

EtOAc – etil-acetat

EtOH – etanol

F – fenilalanin

FDA – *eng.* Food and Drug Administration (Američka agencija za hranu i lijekove)

Fmoc – fluorenilmetilokarbonilna zaštitna skupina

FTIR – *eng.* Fourier Transform Infrared

G – glicin

H – histidin

HEK293T – *eng.* Human Embryonic Kidney Cells

HRMS – *eng.* High Resolution Mass Spectrometry

HRTEM – *eng.* High Resolution Transmission Electron Microscopy

I - izoleucin

IR – *eng.* infrared (infracrveno elektromagnetsko zračenje)

K – lizin

L – leucin

M – metionin

m – meta položaj na benzenu

MALDI-TOF/TOF – matricom matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja -analizator masa s vremenom leta

MB – metilen-plava

MeCN – acetonitril (CH₃CN)

MeOH – metanol

MS – masena spektroskopija

NMR – *eng.* Nuclear Magnetic Resonance (nuklearna magnetska rezonancija)

NOESY – *eng.* Nuclear Overhauser Effect

o – orto položaj na benzenu

P - prolin

p – para položaj na benzenu

PBS – *eng.* phosphate-buffered saline (fosfatni pufer)

PET – pozitronska emisijska tomografija

Ph – fenilna skupina

Phe – fenilalanin

PIB – eng. Pittsburgh Compound B ($[^{11}\text{C}]$ PIB) – radioobilježivač

pWk – kalijeve sol fosfowolframske kiseline

Q – glutamin

q – kvartet u NMR spektroskopiji

s – singlet u NMR spektroskopiji

S – serin

SANS – eng. Small-angle Neutron Scattering

SAXS – eng. Small-angle X-ray Scattering

SEM – pretražna elektronska mikroskopija

T – treonin

t – triplet u NMR spektroskopiji

TEM – transmisijska elektronska spektroskopija

TFA – eng. trifluoroacetic acid (trifluoroctena kiselina)

T_g – temperatura tališta gela

THF – tetrahidrofur

ThT – tioflavin T

TLC – eng. Thin Layer Chromatography (tankoslojna kromatografija)

TMS – tetrametilsilan

t.t. – temperatura tališta

UV/Vis – eng. ultraviolet/visible (ultraljubičasto/vidljivo elektromagnetsko zračenje)

WHO – eng. World Health Organisation (Svjetska zdravstvena organizacija)

XRD – eng. X-ray Diffraction

Z- benziloksikarbonilna zaštitna skupina

δ – oznaka za kemijski pomak u NMR spektroskopiji

7. LITERATURNI IZVORI

1. a) J. Makarević, M. Jokić, L. Frkanec, V. Čaplar, N. Šijaković-Vujičić i M. Žinić, *Beilstein J. Org. Chem.* **6** (2010) 945-959; b) C. Tomasini i N. Castellucci, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 156-172; c) L. Chang-Wei, S. Ming, L. Xue-Liang, X. Teng, L. Na, Y. Jun, Z. Yuan-Yuan i W. Zong-Quan, *Soft Matter* **11** (2015) 5727-5737.
2. a) P. Terech i R.G. Weiss, *Chem. Rev.* **97** (1997) 3133-3160; b) B. Escuder i J. F. Miravet (Eds), *Functional Molecular Gels*, RSC, Cambridge, 2014, pp 1-29.
3. R. Jakob-Roetne i M. Jacobsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** (2009) 3030-3059.
4. E. Gazit, *FEBS J.* **272** (2005) 5971-5978.
5. C.J. Stains, K. Mandal i J. Ghosh, *ChemMedChem* **2** (2007) 1674-1692.
6. a) M. Biancalana i S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta* **1804** (2010) 1405-1412; b) K. Yokoyama, A.D. Fisher, A.R. Amori, D.R. Welchons i R.E. McKnight, *J. Biophys. Chem.*, **1** (2010) 153-163.
7. a) T. J. Eckroat, A. S. Mayohoub i S. Garneau-Tsodikova, *Beilstein J. Org. Chem.* **9** (2013) 1012-1044; b) A. Francioso, P. Punzi, A. Boffi, C. Lori, S. Martire, C. Giordano, M. D'Erme i L. Mosca, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2015) 1671-1683.
8. a) H.A. Lashuel, S.R. LaBrenz, L.Woo, L.C. Serpell i J.W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 5262-5277; b) S.-Y. Qin, Y. Pei, X.-J. Liu, R.-X. Zhuo i X.-Z. Zhang, *J. Mater. Chem. B* **1** (2013) 668-675.
9. H. Cui, M.J. Webber i S.I. Stupp, *Biopolymers*, **94** (2010) 1-18.
10. J. M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (2002) 4763-4768.
11. G. M. Whitesides i B. Grzybowski, *Science* **295** (2002) 2418-2421.
12. a) D. W. Deamer, *Nature* **454** (2008) 37-38; b) D. Deamer, J. P. Dworkin, S. A. Sandford, M. P. Bernstein i L. J. Allamandola, *Astrobiology* **2** (2002) 371-381; c) J. T. Trevors i R. Psenner, *FEMS Microbiol. Rev.* **25** (2001) 573-582.
13. K. Petkau-Milroy i I. Brunsveld, *Org. Biomol. Chem.* **11** (2013) 219-232.
14. J. M. Lehn, *Science* **227** (1985) 849-856.
15. C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 7017-7036.
16. a) R. Dong, Y. Zhou, X. Huang, X. Zhu, Y. Lu i J. Shen, *Adv. Mater.* **27** (2015) 498-526; b) E. Busseron, Y. Ruff, E. Moulin i N. Giuseppone, *Nanoscale* **5** (2013) 7098-7140; c) T. Aida, E.W. Meijer i S.I. Stupp, *Science* **335** (2012) 813-817.
17. J. S. Lee i J. Feijen, *J. Controlled Release* **161** (2012) 473-483.

18. D. Chandler, *Nature* **437** (2005) 640-647.
19. N. Stephanopoulos, J.H. Ortony i S.I. Stupp, *Acta Mater.* **61** (2013) 912-930.
20. Y.-B. Lim, K.-S. Moon i M. Lee, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2008) 925-934.
21. a) D.-S. Guo i Y. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 5907-5921; b) Y. Liu, H. Yang, Z. Wang; X. Zhang, *Chem. Asian J.* **8** (2013) 1626-1632.
22. a) A. C. Mendes, E. T Baran, R. L. Reis i H. S. Azevedo, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **5** (2013) 582-612; b) R.V. Ulijn, A. M. Smith, *Chem.Soc. Rev.* **37** (2008) 664-675.
23. a) A. Roy, O.L. Franco i S.M. Mandal, *Curr. Protein Pept. Sci.* **14** (2013) 580-587; b) J.B. Matson i S.I. Stupp, *Chem. Commun.* **48** (2012) 26-33.
24. D. Mandal, A. Nasrolahi Shirazi i K. Parang, *Org. Biomol. Chem.* **12** (2014) 3544-3561.
25. M. Zelzer i R.V. Ulijn, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 3351-3357.
26. T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo i C.M. Dobson, C. M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** (2014) 384-396.
27. Web stranica www.alz.co.uk/research/statistics
28. I. W. Hamley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** (2007) 8128-8147.
29. a) D. Thirumalai i G. Reddy, *Nature Chem.* **3** (2011) 910-911; b) A.J. Baldwin, T.P.J. Knowles, G.G. Tartaglia, A.W. Fitzpatrick, G.L. Devlin, S.L. Shammas, C. A. Waudby, M.F. Mossuto, S. Meehan, S.L. Gras, J. Christodoulou, S.J. Anthony-Cahill, P.D. Barker, M. Vendruscolo i C.M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 14160-14163, c) E. Gazit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (2002) 257-259.
30. A. Rauk, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 2698-2715.
31. R. Khurana, V.N.Uversky, L.Nielsen i A.L. Fink, *J. Biol.Chem.* **276** (2001) 22715-22721.
32. A.J. Howie i D.B. Brewer, *Micron* **40** (2009) 285-301.
33. a) A. Lakshmanan, D.W. Cheong, A. Accardo, E. Di Fabrizio, C. Riekkel, C. A. E. Hauser, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110** (2013) 519-524; b) E. Gazit, *Prion* **1** (2007) 32-35; c) M. López de la Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, C.M. Dobson, A. Hoenger i L. Serrano, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (2002) 16052-16057.
34. a) A. Dehsorkhi, V. Castelletto i I.W. Hamley, *J. Pept. Sci.* **20** (2014) 453-467; b) M.J. Webber, E.J. Berns i S.I. Stupp, *Isr. J. Chem.* **53** (2013) 530-554; c) M. J. Webber, J. Tongers, C.J. Newcomb, K. -T. Marquardt, J. Bauersachs, D.W. Losordo i S.I. Stupp, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108** (2011) 13438-13443; d) R. N. Shah, N. A. Shah, M.M. Del Rosario Lim, C. Hsieh, G. Nuber i S.I. Stupp, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107** (2010) 3293-3298; e) H. Cui, M. J. Webber i S.I. Stupp, *Peptide Science* **94** (2010) 1-18.

35. C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C.L. Masters i K. Beyreuther, *J. Mol. Biol.* **228** (1992) 460-473.
36. L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A.R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius i C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 8545-8548.
37. L.O. Tjenberg, D.J.E. Callaway, A. Tjenberg, S.Hahne, C. Lilliehöök, L. Terenius, J. Thyberg i C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 12619-12625.
38. D. J Gordon, R. Tappe i S.C. Meredith, *J. Pept. Res.* **60** (2002) 37-55.
39. M.J. Krysmann, V. Castelletto, A. Kellarakis, I.W. Hamley, R.A. Hule i D.J. Pochan, *Biochemistry* **47** (2008) 4597-4605.
40. K. Lu, J. Jacob, P. Thiyagarajan, V.P. Conticello i D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 6391-6393.
41. J.J. Balbach, Y. Ishii, O.N. Antzutkin, R.D. Leapman, N.W. Rizzo, F. Dyda, J. Reed i R. Tycko, *Biochemistry* **39** (2000) 13748-13759.
42. F.T. Senguen, N.R. Lee, X. Gu, D.M. Ryan, T.M. Doran i E.A. Anderson i B.L. Nilsson, *Mol. Biosyst.* **7** (2010) 486-496.
43. a) E. Gazit, *Prion* **1** (2007) 32-35; b) O.S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson i L.C. Serpell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102** (2005) 315-320.
44. K.E. Marshall, K.L. Morris, D. Charlton, N. O'Reilly, L. Lewis, H. Walden i L.C. Serpell, *Biochemistry* **50** (2011) 2061-2071.
45. A. A. Profit, V. Felsen, J. Chinwong, E.-R. E. Mojica i R. Z. B. Desamero, *Proteins: Struct.Funct. Bioinf.* **81** (2013) 690-703.
46. a) M. Reches i E. Gazit, *Science* **300** (2003) 625-627; b) E.Gazit, *FASEB* **16** (2002) 77-83.
47. T.M. Doran, A.J. Kamens, N.K. Byrnes i B.L. Nilsson, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **80** (2012) 1053-1065.
48. R. Liu, R. Su, M. Liang, R. Huang, M. Wang, W. Qi i Z. He, *Curr. Med. Chem.* **19** (2012) 4157-4174.
49. H. A. Lashuel, D. Hartley, B.M. Petre, T. Walz i P.T. Lansbury, *Nature* **418** (2002) 291-291.
50. A. Francioso, P. Punzi, A. Boffi, C. Lori, S. Martire, C. Giordano, M. D'Erme i L. Mosca, *Bioorg. Med.Chem.* **23** (2015) 1671-1683.
51. a) J. Luo i J.P. Abrahams, *Chem.Eur. J.* **20** (2014) 2410-2419; b) M. Richman, S. Wilk, M. Chemerovski, S. K. T. S. Wärmländer, A. Wahlström, A. Gräslund i S. Rahimipour, *J. Am. Chem.Soc.* **135** (2013) 3474-3484.
52. a) C.A. Hawkes, V.Ng i J. Melaurin, *Drug. Dev. Res.* **70** (2008) 111-124; b) B.Anthony USP 8859020 B2, 2014

53. T.J. Eckroat, A.S. Mayohouk i S. Garnen-Tsodikova, *Beilstein J. Org. Chem.* **9** (2013) 1012-1044.
54. a) R.G. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) 7519-7530; b) A.R. Hirst, B. Escuder, J.F. Miravet i D.K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 8002-8018.
55. J. Raeburn, A.Z. Cardoso i D.J. Adams, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 5143-5156.
56. a) B. Escuder i J. F. Miravet (Eds), *Functional Molecular Gels*, RSC, Cambridge, 2014, pp 30-59; b) G. Yu, X. Yan, C. Han i F. Huang, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 6697-6722.
57. a) A. Dasgupta, J.H. Mondal i D. Das, *RSC Advances* **3** (2013) 9117-9149; b) A. M. Jonker, D. W. P. M. Löwik i J. C. M. van Hest, *Chem. Mater.* **24** (2012) 759-773.
58. a) H. Dong, S. E. Paramonov, L. Aulisa, E. L. Bakota i J.D. Hartgerink, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 12468-12472; b) J. P. Schneider, D.J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Pakstis i J. Kretsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 15030-15037; c) A. Aggeli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. B. McLeish, A.N. Semenov i N. Boden, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98** (2001) 11857-11862.
59. a) C. Tomasini i N. Castellucci, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 156-172; b) D. M. Ryan i B.L. Nilsson, *Polym. Chem.* **3** (2012) 18-33.
60. I. Cherny i E. Gazit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 4062-4069.
61. a) X. Yan, P. Zhu i J. Li, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 1877-1890; b) I.W. Hamley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53** (2014) 6866-6881; c) J. Wang, K. Liu, L. Yan, A. Wang, S. Bai i X. Yan, *ACS Nano.* **10** (2016) 2138-2143.
62. A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen i E. Gazit, *Adv. Mater.* **18** (2006) 1365-1370.
63. X. Yan, Y. Cui, Q. He, K. Wang i J. Li, *Chem. Mater.* **20** (2008) 1522-1526.
64. V. Singh, R. K. Rai, A. Arora, N. Sinha i A. K. Thakur, *Sci Rep* **4**:3875 (2014) 1-8.
65. a) A. Birgersdotter, R. Sandberg i J. Ernberg, *Semin. Cancer Biol.* **15** (2005) 405-412; b) W.T. Truong, Y. Su i J.T. Meijer, *Chem. Asian. J.* **6** (2011) 30-42.
66. a) I. W. Hamley, *Soft Matter* **7** (2011) 4122-4138; b) W.Y. Seow i C. A. E. Hauser, *Mater. Today* **17** (2014) 381-388; c) S. Marchesan, L. Waddington, C. D. Easton, F. Kushkaki, K. M. McLean, J. S. Forsythe i P. G. Hartley, *J. Bionanosci.* **3** (2013) 21-29.
67. P. D. Tatman, E. G. Muhonen, S. T. Wickers, A. O. Gee, E.-S. Kim i D.-H. Kim, *Biomater. Sci.* **4** (2016) 543-544.
68. V. Jayawarna, M. Ali, T.A. Jowitt, A.F. Miller, A. Saiani, J.E. Gough i R.V. Ulijn, *Adv. Mater.* **18** (2006) 611-614.
69. G. A. Silva, C. Czeisler, K. L. Niece, E. Beniash, D. A. Harrington, J. A. Kessler i S. I. Stupp, *Science* **303** (2004) 1352-1355.

70. a) J. T. S. Pettikiriarachchi, C.L. Parish, M.S. Shvichet, J.S. Forsythe i D.R. Nisbet, *Aust. J. Chem.* **63** (2010) 1143-1154; b) S. Motamed, M. Del Borgo, K. Kulkarni, N. Habila, K. Zhou, P. Perlmutter, J.S. Forsythe i M. J. Aguilar, *Soft Matter* **12** (2016) 2243-2246.
71. H.Yokoi, T. Kinoshita i S. Zhang, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **102** (2005) 8414-8419.
72. P.W.J.M. Frederix, G.G. Scott, Y. M. Abul-Haija, D. Kalafatovic, C. G. Pappas, N. Javid, N. T.Hunt, R.V. Ulijn i Tell Tuttle, *Nat. Chem.* **7** (2015) 30-37.
73. a) L. Ouyang, R. Yao, X. Chen, J. Na i W. Sun, *Biofabrication* **7** (2015) 015050; b) M. R. Ramezani, H. Naderi-Manesh i H. A. Rafieepour, *Biocell* **38** (2014) 11-17.
74. a) C. Yan i D. Pochan, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 3528-3540; b) J. Raeburn, A. Z. Cardoso i D. J. Adams, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 5143-5156.
75. a) N. Šijaković-Vujičić, Z. Glasovac, N. Zweep, J. H. van Esch, M. Vinković, J. Popović i M-Žinić, *Chem. Eur. J.* **19** (2013) 8558-8572; b) J. Makarević, M. Jokić, L. Frkanec, V. Čaplar, N. Šijaković Vujičić i M.Žinić, *Beilstein J. Org. Chem.* **6** (2010) 945-959.
76. H. Günzler, H-U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006.
77. U. Anand i M. Mukherjee, *Langmuir* **29** (2013) 2713-2721.
78. H-Y. Hu, Q. Li, H-C. Cheng i H-N.Du, *Biopolymers* **62** (2001) 15-21.
79. N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **1** (2006) 2876-2890.
80. M.Biancalana *et al*, *J. Mol. Biol.* **394** (2009) 627-633
81. F.L.Graham i J. Smiley, *J. Gen. Virol.* **36** (1977) 59-74.
82. G. Shaw, S. Morse, M. Ararat i F. L. Graham, *FASEB J.* **16** (2002) 869-871.
83. S. Motamed, M. P. Borgo, K. Kulkarni, N. Habila, K. Zhou, P. Perlmutter, J. S. Forsythe i M. I. Aguilar, *Soft Matter* **12** (2016) 2243-2246.
84. T. Pospišil, M. Zinic i L. Frkanec, *CzechChemical Society Symposium Series.* **14** (2016) 3; 126-126a
85. T. Pospišil, L. Ferhatović Hamzić, L. Brkić Ahmed, M. Lovrić, S. Gajović i L. Frkanec, *Biomaterials Science* **4** (2016) 1412-1416.

8. DODATAK

POPIS SLIKA:

Slika 1. Eukariotska stanica s prikazom stanične membrane, sastavnih dijelova staničnog kostura (aktin, intermedijarni filamenti i mikrotubuli) i ribosoma; str. 4

Slika 2. a) jednostavni supramolekulski kompleks između cikličkog polietera i metalnih soli kojeg je opisao Pedersen i suradnici 1967. b) primjer supramolekulskog sustava koji se sastoji od polimersoma modificiranog antitijelima koji sadrže hidrofilne molekule u vodenom dijelu i hidrofobne molekule lijeka u membranskom dvosloju međusobno povezane nekovalentnim interakcijama; str. 5

Slika 3. Prirodne aminokiseline klasificirane prema kemijskim svojstvima bočnog lanca (-R); str. 8

Slika 4. Slikoviti prikaz različitih nanostrukture nastalih nakon samoudruživanja dipeptida i tripeptida sa Fmoc zaštitom na *N*-terminalnom kraju te njihove TEM mikrografije; str. 9

Slika 5. Shematski prikaz cijepanja amiloid-prekursorskog proteina (APP, gornje numeriranje) do amiloid-beta peptida ($A\beta$, donje numeriranje); str. 11

Slika 6. Slikoviti prikaz amiloidnih plakova između neurona; str. 11

Slika 7. Prikaz agregacije monomera $A\beta$ -peptida u konformaciji slučajnog klupka (*eng.* random coil) u amiloidne niti sastavljene od paralelnih β -nabranih ploča; str. 12

Slika 8. a) Kemijska struktura tioflavina T; b) Rotacija dvaju planarnih dijelova tioflavina T oko C-C veze; c) Karakteristično povećanje emisije fluorescencije tioflavina T pri vezanju na amiloidne niti; str. 13

Slika 9. a) Kemijska struktura kongo-crvenila; b) Amiloidni plak obojan kongo-crvenilom; str. 14

Slika 10. Kemijske strukture peptidomimetika-„lomitelja β -nabrane ploče” (eng. β -sheet breaker peptides); a) pentapeptid KLVFF (H-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-OH); b) pentapeptid Ac-LPFFD-NH₂ (iA β 5p); c) peptidometici u kojima je KLVFF sekvenca vezana na hidrofilne lance aminoetoksi etoksiacetata i aspartata; d) peptidomimetik RGKLVFFGR-NH₂. Crvenom bojom na kemijskim strukturama su označene kemijske modifikacije sekvence KLVFF; str. 17

Slika 11. TEM mikrografije i odgovarajući CD spektri amiloidnih agregata (lijevo) prije te nakon dodatka inhibitora (desno). Struktura cikličkog peptida kao inhibitora amiloidne agregacije (sredina); str. 18

Slika 12. Kemijske strukture malih molekula, derivata amiloidnih boja (kongo-crvenilo i tioflavin T) kao inhibitora amiloidne agregacije: a) Krisamin G; b) Kurkumin; c) Metilena-plava (MB); str. 19

Slika 13. Kemijske strukture PET radioobilježivača odobrenih od strane FDA za kliničku upotrebu⁵³; a) Pittsburgh spoj B (eng. Pittsburgh compound B), [¹¹C] PIB; b) Florbetapir (¹⁸F) ili [¹⁸F] AV-45 (AmyvidTM); c) Flutemetamol (¹⁸F) ili Vizamy¹TM; str. 20

Slika 14. PET slike mozga nakon unosa radioobilježivača [¹⁸F] AV-45 za tri različita pacijenta; gornja slika prikazuje mozak zdravog pacijenta bez amiloidnih plakova; u sredini je prikazan mozak pacijenta sa umjerenim količinama amiloidnih plakova u ranijoj fazi Alzheimerove bolesti; donja slika prikazuje mozak pacijenta u kasnoj fazi Alzheimerove bolesti s velikom količinom amiloidnih plakova (bijeke strelice); str. 21

Slika 15. Slikoviti prikaz procesa nastanka supramolekularnog gela; str. 22

Slika 16. Slikoviti prikaz karakterizacijskih tehnika s obzirom na različita stanja samoorganizacije gelatora; str. 24

Slika 17. Shematski prikaz hijerarhijskog samoudruživanja peptida u hidrogel; str. 26

Slika 18. Različite strukture nano-dimenzija nastale samoorganizacijom kratkih peptida koji u svojoj strukturi sadrže Phe-Phe; str. 27

Slika 19. Stanična kultura hrskavičnih stanica hondrocita na/u hidrogelu Fmoc zaštićenog dipeptida (Fmoc-Phe-Phe-OH) A) Prikaz pokusa 2D i 3D stanične kulture; B) stanice su zadržane na površini hidrogela (mjerna skala = 20 μm); C) Fluorescencijska mikroskopija prikazuje prisutnost stanica u hidrogelu (stanice su bojane 4',6-diamidin-2-fenilindolom, DAPI; mjerna skala = 50 μm) D) ESEM mikrografija prikazuje hidrogelsku mrežu unutar koje su raspoređene stanice (prikazane strelicama), mjerna skala = 50 μm);str. 28

Slika 20. Dijagram učestalosti pojedinih uzroka smrtnosti u svijetu (u milijunima godišnje, Atlas of Heart Disease and Stroke, WHO, 2015); str. 29

Slika 21. Peptid RADA-16-I; a) aminokiselinska sekvenca i molekularni model peptida; b)-d) AFM mikrografije hidrogela RADA-16-I, 8x8 μm (b), 2x2 μm (c) i 0.5x0.5 μm (d), kod mikrografije(d) se je vidljiva drukčija visina vlakna što upućuje na strukturu dvosloja; e)-h) fotografije hidrogela pri različitim uvjetima: 0.5 wt% (pH 7.5) (e), 0.1 wt% (pH 7.5, Tris·HCl) (f), 0.1 wt% (pH 7.5, PBS) (g) prije djelovanja ultrazvuka i ponovno samoorganizirani hidrogel nakon djelovanja ultrazvuka (h);str. 30

Slika 22. TEM mikrografije hidrogela **6**: a) kontrastiranog s pWk, b) sjenčanog paladijem; str. 70

Slika 23. TEM mikrografije gelova **6** (sjenčano paladijem) u a) DMSO-H₂O i b) CH₃CN; str. 71

Slika 24. TEM mikrografije gela **6** (sjenčano paladijem) u a) etanolu i b) smjesi etanola i vode; str. 72

Slika 25. TEM mikrografije gela **6** (sjenčano paladijem) u a) metanolu i b) smjesi metanola i vode; str. 73

Slika 26. TEM mikrografija hidrogela **5** (kontrastirano s Pt); str. 74

Slika 27. TEM mikrografija gela **5** u acetonitrilu (kontrastirano s pWk); str. 74

Slika 28. TEM mikrografija gela **5** u etil-acetatu (kontrastirano s pWk); str. 75

Slika 29. TEM mikrografija gela **5** u *o*-ksilenu (sjenčano s Pt); str. 75

Slika 30. TEM mikrografija gela **5** u *m*-ksilenu (sjenčano s Pt); str. 76

Slika 31. TEM mikrografija gela **5** u *p*-ksilenu (sjenčano s Pt); str. 76

Slika 32. TEM mikrografija gela **5** u dekalinu (sjenčano s Pt); str. 77

Slika 33. TEM mikrografija gela **5** u tetralinu (sjenčano s Pt); str. 77

Slika 34. TEM mikrografija gela **11** u tetralinu (sjenčano s Pt); str. 78

Slika 35. TEM mikrografija gela **17** u DMSO-H₂O (sjenčano s Pd); str. 78

Slika 36. TEM mikrografija gela **22** u etil-acetatu (kontrastirano s pWk); str. 79

Slika 37. TEM mikrografija gela **23** u DMSO-H₂O (kontrastirano s pWk); str. 79

Slika 38. TEM mikrografija gela **23** u etanolu (kontrastirano s pWk); str. 80

Slika 39. TEM mikrografija **28** u acetonitrilu (kontrastirano s pWk); str. 81

Slika 40. TEM mikrografija **32** u acetonitrilu (kontrastirano s pWk); str. 81

Slika 41. TEM mikrografija **28** u smjesi otapala DMSO-H₂O (kontrastirano s pWk); str. 82

Slika 42. TEM mikrografije gelova u *o*-ksilenu sjenčanih platinom za spojeve: a) **28**, b) **32** i c) **37**; str. 83

Slika 43. TEM mikrografije gelova u *m*-ksilenu sjenčanih platinom za spojeve: a) **28** i b) **32**; str. 84

Slika 44. TEM mikrografija gela **32** u *p*-ksilenu (sjenčano Pt); str. 85

Slika 45. TEM mikrografije gelova u tetralinu sjenčanih platinom za spojeve: a) **28**, b) **32** i c) **37**; str. 86

Slika 46. TEM mikrografije gelova u dekalinu kontrastiranih s pWk za spojeve: a) **28**, b) **32** i c) **37**; str. 88

Slika 47. Ovisnost dinamičkog opterećenja o vremenu kod hidrogela tripeptida **6** (G' - modul pohrane, G'' - modul gubitka); str. 89

Slika 48. Ovisnost promjene kemijskih pomaka o temperaturi za različite NH protone gelova u d_3 -acetonitrilu za tripeptide a) **5** i b) **6**; str. 91

Slika 49. NOESY spektar gela tripeptida **6** u d_3 -acetonitrilu na 25 °C. Označene su intermolekularne interakcije; str. 92

Slika 50. Minimizirana struktura tripeptida **6** (struktura sa minimalnom energijom) i izračunate vrijednosti intramolekularnih udaljenosti između metilnih skupina alanina i skupina: a) COCH₃, b) CH₂ (Phe2) i c) H_{arom.}; str. 94

Slika 51. Minimizirana struktura tripeptida **6** (struktura sa minimalnom energijom) i izračunate vrijednosti intramolekularnih udaljenosti između acetilnih skupina (COCH₃) i skupina: a) CH₂(Phe1), b) NH_{mid} i c) H_{arom.}; str. 96

Slika 52. Shematski prikaz pretpostavljenog modela antiparalelne β -nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama za tripeptid **6**. Označene su specifične intermolekularne NOE interakcije; str. 97

Slika 53. NOESY spektar gela tripeptida **5** u d_3 -acetonitrilu na 25 °C. Označene su intermolekularne interakcije; str. 98

Slika 54. Struktura tripeptida **5** s minimalnom energijom) i izračunate vrijednosti intramolekularnih udaljenosti između metilnih skupina alanina i skupina: a) COCH_3 , b) NH_{end} i c) H_{arom} ; str. 99

Slika 55. Struktura tripeptida **5** s minimalnom energijom i izračunate vrijednosti intramolekularnih udaljenosti između acetilne skupine (COCH_3) i skupina: a) OCH_3 , b) NH_{mid} i c) H_{arom} ; str. 100

Slika 56. Ovisnost promjene kemijskih pomaka o temperaturi za različite NH protone gelova u d_3 -acetonitrilu za tripeptide a) **28** i b) **32**; str. 102

Slika 57. Temperaturna ovisnost pomaka FTIR vrpce za istežanje NH skupina kod grijanja gela **5** u acetonitrilu (20 °C - 75 °C); str. 104

Slika 58. Temperaturna ovisnost pomaka FTIR vrpce za istežanje NH skupina kod hlađenja gela **5** u acetonitrilu (75 °C - 20 °C); str. 105

Slika 59. Temperaturna ovisnost pomaka amid I i amid II vrpce kod grijanja gela **5** u acetonitrilu (25 °C - 75 °C); str. 106

Slika 60. Temperaturna ovisnost pomaka amid I i amid II vrpce kod hlađenja gela **5** u acetonitrilu (75 °C - 25 °C); str. 106

Slika 61. Temperaturna ovisnost pomaka FTIR vrpce za istežanje NH skupina kod grijanja gela **5** u toluenu (20 °C - 100 °C); str. 107

Slika 62. Temperaturna ovisnost pomaka FTIR vrpci za istežanje NH skupina kod hlađenja gela **5** u toluenu (100 °C - 20 °C); str. 108

Slika 63. Temperaturna ovisnost pomaka amid I vrpci kod grijanja gela **5** u toluenu (20 °C - 100 °C); str. 109

Slika 64. Temperaturna ovisnost pomaka amid I vrpci kod hlađenja gela **5** u toluenu (100 °C - 20 °C); str. 110

Slika 65. Temperaturna ovisnost pomaka FTIR vrpci za istežanje NH skupina kod grijanja gela **6** u acetonitrilu (20 °C - 75 °C); str. 111

Slika 66. Temperaturna ovisnost pomaka amid I vrpci kod grijanja gela **6** u acetonitrilu (20 °C - 75°C); str. 112

Slika 67. Temperaturna ovisnost pomaka FTIR vrpci za istežanje NH skupina kod grijanja gela **28** u acetonitrilu (25 °C - 75 °C); str. 113

Slika 68. Temperaturna ovisnost pomaka amid I vrpci kod grijanja gela **28** u acetonitrilu (25 °C - 75°C); str. 114

Slika 69. Temperaturna ovisnost pomaka amid I vrpci kod grijanja gela **32** u acetonitrilu (20 °C - 75°C); str. 115

Slika 70. FTIR spektri kserogelova iz vode za tripeptide: a) **5** i b) **6**; str. 116

Slika 71. FTIR spektri kserogelova tripeptida **28** i **32** iz acetonitrila (prikazan je amidni dio spektra zbog bolje preglednosti); str. 118

Slika 72. FTIR spektri kserogelova iz izomera ksilena za tripeptide: a) **28**, b) **32** i c) **37** (prikazan je amidni dio spektra zbog bolje preglednosti); str. 119

Slika 73. UV/Vis apsorpcijski spektri vodene otopine i hidrogela tripeptida a) **5** i b) **6**; str. 120

Slika 74. UV/Vis apsorpcijski spektri vodene otopine i hidrogela tripeptida a) **5** i b) **6**; str. 120

Slika 75. Temperaturno ovisni CD spektri hidrogela **6**; str. 121

Slika 76. Temperaturno ovisni CD spektri hidrogela **5**; str. 121

Slika 77. Temperaturno ovisni CD spektri gela **28** u acetonitrilu prilikom a) grijanja i b) hlađenja; str. 122

Slika 78. Temperaturno ovisni CD spektri gela **32** u acetonitrilu prilikom a) grijanja i b) hlađenja; str. 123

Slika 79. Spektrofotometrijska titracija tripeptida **6** ($c = 3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tioflavinom T ($c = 3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u vodi; $l = 1 \text{ cm}$, $\vartheta = 25^{\circ}\text{C}$; str. 124

Slika 80. Podudaranje eksperimentalnih i izračunatih podataka prilikom titracije ThT s tripeptidom **6**; str. 125

Slika 81. a) slika hidrogelskih niti tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3} \text{ M}$) obojenih tioflavinom T ($c = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$) snimljena laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom u reflektiranom svjetlu; b) slika obojenih hidrogelskih niti snimljena laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom pomoću fluorescencije; str. 126

Slika 82. TEM mikrografije sjenčane platinom a) hidrogela tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3} \text{ M}$) i b) gela tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3} \text{ M}$) s ugrađenim molekulama kongo-crvenila ($c = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$); str. 127

Slika 83. a) slika hidrogelskih niti tripeptida **6** ($c = 7 \times 10^{-3} \text{ M}$) obojenih kongo-crvenilom ($c = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$) snimljena laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom u reflektiranom svjetlu; b) slika obojenih hidrogelskih niti snimljena laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom pomoću fluorescencije; str. 128

Slika 84. Grafički prikaz povećanja broja stanica HEK293T u hidrogelu **6** u odnosu na ostale medije. Broj stanica u hidrogelu, Matrigelu i lateksu je određen testom Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA na dan 0 i 5. Rezultati pokazuju srednje vrijednosti rezultata \pm SD za 4 nezavisna eksperimenta izvedena tri puta; str. 129

Slika 85. Grafički prikaz preživljenja stanica u tripeptidnom hidrogelu, mediju, Matrigelu i lateksu. Postotak živih stanica određen je testom (LIVE/DEAD assay) na nulti i 5. Dan za stanice HEK293T unutar hidrogela tripeptida **6** te stanice uzgojene an matrigelu, lateksu ili u mediju. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica i prikazuju srednju vrijednost \pm SD za 4 nezavisna eksperimenta izvedena tri puta; str. 130

Slika 86. Stanice HEK293T u A) hidrogelu **6**, B) Matrigelu, C) mediju, D) lateksu. Nulti dan eksperimenta. Žive stanice su zelene, a mrtve crvene. Povećanje 10x, mjerna skala se odnosi na sve slike; str. 131

Slika 87. Stanice HEK293T u A) hidrogelu **6**, B) Matrigelu, C) mediju, D) lateksu. 5. dan eksperimenta. Žive stanice su zelene, a mrtve crvene. Povećanje 10x, mjerna skala se odnosi na sve slike; 131

Slika 88. Stanice HEK293T transfecirane sa plazmidom tubulin-mCherry, uzgojene u mediju i promatrane na konfokalnom mikroskopu nakon 72 h. Stanice su na dnu jažice i vidljive su u istim z ravninama. Povećanje 100x, mjerna skala se odnosi na sve slike; str. 132

Slika 89. Stanice HEK293T transfecirane sa plazmidom tubulin-mCherry, uzgojene u hidrogelu **6** i promatrane na konfokalnom mikroskopu nakon 72 h. Stanice stvaraju agregate unutar hidrogela i vidljive su u različitim z ravninama. Povećanje 100x, mjerna skala se odnosi na sve slike; str. 133

Slika 90. Stanice HEK293T uzgojene u: A) hidrogelu **6** i B) mediju promatrane 72 h nakon enkapsulacije. Jasni dijelovi slike s mikroskopa pokazuju stanične agregate unutar hidrogela dok su stanice uzgojene u mediju priljepljene uz površinu. Povećanje 20x; str. 133

POPIS SHEMA:

Shema 1. Reagensi: a) DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; b) TFA/CH₂Cl₂; c) CH₂Cl₂; d) Et₃N, CH₂Cl₂; e) NH₃/MeOH; str. 59

Shema 2. Reagensi: a) Et₃N, CH₂Cl₂; b) 1M LiOH zatim HCl; c) DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; d) TFA/CH₂Cl₂; e) Et₃N, CH₂Cl₂; f) NH₃/MeOH; str. 60

Shema 3. Reagensi: a), c) DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; b), d) TFA/CH₂Cl₂; e) Et₃N, CH₂Cl₂; f) NH₃/MeOH; str. 61

Shema 4. Reagensi: a) Et₃N, CH₂Cl₂; b), e) 1M LiOH zatim HCl; c) HOSu, DCC, dioksan; d) dioksan i CH₂Cl₂; f) NH₃/MeOH; str. 62

Shema 5. Reagensi: a) CH₂Cl₂; b) 1M LiOH zatim HCl; c) DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; d) NH₃/MeOH; str. 63

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Pregled kratkih peptidnih fragmenata koji se samoorganiziraju u amiloidna vlakna; str. 15

Tablica 2. Priprava otopina tijekom titracije vodene otopine tripeptida **6** s vodenom otopinom tioflavina T (ThT) i intenzitet fluorescentne emisije tioflavina T u ovisnosti o koncentraciji **6** ($\lambda_{\text{exc}} = 412 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}(\text{ThT}) = 484 \text{ nm}$); str. 56

Tablica 3. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{max}) izgeliranog otapala (u mL) s 10 mg pripremljenih acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom FFA; str. 65

Tablica 4. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{max}) izgeliranog otapala (u ml) s 10 mg pripremljenih acetilnih derivata tripeptida s aminokiselinskim sekvencama FAF i AFF; str. 66

Tablica 5. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{\max}) izgeliranog otapala (u ml) s 10 mg pripremljenih butirilnih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencijom FFA; str. 67

Tablica 6. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{\max}) izgeliranog otapala (u ml) s 10 mg pripremljenih Z-zaštićenih derivata tripeptida s aminokiselinskim sekvencama FFA, FAF i AFF; str. 68

Tablica 7. Karakteristične vrpce istezanja (ν / cm^{-1}) za tripeptid **5** u kserogelu i gelu ($c = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$); str. 117

Tablica 8. Karakteristične vrpce istezanja (ν / cm^{-1}) za tripeptid **6** u kserogelu i gelu ($c = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$); str. 117

Tablica 9. Podaci dobiveni obradom fluorescencijskih spektara kod titracije tripeptida **6** s tioflavinom T (ThT) u vodi pomoću programa SPECFIT; str. 125

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Tihomir Pospišil
Datum rođenja: 30. lipnja 1985.
Mjesto rođenja: Bjelovar, Republika Hrvatska
Zanimanje: diplomirani kemijski inženjer

Obrazovanje

2012. - 2017. Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju: Doktorski sveučilišni studij „Medicinska kemija“
2004. - 2010. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, dodiplomski studij Kemijsko inženjerstvo i tehnologija, smjer: Procesi i proizvodi, modul: Organski procesi i proizvodi
Diplomski rad: „Sinteza novih lančanih i aromatskih amida 2,5-benzimidazol-dikarboksilne kiseline. Kompleksiranje s DNA“. Mentor: prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola
2000. - 2004. Gimnazija Bjelovar, Bjelovar
1992. - 2000. OŠ Rovišće, Rovišće

Radno iskustvo

2011. - 2017. znanstveni novak (asistent), Laboratorij za supramolekularnu kemiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković (IRB), Zagreb

Sudjelovanje na radionicama i tečajevima

11.05.-12.05. 2016. Radionica: "The InnoMol New Platforms for Molecular Solutions in Research and Development Workshop", IRB, Zagreb
16.11.-18. 11. 2015. Radionica: „Innomol Genomics and Bioinformatics Workshop“, IRB, Zagreb
12.11.-14. 11. 2015. Radionica: „Pozitronska emisijska tomografija na IRB-u: vrhunski alat u istraživanju animalnih modela“, IRB, Zagreb.

- 14.02.-15.02.2012. Dopunska izobrazba o primjeni zaštite od ionizirajućeg zračenja, Zdravstveno veleučilište, Zagreb
- 07.09.-09.09. 2011. *8th Slovenian-Croatian Waters Users' Meeting*, Umag

Objavljeni znanstveni radovi

1. Pospišil, Tihomir; Ferhatović Hamzić, Lejla; Brkić Ahmed, Lada; Lovrić, Marija; Gajović, Srećko; Frkanec, Leo: Synthesis, characterization and *in vitro* biocompatibility assessment of a novel tripeptide hydrogelator, as a promising scaffold for tissue engineering applications, *Biomaterials Science* **4** (2016) 1412-1416.
2. Pospišil, Tihomir; Žinić, Mladen; Frkanec, Leo Tripeptide hydrogelator (Ac-FFA-NH₂) as a model of binding site A β -protein; Comparative binding studies with Thioflavin T and other A β -binders, *Czech Chemical Society Symposium Series*. **14** (2016) 3; 126-126a.

Priznanja i nagrade

Priznanje Vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije za zapažen studentski znanstveni rad na temu: „Sinteza novih cikličkih i lančanih derivatabenzimidazola kao potencijalnih antitumorskih agensa“, mentor: prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola

Stipendije

- listopad 2016. Stipendija COST ("European Cooperation in Science and Technology) akcije CM1304 za kratak studijski boravak u inozemnom laboratoriju (Universitat Jaume I, Castellon, Španjolska, grupa prof. Beatriu Escuder)
- 02.02.-07.02.2014. Stipendija COST akcije CM1304 za sudjelovanje na Zimskoj školi fizikalno-organske kemije, Bressanone, Italija (European-Winter School on Physical Organic Chemistry, eWISPOC)
- 2005.-2009. Državna stipendija "A" kategorije za osobito nadarene studente dodiplomskih studija

Sudjelovanje na konferencijama

1. Pospišil, Tihomir; Žinić, Mladen; Frkanec, Leo: Tripeptide hydrogelator (Ac-FFA-NH₂) as a model of binding site A β -protein ; comparative binding studies with Thioflavin-T and other A β - binders, COST Akcija CM1304, SysChem 2016, 9.-12.svibnja 2016., Valtice, Češka.
2. Pospišil, Tihomir; Ferhatović Hamzić, Lejla; Brkić Ahmed, Lada; Lovrić, Marija; Gajović, Srećko; Frkanec, Leo: Bioinspired tripeptide hydrogels as potential biomaterials in tissue engineering // V.Hrvatski simpozij o kemiji i tehnologiji makromolekula u funkciji pametne specijalizacije, 14. lipnja 2016., Zagreb, Hrvatska.
3. Ferhatović Hamzić, Lejla; Pospišil, Tihomir; Frkanec, Leo; Lovrić, Marija; Gajović,Srećko: Development and in vitro biocompatibility assessment of novel supramolecular hydrogel biomaterial // GlowBrain Final Conference: „Stem cell and biomaterials application for brain repair", 27.-30. svibnja 2016., Zagreb, Hrvatska.
4. Pospišil, Tihomir; Frkanec, Leo; Žinić, Mladen: Samoorganizacija tripeptidnih hidrogelatora kao modela agregiranja A β -proteina // XXIV. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 21.-24.travnja 2015., Zagreb, Hrvatska.
5. Ferhatović Hamzić, Lejla; Pospišil, Tihomir; Frkanec, Leo; Lovrić, Marija; Gajović,Srećko: Characterization and In vitro Biocompatibility Assessment of Newly Developed Supramolecular Gel // XXIV. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 21.-24.travnja 2015., Zagreb, Hrvatska.
6. Ferhatović Hamzić, Lejla; Pospišil, Tihomir; Brkić, Lada; Lovrić, Marija; Frkanec, Leo; Gajović, Srećko: *In vitro* platform for screening the potential use of supramolecular gels to support neural stem cells as a treatment in a mouse model of brain ischemic stroke // From nano- to macro- biomaterials (design, processing, characterization, modelling) and applications to stem cells regenerative orthopaedic and dental medicine, Department of Mechanical Engineering, Frederick University, 14.-17.listopada 2014., Nicosia, Cipar.

7. Pospišil, Tihomir; Frkanec, Leo; Čaplar, Vesna; Žinić, Mladen: Novi peptidni gelatori temeljeni na KLVFF fragmentu A β -proteina // X. Susret mladih kemijskih inženjera (SMLKI), 20.-21.veljače 2014., Zagreb, Hrvatska
8. Pospišil, Tihomir; Frkanec, Leo; Čaplar, Vesna; Žinić, Mladen: Bio-inspired tripeptide gelator as a model of KLVFF A β -protein fragment // e-WISPOC 2014 / Physical Organic Chemistry of Complex Systems, Training School COST Action CM1304 Emergence and Evolution of Complex System, 2.-7.veljače 2014., Bressanone, Italija.
9. Pospišil, Tihomir; Frkanec, Leo; Čaplar, Vesna; Žinić, Mladen: Ac-FFA-NH₂ tripeptide hydrogelator as a model of binding site of A β -protein // MASC 2013 - RSC Macrocyclic and Supramolecular Chemistry Meeting, 16.-17.prosinca 2013., Glasgow, UK.
10. Pospišil, Tihomir; Frkanec, Leo; Čaplar, Vesna; Žinić, Mladen: Tripeptidni hidrogelator Ac-FFA-NH₂ kao model KLVFF veznog mjesta A β -proteina // XXIII. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 21.-24.travnja 2013., Osijek, Hrvatska.
11. Sović, Irena; Kostel, Saša; Pospišil, Tihomir; Karminski-Zamola, Grace: Amidni derivati benzimidazola // XII. Ružičkine dani, Znanost i nove tehnologije u razvoju gospodarstva, 18.-19.rujna 2008., Vukovar, Hrvatska

Boravci u inozemstvu

- 01.10.-01.11.2016. studijski boravak na Sveučilištu Jaume I, Zavod za organsku i anorgansku kemiju, Castellon de la Plana, Španjolska u grupi prof. Beatriu Escuder u okviru STSM-a (Short Term Scientific Mission) financiranog od strane COST Akcije CM1304. Cilj boravka je bio rad na projektu: "Synthesis, characterization and self-assembly of amyloid-inspired tripeptidic gelators" i uspostava daljnje suradnje s grupom prof. Escuder.
- 21.09.-28.09.2014. *State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Material*, Sveučilište Jilin, Changchun, NR Kina: službeni posjet u okviru

zajedničkog bilateralnog projekta "Cyanostilbenebased fluorescent organogelators"

Organizacijske / rukovoditeljske sposobnosti

- ožujak - rujan 2016. Neposredni voditelj sintetskog dijela diplomskog rada studentice PMF-a Ivane Paradžik
- veljača 2016. Neposredni voditelj stručne prakse za studente FKIT-a (Marin Raić i Marjana Gulin)
- 2014.-2016. Predstavnik asistenata u Vijeću Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković

Održana predavanja

- 12.12.2016. Predavanje u sklopu *Kolokvija Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković* pod naslovom: "Sinteza i samoorganizacija bioinspiriranih peptidnih gelatora temeljenih na A β -proteinu".

Popularizacija znanosti

- 14.06.2014. „Dir po Ruđeru", jednodnevni znanstveno-popularni događaj na IRB-u: vodič za posjetitelje
- 27.09.2013. „Noć istraživača 2013", Zagreb: sudjelovanje na radionicama uz izvođenje kemijskih pokusa
- 22.04. - 27.04. 2013. „Festival znanosti", Tehnički muzej Zagreb: izvođenje kemijskih pokusa na znanstveno-popularnoj radionici „Super molekule i svijetla budućnost".
- 18.04. - 20.4. 2013. „Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković", Zagreb: sudjelovanje na punktu „Slatka kemija", predavanja i izvođenje pokusa za posjetitelje
- 23.04.-28.04.2012. „Festival znanosti", Tehnički muzej Zagreb: sudjelovanje u znanstveno-popularnom predavanju „Molekulska arhitektura"; voditelj: dr. sc. Matija Gredičak, IRB
- Studeni 2011. Radionica „Kemija je zakon", Osnovna škola Jordanovac, Zagreb povodom Međunarodne godine kemije u svrhu popularizacije kemije kao znanosti

Članstva

Hrvatsko kemijsko društvo (HKD)