Funkcionalni supramolekulski sustavi adamantanskih gvanidina i amfifilnog derivata ß-ciklodekstrina

Tokić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:438664

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Matea Tokić

FUNKCIONALNI SUPRAMOLEKULSKI SUSTAVI ADAMANTANSKIH GVANIDINA I AMFIFILNOG DERIVATA β-CIKLODEKSTRINA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra(e) kemije

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji, Sveučilište u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc., Ruže Frkanec i neposrednim voditeljstvom dr. sc., Adele Štimac. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka Izv. prof. dr. sc., Ines Primožić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Supramolekulska sinteza samo-organizirajućih funkcionalnih nanomaterijala i kompleksnih kemijskih sustava“ (IP-11-2013-7387).

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ruži Frkanec na odabiru teme, mnogim korisnim savjetima, ugodnom razgovoru i na pomoći tijekom provedbe ovog diplomskog rada. Hvala na veselim trenutcima punih smjeha i razonode te na usmjeravanju, susretljivosti i razumijevanju.

Od srca se zahvaljujem svojoj padobranki dr. sc. Adeli Štimac na podršci, razumjevanju i usmjeravanju prilikom izrade eksperimentalnog dijela. Također se zahvaljujem na uloženom naporu, izdržljivim živcima i pomoći prilikom pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem se na pruženome prijateljstvu, razgovorima i slušanja „jadikovki“.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Ines Primožić na susretljivosti i korisnim savjetima tijekom mog školovanja na fakultetu.

Hvala mojim prijateljima Anji, Ivani, Mateju i Valentini na pravom prijateljstvu, podršci, ohrabrivanju i što su mi uljepšali fakultetske dane te ih učinili nezaboravnima.

Veliko hvala Ministarstvu unutarnjih poslova (MUP-u) na pruženoj nesebičnoj i sveobuhvatnoj pomoći tijekom moga školovanja.

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci, ohrabrivanju, razumjevanju tijekom školovanja i izrade diplomskog rada.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **IX**

ABSTRACT ..... **XI**

§ 1. UVOD **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**

2.1. Supramolekulski sustavi bazirani na „*host-guest*“ interakcijama **3**

2.2. Ciklodekstrini **4**

2.3. Adamantanski gvanidini **6**

2.4. Liposomi **9**

2.5. Adamantan u sustavima za dostavu lijekova **12**

2.6. Fizikalno-kemijske metode za karakterizaciju supramolekulskih sustava **15**

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **18**

3.1. Opće napomene **18**

3.2. Sinteza amfifilnog derivata β-ciklodekstrina, heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina (3) **19**

*3.2.1. Sinteza heptakis-(6-bromo-6-deoksi)-β-ciklodekstrina, CD-Br (**1**)* *19*

*3.2.2. Sinteza heptakis-(6-deoksi-6-dodeciltio)-β-ciklodekstrina, CD-SR (**2**)* *19*

*3.2.3. Sinteza heptakis-[6-deoksi-6-dodeciltio-2-O-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina, EO-CD-SR (**3**)* *20*

3.3. Određivanje konstanti vezanja adamantanskih gvanidina i β-ciklodekstrina metodom spektralne izmjene **21**

3.4. Priprava liposoma i ciklodekstrinskih vezikula **22**

3.5. Ugrađivanje spojeva adamantanskih gvanidina u prethodno pripravljene liposome i ciklodekstrinske vezikule **22**

3.6. Određivanje veličine i zeta potencijala liposoma i ciklodekstrinskih vezikula **23**

3.7. Određivanje interakcija DNA i adamantanskih gvanidina ugrađenih u liposome i ciklodekstrinske vezikule **23**

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **24**

4.1. Sinteza heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina **24**

4.2. Određivanje konstanti vezanja adamantanskih gvanidina i ß-ciklodekstrina metodom spektralne izmjene **26**

4.3. Priprava liposoma i ciklodekstrinskih vezikula **31**

4.4. Određivanje efikasnosti ugrađivanja adamantanskih gvanidina u liposome i ciklodekstrinske vezikule **33**

4.5. Određivanje veličine i zeta potencijala liposoma i ciklodekstrinskih vezikula **35**

4.6. Određivanje interakcija DNA i adamantanskih gvanidina ugrađenih u liposome i ciklodekstrinske vezikule.....37

§ 5. ZAKLJUČAK 41

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... 43

§ 7. LITERATURNI IZVORI.....XV

§ 8. ŽIVOTOPIS XXI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

FUNKCIONALNI SUPRAMOLEKULSKI SUSTAVI ADAMANTANSKIH GVANIDINA I AMFIFILNOG DERIVATA β-CIKLODEKSTRINA

Matea Tokić

U okviru ovog diplomskog rada opisana je kemijska sinteza amfifilnog derivata ß-ciklodekstrina, heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-ß-ciklodekstrina (EO-CD-SR) i priprava funkcionalnih supramolekulskih sustava s adamantanskim gvanidinima. Priređeni su i karakterizirani supramolekulski sustavi adamantanskih gvanidina s liposomima građenim od fosfatidilkolina, liposomima u koje je ugrađen amfifilni derivat ciklodekstrina te ciklodekstrinskim vezikulama građenim samo od amfifilnog derivata ciklodekstrina. Efikasnost ugrađivanja adamantanskih gvanidina u priređene supramolekulske sustave određena je spektrofotometrijski, a veličina i površinski naboj određeni su metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Nadalje, opisano je nastajanje kompleksa između adamantanskih gvanidina i ß-ciklodekstrina metodom spektralne izmjene te je izračunata konstanta vezanja K_a' za sve testirane adamantanske gvanidine AG 1-5. Interakcije između priređenih kompleksa liposoma i ciklodekstrinskih vezikula s adamantanskim gvanidinima i fluorescentno obilježene DNA potvrđene su metodom fluorescencijske korelacijske spektroskopije.
(44 stranice, 21 slika, 5 shema, 2 tablica, 111 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: adamantanski gvanidin, ß-ciklodekstrin, supramolekulski sustavi, liposomi, vezikule

Mentor: dr. sc. Ruža. Frkanec., zn. sur.
Neposredni voditelj: dr. sc. Adela Štimac
Nastavnik: izv. prof. dr. sc. Ines Primožić
Ocjenitelji:
1. doc. dr. sc. Gordan Horvat.
2. izv. prof. dr. sc. Ines Primožić
3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
Zamjena: Doc. dr. sc. Ivan Kodrin
Datum diplomskog ispita: 29. rujan 2017.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

FUNCTIONAL SUPRAMOLECULAR SYSTEMS OF ADAMANTANES GUANIDINES AND AMPHIPHILIC β-CYCLODEXTRINE DERIVATIVE

Matea Tokić

In this graduate thesis the chemical synthesis of β-cyclodextrin, heptakis [6-deoxy-6-dodecylthio-2-*O*-oligo-(ethylene glycol)]-ß-cyclodextrin (EO-CD-SR) and preparation of functional supramolecular systems with adamantanes guanidine are described. Supramolecular systems of adamantanes guanidine with phosphatidylcholine liposomes, liposomes incorporating EO-CD-SR derivative, and cyclodextrin vesicles composed only from the amphiphilic cyclodextrin derivative were prepared and characterized. Efficiency of incorporation of adamantanes guanidine into prepared supramolecular systems was measured spectrophotometrically, and the size and surface charge were determined by dynamic light scattering method. Furthermore, the formation of complexes between adamantanes guanidine and ß-cyclodextrin was studied by spectral replacement method while the K_a' binding constant was calculated for all tested AG 1-5 adamantanes guanidine. Interactions of the liposome and cyclodextrin vesicles with adamantanes guanidine complex and fluorescently labelled DNA were confirmed by fluorescence correlation spectroscopy.
(44 pages, 21 figures, 5 shemes, 2 tables, 111 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: adamantanes guanidine, ß-cyclodextrin, supramolecular systems, liposomes, vesicles

Mentor: dr. sc. Ruža. Frkanec, Research Associate
Assistant mentor: dr. sc. Adela Štimac.
Supervisor: izv. prof. dr. sc. Ines Primožić, Professor
Reviewers:
1. doc. dr. sc. Gordan Horvat, Assistant Professor
2. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Professor
3. izv. prof. dr. sc. Ines Primožić, Professor
Substitute: Doc. dr. sc. Ivan Kodrin, Assistant Professor
Date of exam: 29. September 2017.

§ 1. UVOD

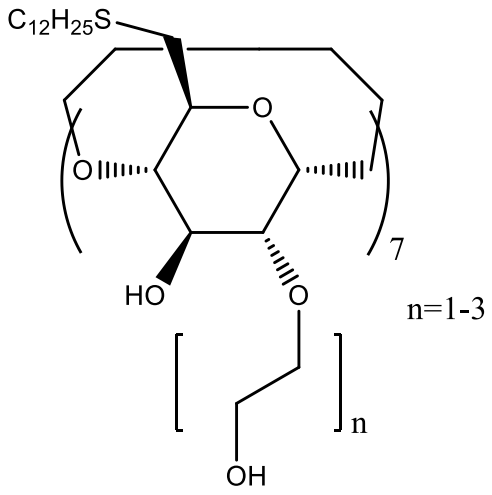
Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligomeri (α(1-4)glukopiranozidi) koji se sastoje od glukoze povezane α-1,4 glikozidnom vezom. Ovisno o broju glukoznih jedinica dijele se na α-CD (šest), β-CD (sedam) i γ-CD (osam).[1] Važna karakteristika koja ciklodekstrine čini izuzetno zanimljivima je postojanje centralne hidrofobne šupljine u koju se mogu ugraditi različiti supstrati tvoreći stabilne komplekse temeljene na nekovalentnim vezama („*host-guest*“ interakcije).[2] Vezanjem različitih alkilnih lanaca, fosfolipida ili kolesterola na primarnoj, sekundarnoj ili na obje strane CD dobivaju se amfifilni ciklodekstrini koji mogu tvoriti različite supramolekulske strukture.[3,4]

Zbog specifičnih strukturnih karakteristika i široke mogućnosti kemijske modifikacije molekule ciklodekstrina se intenzivno istražuju u području supramolekulske kemije. Prednosti nekovalentnih interakcija pri nastajanju složenih supramolekulskih sustava su višestruke, osim što se izbjegavaju višestupanjske sinteze, nije potrebno koristiti agresivna organska otapala, također interakcije su slabog intenziteta te je moguće vanjskim podražajima promjeniti strukturu sustava, kao i dovesti do potpune disocijacije i rekonstrukcije sustava.[5,6] Strukturne karakteristike, kao i dostupnost ciklodekstrina, te njihova biokompatibilnost i netoksičnost čine ih pogodnim za primjenu u biomedicini.[7] Modifikacijom CD s hidrofobnim alikilnim lancem na primarnoj strani i hidrofilnim oligo-(etilen glikolnim) jedinicama na sekundarnoj strani dobivaju se amfifilni derivati cikodekstrina koji u vodenoj otopini tvore unilamelarne dvoslojne vezikule.[8] Supramolekulski sustavi amfifilnih derivata ciklodekstrina proučavaju se kao sustavi za kontroliranu i ciljanu dostavu lijekova.[9] Posebno zanimljivo i važno područje istraživanja supramolekulskih sustava temeljenih na ciklodekstrinima je kompleksiranje DNA i primjena sustava u genskoj dostavi.[10]

Cilj brojnih biomedicinskih istraživanja je sinteza i karakterizacija novih sustava za gensku terapiju temeljenih na biokompatibilnim materijalima koji bi se približili idealnim vektorima visoke transfekcijske sposobnosti i bez neželjenih nuspojava. Za derivate gvanidina je pokazano kako se vežu na DNA i tvore komplekse s visokim transfekcijskim potencijalom.[11,12] U prijašnjim istraživanjima ispitane su liposomske formulacije adamantanskih gvanidina i njihova strukturno-funkcionalna svojstva.[13] Pokazano je da

molekule adamantanskih gvanidina objedinjuju svojstva adamantana i vrlo lako se ugrađuju u lipidni dvosloj liposoma dok gvanidinska skupina na površini liposoma efikasno prepoznaje fosfatne skupine na komplementarnim liposomima. Također, poznato je kako molekula adamantana tvori stabilne komplekse s β-ciklodekstrinima jer veličinom idealno odgovara šupljini β-ciklodekstrina.[14,15]

Stoga je glavni cilj ovog diplomskog rada bio dizajn i priprava novih funkcionalnih supramolekulskih sustava temeljenih na β-ciklodekstrinima i derivatima adamantanskih gvanidina za gensku dostavu. Prvi specifični cilj bio je sinteza amfiflinog derivata β-ciklodekstrina, heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrin (EO-CD-SR), **3**, koji na primarnoj strani konusa ima vezane dodeciltiolne lance, a na sekundarnoj strani konusa nalaze se vezane oligo-(etilen glikolne) jednice (slika 1).



Slika 1. Kemijska struktura amfifilnog derivata ß-CD

Drugi specifični cilj je bio prirediti i krakterizirati komplekse adamantanskih gvanidina i liposoma te ciklodekstrinskih vezikula i ispitati interakcije između priređenih supramolekulskih kompleksa s fluorescentno obilježenom DNA metodom fluorescencijske korelacijske spektroskopije. Prikupljeni rezultati pridonijet će bazičnim istraživanjima novih nanomaterijala za primjenu u biomedicini kao i specifičnu primjenu u genskoj terapiji.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Supramolekulski sustavi bazirani na „*host-guest*“ interakcijama

Supramolekulska kemija je područje kemije koje proučava molekulsko samoudruživanje (engl. *self assembly*) i nastale supramolekulske sustave. Razvoj supramolekulske kemije je započeo 1987. godine otkrićem sustava temeljenih na interakcijama domaćin-gost (engl. *„host-guest“*), za što su Lehn, Cram i Panderson dobili Nobelovu nagradu.[16] Supramolekulski sustavi se temelje na nekovalnetnim interakcija koje omogućavaju jednostavno nastajanje supramolekulskh sustava,[17] unutarnju samoorganizaciju,[9] disocijaciju i rekonstrukciju samih supramolekulskih sustava[19] uzrokovane vanjskim podražajima.[17] Istraživanje i otkriće novih supramolekulskih sustava omogućava njihovu primjenu u različitim poljima kao što su kemijska kataliza, funkcionalni i pametni materijali (engl. *smart materials*), u elektronici, senzorima i nanomedicini.[18] Tijekom nekoliko desetljeća istražene su i opisane brojne makrocikličke molekule koje se koriste kao molekule domaćini prilikom formiranja „*host-guest“* inkluzijskih kompleksa, a neke od njh su: kaliksareni, krunasti eteri, ciklodekstrini i kukurbit. Ove makrocikličke molekule se koriste kao molekule domaćini zato što posjeduju šupljinu u koju je moguće smještanje molekula gosta, a formiranje *„host-guest“* kompleksa s navedenim molekulama je jednostavan i reverzibilan proces što omogućava dizajniranje brojnih supramolekulskih sustava.[9,19]

Sustavi za dostavu lijekova se razvijaju u svrhu poboljšavanja topljivosti lijekova u vodenome mediju, ciljanu dostavu lijekova i njihovo unošenje u ciljne stanice kao što su stanice tumora.[21] Dostava lijekova može se provesti na nekoliko načina: direktnim kompleksiranjem između makrocikličke molekule i lijeka koji želimo unijeti ili ugradnjom lijekova u supramolekulske sustave.[9] Biološko oslikavanje (engl. *bioimaging*) pruža važne informacije u dijagnostici bolesti. Prilikom biooslikavanja potrebno je koristiti reagense koji su biokompatibilni, izrazito stabilni i otporni na biološku razgradnju unutar stanice. Kako bi se poboljšala gore navedena svojstva, formiraju se „*host-guest*“ kompleksi direktnim vezanjem između makrocikličke molekule i fluorescentne boje. Nastali kompleksi nisu toksični i efikasno oslikavaju ciljane stanice.[9]

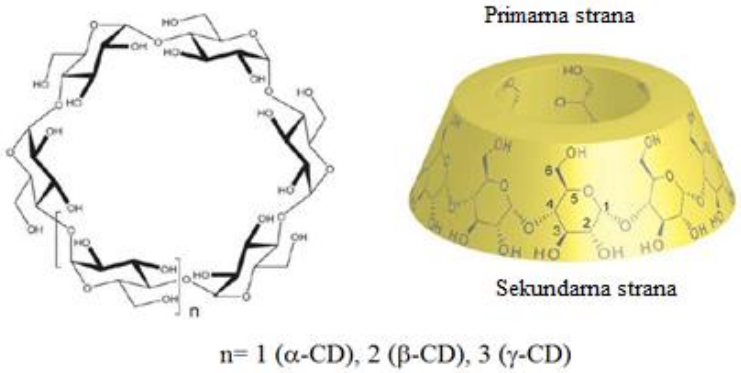
„Host-guest“ inkluzijski kompleksi između makrocikličkih molekula i lijeka pokazali su se efikasnim u dostavi lijekova, no i nadalje se radi na razvoju novih sustava za ciljanu

dostavu prepoznavanjem specifičnih receptora na stanicama kao i kontroliranog otpuštanja lijeka u stanici.[22] Razvijeni su brojni nanonosači temeljeni na supramolekulskim organizacijama kao što su micele i vezikule (liposomi), kao i brojni hibridni nanomaterijali (liposomi ugrađeni u hidrogelove). Micele i vezikule se najčešće sastoje od amfifilnih molekula (amfifilni surfaktanti, fosfolipidi) u koje se mogu ugraditi različite biološki aktivne tvari, hidrofilne ili hidrofobne.[23,24,25] Također nanovezikule se mogu površinski modificirati kako bi se poboljšala specifična ciljana dostava. Otpuštanja aktivnih molekula u stanici može biti kontrolirano različitim podražajima (pH, temperatura, fotokemijski). Supramolekulski sustavi istražuju se također za gensku dostavu. S obzirom da je poznato kako uspješnost genske dostave najviše ovisi o nosaču, razvijene su brojne supramolekulske nanočestice građene od amfifilnih kationskih molekula koje su elektrostatskim interakcijama za sebe vezale genski materijal (DNA, RNA).[26] Ciklodekstrini i brojni derivati ciklodekstrina su posebno interesantni i široko ispitivani u genskoj dostavi prvenstveno zbog svoje biokompatibilnosti i netoksičnosti.[10]

2.2. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su ciklički α(1-4)glukopiranozidi koji se sastoje od glukoze, te ih je moguće klasificirati s obzirom na broj molekula glukoze u prstenu.[27] Broj glukoznih jedinica određuje ime i veličinu ciklodekstrinkog prstena te stoga imamo ciklodekstrine koji se mogu sastojat od šest, sedam ili osam glukoznih jedinica poznati kao α-ciklodekstrin, β-ciklodekstrin i γ-ciklodekstrin (slika 2).[1,28,29]

Ciklodekstrine je otkrio Villers 1891., a moguće dobiti iz škroba enzimatskom razgradnjom koristeći glikozil transferazu (CGTases)[30] ili izolirati selektivnom precipitacijom. CGTases potječe iz bakterija kao što su *Bacillus macerans* i *Alcaliphilic bacili*.[30] Najstabilnija trodimenzionalna konfiguracija ciklodekstrina nalikuje na šuplji krnji konus (slika 2). U ovakvoj strukturi primarna hidroksilna skupina je orijentirana prema užem obodu krnjeg konusa te se ta strana naziva primarnom stranom ciklodekstrina. Nadalje, sekundarna hidroksilna skupina je orijentirana prema širem obodu krnjeg konusa te se to područje naziva sekundarnom stranom ciklodekstrina.[30,31] S obzirom na prisutstvo hidroksilnih skupina na objema stranama, vanjska površina ciklodekstrina je hidrofilna, a šupljina koja sadržava glikozidne kisikove atome je hidrofobna.[32,33]



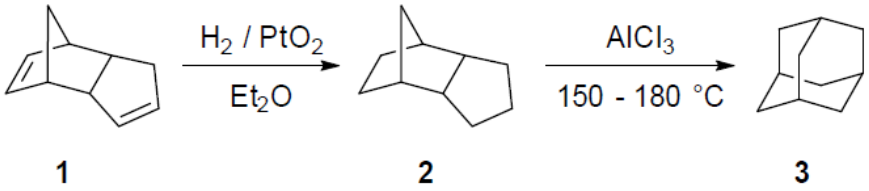
Slika 2. Shematski prikaz kemijske i 3D strukture ciklodekstrina[33]

S obzirom na hidrofobnost šupljine, ciklodekstrin se može koristiti kao molekula domaćin (engl. *host*) za hidrofobne organske i anorganske spojeve[34] (molekule gosti, engl. *guest*), pri čemu dolazi do formiranja inkluzijskih kompleksa. Molekule gosti, kao što to mogu biti proteini[26,35] ili polimerni lanci,[37] te adamantan,[14] mogu biti djelomično ili u potpunosti ugrađeni u šupljinu. Prilikom fomiranja inkluzijskih kompleksa ne dolazi do povezivanja kovalentnim vezama, već se molekule gosti i domaćina povezuju slabim nekovalentnim interakcijama.[13,19,29] Zbog povezivanja slabim nekovalentnim interakcijama uporaba ciklodekstrina u farmaciji[27] kao sustava za dostavu lijekova je ograničena zato što dolazi do slabog vezanja i vrlo brze disocijacije lijeka.[29] Uporaba ciklodekstrina je ograničena i zbog veličine i hidrofilnosti molekule zbog prisutnosti velikog broja hidroksilnih skupina zbog čega ciklodekstrin teško prolazi kroz membranu stanice.[29] Uekama i suradnici su proučavali direktno komplekisranje između β-ciklodekstrina i lijeka s ciljem poboljšanja topljivosti i stabilnosti lijekova čime je pokazano da se CD može vezati na površinu stanične membrane i omogućiti bolju adsorpciju lijeka.[37] Ciklodekstrini, osim u farmaciji, koriste se u raznim područjima kao što su kataliza (u kemijskog industriji i sintetskoj kemiji katalizira reakciju oponašajući rad enzima),[26,38,39] kemija (analitička kemija, separacija spojeva plinskom kromatografijom ili HPLC-om),[30,40] kemija materijala (formiranje polimera na temelju „*host-guest*“ interakcija)[41] i biokemija (transport i uklanjanje kolesterola iz stanične membrane).[42,43] S obzirom da su ciklodekstrini biokompatibilni i netoksični zbog njihove dostupnosti iz škroba imaju široku biomedicinsku primjenu.[44] Osim prirodnih ciklodekstrina, za formiranje „*host-guest*“ kompleksa upotrebljavaju se amfifilni derivati ciklodekstrina koje je moguće dobiti direktnom modifikacijom ciklodekstrina.[45,46]

Kako bi se poboljšala svojstva ciklodekstrina, ciklodekstrini se često prevode u različite derivate, u koje se ubrajaju i amfifilni derivati ciklodekstrina.[47] Amfifilni derivati ciklodekstrina mogu se dobiti kemijskom (vezanjem hidrofobnih supstituenata na primarnu ili sekundarnu stranu) ili enzimatskom modifikacijom ciklodekstrina. Prilikom derivatizacije potrebno je održati ravnotežu između hidrofilnih i hidrofobnih supstituenata vezanih na ciklodekstrine kako se ne bi narušila amfifilnost željenog derivata ciklodekstrina.[47] Ovisno o tome na koju će se stranu ciklodekstrinskog oboda vezati supstituenti, nastaju amfifilni derivati ciklodekstrina koji imaju hidrofobne supstituente na primarnom ili sekundarnom obodu te je također moguće sintetizirati amfifilne molekule ciklodekstrina sa hidrofobnim supstituentima na obje strane molekule.[47] Opisan je veliki broj derivata ciklodekstrina koji na primarnom obodu imaju vezane različite molekule: kolesterol,[48,49] alkilne lance različitih veličina[50,51] te peptidolipide.[52] Također amfifilni derivati ciklodekstrina imaju sposobnost samoorganizacije u vodenome mediju pri čemu dolazi do nastajanja supramolekulskih struktura (micela, vezikula) koji se mogu koristiti kao sustavi za dostavu biološki aktivnih spojeva.[53] Formiranje supramolekulskih sustava korštenjem amfifilnog β-ciklodekstrina proučavali su Ravoo i suradnici.[53] Nađeno je kako nastaju liposomi s određenim udjelom amfifilnog β-ciklodekstrina, a ugradnjom različitih molekula gosta pokazano je da se ciklodekstrin može ponašati kao molekula domaćin za hidrofobne molekule gosta što omogućava njegovu upotrebu u „*host-guest*“ kemiji.[53]

2.3. Adamantanski gvanidini

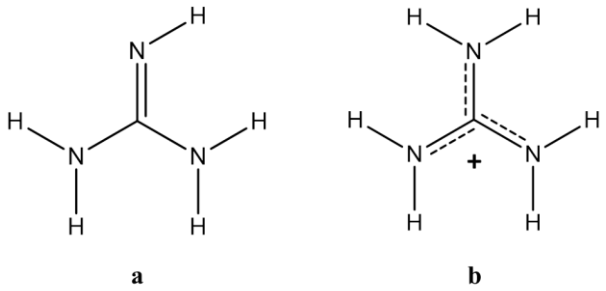
Adamantan je molekula policikličke rigidne[54] kavezaste strukture čija kristalna struktura nalikuje kristalnoj rešetci dijamanta.[55] Zbog tetraedarskog rasporeda ugljikovih atoma adamantan posjeduje malu napetost strukture, a njezina krutost posljedica je zakočenosti cikloheksanskih prstenova.[56] Prvi puta je izoliran iz sirovog ulja 1933. godine, a kemijskim putem su ga prvi puta sintetizirali Prelog i Seiwerth 1941.[57] Schleyer je otkrio kako reakcijom pregradnje uz prisutstvo Lewisove kiseline kao katalizatora nastaje adamantan što je bio početak sinteze adamantana u većim količinama i njegovog intenzivnijeg istraživanja (Shema 1).[58]



Shema 1. Pregradnja katalizirana Lewisovom kiselinom što vodi nastanku adamantana[58]

1960-ih godina otkrivena je antivirusna aktivnosti 1-aminoadamantana (poznat kao amantadin i Symmetrel®) koji je bio vrlo uspješan u liječenju virusne gripe tipa A.[59,60,61] Također je utvrđeno da derivati adamantana pokazuju aktivnost kod virusa hepatitisa C[62] i kod Parkinsonove bolesti.[63] Uvođenjem adamantanske strukture u spojeve kod kojih je dokazana određena biološka aktivnost poboljšavaju se farmakološka svojstva i aktivnost biološki aktivnih molekula.[64,65] Posljedica uvođenja adamantanske strukture je povećanje lipofilnosti biološki aktivnih molekula što rezultira većom stabilnošću i omogućava olakšan prolazak kroz staničnu membranu.[64,66]

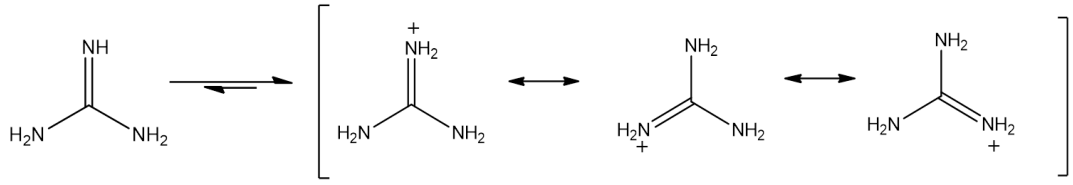
Gvanidin predstavlja jednu od najjačih organskih baza, a sastoji se od tri duškova atoma povezana s ugljikovim atomom pri čemu su dva dušika aminska i jedan iminski. Protoniranjem nastaje gvanidinski kation koji je planaran i rezonantno stabiliziran π elektronima (slika 3). Osim velikog afiniteta prema protoniranju, gvanidin ima svojstvo povezivanja mnogobrojnim vodikovim vezama što je vrlo važno u biološkim procesima i prilikom molekulskog prepoznavanja u biološkim sustavima primjerice povezivanje gvanina s citozinom unutar DNA.



Slika 3. Prikaz strukture gvanidina (a) i gvanidinijevog kationa (b)

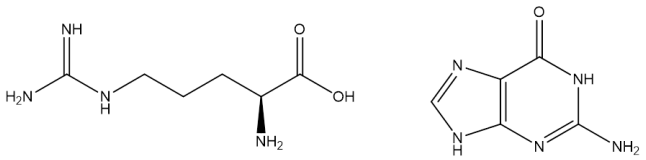
Bazičnost gvanidinske skupine je usko povezana sa stabilnošću gvanidinskog kationa dobivenog protoniranjem te se vrijednost može usporediti s bazičnošću hidroksilne skupine.

Zbog velike energetske stabilizacije postignute rezonancijom, gvanidin se najčešće nalazi u monoprotoniranome obliku (shema 2).



Shema 2. Prikaz rezonantno stabiliziranog gvanidinijevog kationa

Gvanidinska skupina koja je polarnog karaktera, predstavlja iznimno važan strukturni motiv koji je sadržan u hidrofilnim peptidima na površini stanice (aminokiselina arginin) koji sudjeluju u transportu raznovrsnih molekula kroz staničnu membranu.[31] Osim u argininu, gvanidinska skupina se nalazi u purinskoj bazi gvanina (molekule DNA) te je važno da se pri fiziološkim uvjetima gvanidinska skupina nalazi u protoniranom obliku. Na slici 4 prikazane su strukture arginina i gvanidina. Studije su pokazale da gvanidinska skupina arginina, kod antibakterijskih peptida bogatih argininima,[67] zbog svoje polarnosti prilikom interakcije s fosfatnim skupinama membranskih fosfolipida omogućava njihovu translokaciju kroz staničnu membranu.[13,31]

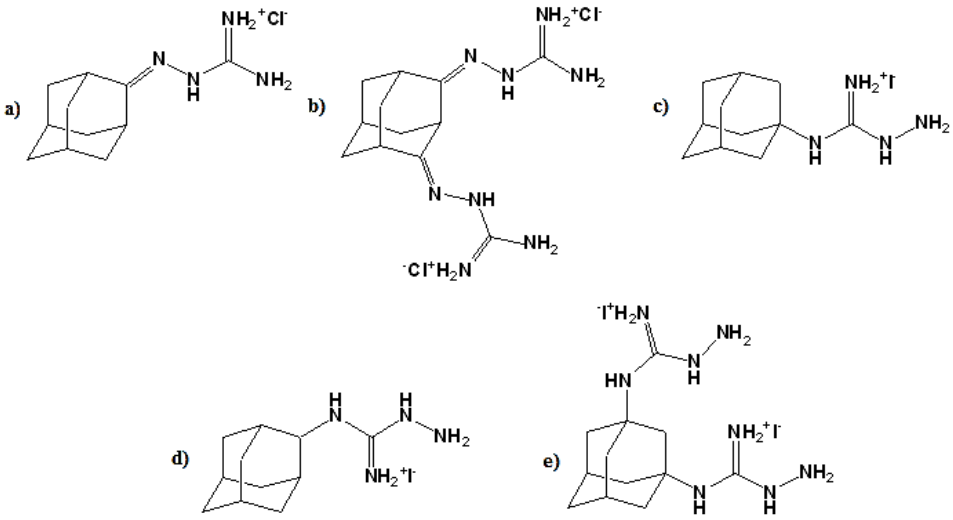


c **d**

Slika 4. Strukturni prikaz arginina (c) i gvanina (d)

S obzirom da je na temelju literature[65] poznato da veliki broj biološki aktivnih tvari ima poboljšanu aktivnost zahvaljujući svojstvima molekule adamantana koja omogućava olakšani prolazak kroz membranu, a da gvanidin ostvaruje interakcije važne za prepoznavanje u biološkim sustavima, sintetizirani su spojevi koji su dobiveni kombiniranjem adamantanskog i gvanidinskog fragmenta. Sintetiziran je veći broj spojeva kojima su ispitana svojstva i moguća primjena. Spojevi korišteni u ovom diplomskom rada su adamantanski gvanilhidrazoni: 2-(*N*-gvanidin)iminoadamantan hidroklorid (AG1) i 2,4-Bis(*N,N'*-gvanidin)iminoadamantan dihidroklorid (AG2).[68] Korištenjem navedenih adamantanskih gvanilhidrazona ispitan je njihov utjecaj kao inhibitora na butirilkolinesterazu (BChE) te je

pokazano da su adamantan gvanilhidrazoni inhibitori za BChE.[68] Također sintetizirani su i adamantanski aminogvanidini: 1-(3-aminogvanidin)adamantan hidrojodid (AG3), 2-(3-aminogvanidin)adamantan hidrojodid (AG4) i 1,3-Bis-(3-aminogvanidin)adamantan dihidrojodid (AG5).[13] Adamantanski aminogvanidini korišteni su kako bi se ispitala njihova upotreba kao anionskih receptora pri čemu su dobivene zadovoljavajuće konstante vezanja.[69] Temeljna razlika između navedenih imino i amino gvanidina je u načinu i mjestu vezanja gvanidinskog fragmenta na adamantansku strukturu. Upravo navedena opažanja imaju ključan utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva spomenutih spojeva. Svi navedeni spojevi prikazani su na slici 5.

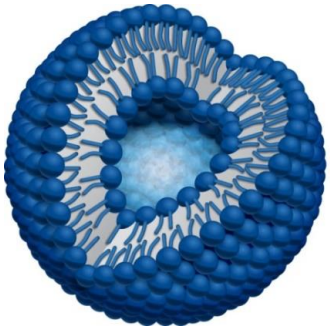


Slika 5. Strukture spojeva adamantanskih gvanidina: a) AG1, b) AG2, c) AG3, d) AG4, e) AG5

2.4. Liposomi

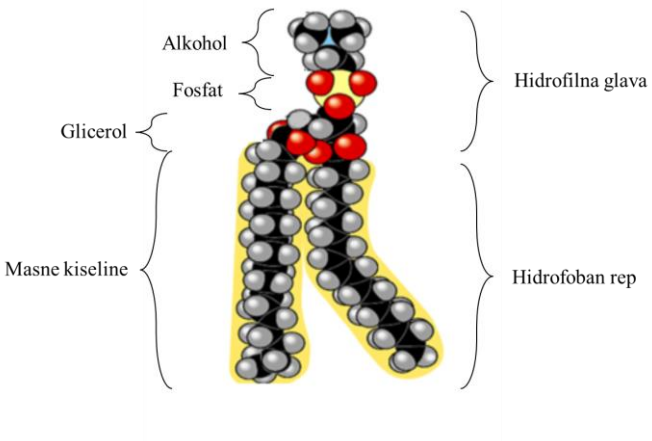
Liposomi su vezikule sferičnog oblika koje mogu biti sastavljene od jednog ili više fosfolipidnog dvosloja.[70] 1960-tih godina liposome (slika 6) je otkrio britanski znanstvenik A. D. Bangham proučavajući fosfolipide i zgrušavanje krvi pri čemu je uočio da u vodenoj otopini dolazi do spontanog formiranja multilamelarnih vezikula.[71] Liposome je moguće razlikovati s obzirom na veličinu, sastav lipida, naboj i lamelarnost.[72] Najčešće su građeni od fosfolipida (amfifilnih molekula) koji se sastoje od hidrofilne glave i hidrofobnoga repa (slika 7).[73] S obzirom na hidrofilnost i hidrofobnost komponenti lipidnog dvosloja liposoma dolazi do njihovog spontanog formiranja koje je posljedica hidrofobnih interakcija između hidrofobnih repova i elektrostatskih interakcija između hidrofilnih glava. Ostvarivanjem

povoljnih hidrofobnih interakcija u vodenome mediju dolazi do minimizacije energije sustava.[74,75]



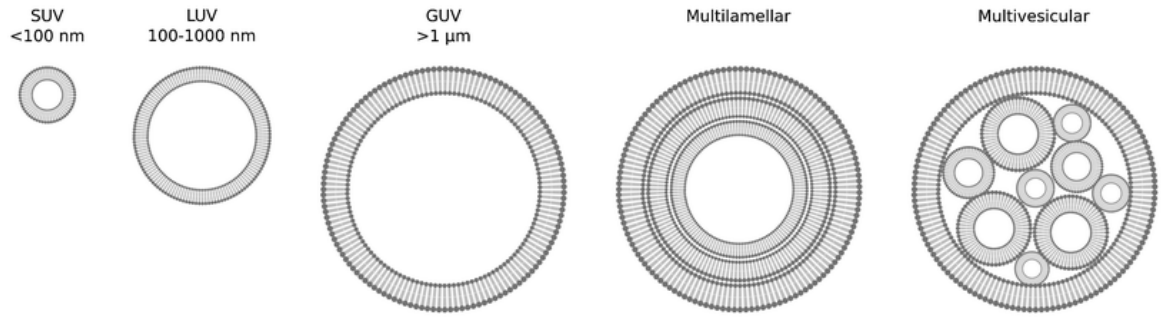
Slika 6. Shematski prikaz strukture liposoma[76]

Osim fosfolipida liposomi u lipidnom dvosloju mogu sadržavati: steroide (kolesterol i njegovi derivati), netoksične surfaktante, sfingolipide, glikolipide, polimere vezae za lipide (polietilen glikol, PEG), i membranske proteine.[70,77] Sastav lipidnog dvosloja, kao što je udio zasićenih i nezasićenih ugljikovodičnih lanaca, omjer pojedinih komponenata i udio kolesterola, utječu na fluidnost ili rigidnost te na naboj lipidnog dvosloja.[70,77] Upravo dodatak kolesterola osigurava rigidnost i čvrstoću dvosloja.[73,74] Nadalje, nezasićeni lipidi poput nezasićenih fosfatidilkolina iz prirodnih izvora (fosfatidilkolin iz soje ili jajeta) formiraju permeabilnije lipidne dvosloje dok zasićeni fosfolipidi koji sadrže duge acilne lance s manjim udjelom dvostrukih veza (dipalmitolifosfatidilkolin) formiraju rigidnije i nepermeabilne lipidne dvosloj.[78]



Slika 7. Shematski prikaz fosfolipida[79]

Liposome je moguće klasificirati s obzirom na način priprave, strukturne parametre te sastav i njihovu primjenu. Strukturni parametri prema kojima je moguća klasifikacija su: veličina liposoma i broj lipidnih dvosloja (slika 8). Mogu biti sastavljeni od jednog lipidnog dvosloja (unilamelarni) koji mogu biti mali (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV), veliki (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV) ili jako veliki (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUV). Također liposomi mogu biti građeni od dva i više lipidnih dvosloja zbog čega se nazivaju multilamelarnim liposomima (engl. *multi lamellar vesicles*, MLV). Multivezikularni liposomi (engl. *multi vesicular vesicles*, MVV) sastoje se većeg broja manjih vezikula koje su nasumično uklopljene u jedan liposom.[72,73,77]



Slika 8. Shematski prikaz liposoma s obzirom na veličinu i lamelarnost[80]

Danas postoje različite metode kojima je moguće pripraviti liposome: metoda reverzne faze, metoda etanolnog ili eterskog injektiranja, dehidratacijsko-hidratacijska metoda, metoda uklanjanja deterdženta, metoda hidratacije tankog filma.[72,77] Najjednostavnija i često korištena metoda priprave liposoma je metoda hidratacije tankog filma. Ovom metodom pripravljaju se multilamelarni liposomi (MLV), čija se veličina može smanjiti sonificiranjem ili ekstrudiranjem kroz polikarbonatne filtere (membrane).[73,74] Odabirom prikladne metode mogu se priraviti liposomi željene veličine i lamelarnosti. Ispravan odabir metode za pripravu liposoma ovisit će o: fizikalno-kemijskim svojstvima spojeva koje želimo ugraditi, prirodi korištenih fosfolipida te o namjeni za koju ćemo koristiti liposome.[73,81]

Veličina i distribucija veličina pripravljenih liposoma iznimno su važni parametri ukoliko se liposomi planiraju upotrebljavati u terapijske svrhe. Navedene parametre moguće je odrediti na nekoliko načina: korištenjem neke od tehnika elektronske mikroskopije (engl. *transmission electron microscopy*, TEM; engl. *Atomic force microscopy*, AFM), gel kromatografijom i dinamičkim raspršenjem svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS).

Od navedenih metoda vrlo često se koristi dinamičko raspršenje svjetlosti zbog jednostavnosti izvođenja metode, priprave uzoraka za snimanje i minimalne koncentracije uzorka. Međutim nedostatak ovakve metode je što ne daje informacije o obliku i morfologiji te što kao rezultat dobijemo prosječnu vrijednost, a ne apsolutnu.[70]

S obzirom da su liposomi biokompatibilni,[70] netoksični[78] i neimunogenični,[72] a po strukturi slični staničnoj membrani imaju široku primjenu u raznim znanstvenim disciplinama, uključujući biofiziku (svojstva staničnih membrana i kanala), kemiju (kataliza, energija pretvorbe, fotosinteza), znanost o koloidima, biokemiju (uloga membranskih proteina).[82] Veliku primjenu pronalaze kao sustavi za dostavu biološki aktivnih tvari koje se mogu ugraditi u lipidni dvosloj liposoma (hidrofobne aktivne tvari), u vodeni dio, unutrašnjost liposoma (hidrofilne aktivne tvari) ili mogu biti ugrađene i u lipidni dvosloj i u šupljinu liposoma (amfifilne aktivne tvari).[74] Ugradnjom biološki aktivnih tvari (lijekova) u liposome, lijek se štiti od razgradnje enzimima i omogućava se njegovo postupno otpuštanje.[72] Također liposomi se koriste za dostavu lijekova u ciljane stanice, posebice u onkologiji, budući da se na površinu liposoma mogu vezati različiti ligandi koji su specifični za ciljane stanične receptore.[83]

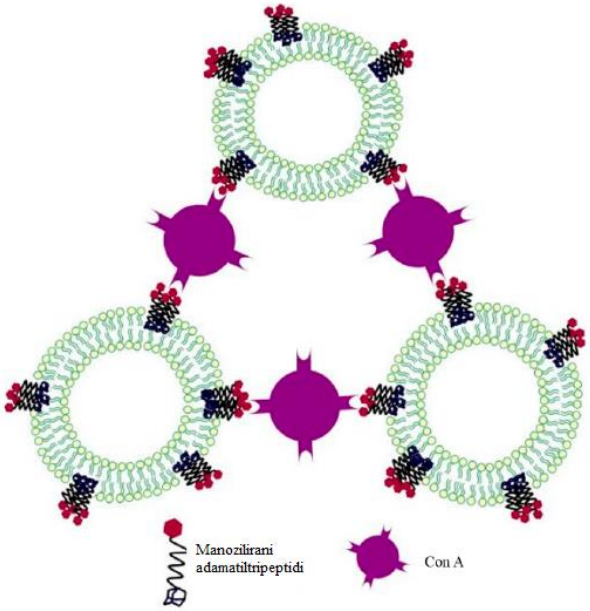
2.5. Adamantan u sustavima za dostavu lijekova

Kontinuirano se dizajniraju i sintetiziraju novi lijekovi u koje se uvodi molekula adamantana s ciljem poboljšavanja farmakoloških svojstava, povećanja otpornosti prema djelovanju hidrolitičkih enzima, duljeg djelovanja lijeka u organizmu i boljeg farmakokinetičkog profila. Razvoj sustava za dostavu lijekova kao i jedinstvena strukturna i kemijska svojstva adamantana, te biokompatibilnost, netoksičnost i dostupnost, otvorila su široke mogućnosti primjene adamantana u razvoju novih sustava za dostavu.[31] Adamantan se može koristiti na dva načina: kao građevna jedinica na koju se mogu vezati različite funkcionalne skupine (primjer dendrimera temeljenih na adamantanu) ili kao dio samoorganizirajućih supramolekulskih sustava. U supramolekulske sustave adamantan se može ugraditi na temelju svoje lipofilnosti, u liposome, ili na temelju snažnih „*host-guest*“ interakcija prilikom ugrađivanja u ciklodekstrine.

Ugradnja adamantana u lipofilni dio lipidnog dvosloja liposoma potvrđena je rendgenskim zračenjem (X-zrakama, EPR tehnikom) pri čemu je pronađeno da se adamantan

može ugraditi na dva različita mjesta unutar lipidnog dvosloja, bliže površini i dublje u hidrofobnom djelu lipidnog dvosloja.[84]

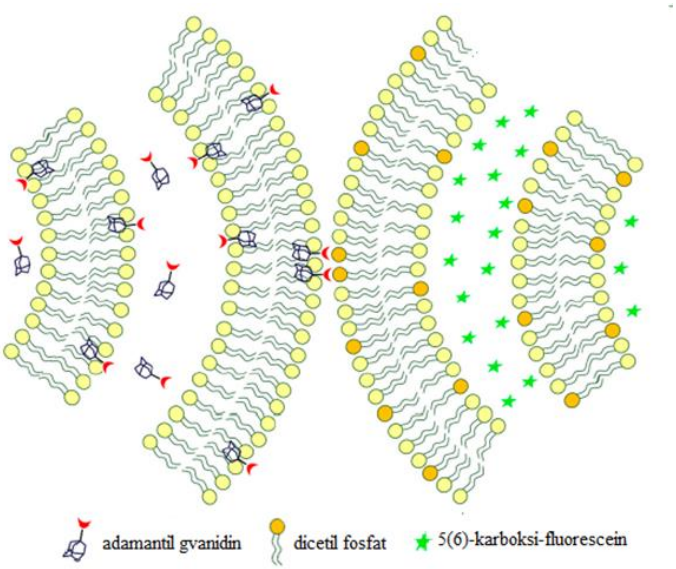
Liposomi se osim kao sustavi za dostavu često koriste i kao modeli za istraživanje staničnih membrana, stoga je adamantan zbog mogućnosti ugrađivanja u lipidni dvosloj kao i mogućnosti vezanja različitih funkcionalnih skupina na adamantan postao interesatnatn u istraživanjima staničnog prepoznavanja, liganda i receptora. U literaturi je opisana priprava površinski modificirnih liposoma ugrađivanjem manoziliranih adamantiltripeptida u liposome, gdje je adamantan služio kao sidro u lipidnom dvosloju dok je manoza bila izložena na površini liposoma. Istraživanje interakcija priređenih liposoma s modelnim lektinom konkavalinom A, Con A, pokazalo je kako je manoza izložena na površini.[85]



Slika 9. Shematski prikaz interakcije Con A s manoziliranim liposomima[85]

Con A je biljni lektin koji sadrži četiri vezna mjesta za α-glukozide ili α-manozide.[86] Dodatkom Con A u suspenziju manoziliranih liposoma, formiraju se agregati zbog interakcija između manoze i Con A. (slika 9).[85] Navedeni manozilirani liposomi mogu se koristiti kao sustavi za ciljanu dostavu lijekova, prvenstveno u stanice na kojima su prisutni manozni receptori. Adamantan pokazuje veliki potencijal kao membransko sidro prilikom ugradnje u lipidni dvosloj liposoma te je na njega moguće vezati razne šećere ili druge molekule, ligande za razvoj novih sustava za ciljanu dostavu.

Također, pokazano je i ugrađivanje adamantanskih gvanidina (adamantan aminogvanidini) u lipidni dvosloj liposoma preko adamantanske strukture.[13] Prisustvo gvanidinske skupine na površini liposoma dokazana je interakcijama s komplementarnim liposomima koji su sadržavali dicetilfosfat i na površini su imali izložene fosfatne skupine. Interkacijom između gvanidinske i fosfatne skupine (PO_4^{3-}) na liposomima došlo je do povećanja veličine liposoma i pojave agregata. Također, spektroskopskom analizom supernatanta smjese liposoma pokazalo se da ne dolazi do otpuštanja karboksifluoresceina ugrađenog u komplementarne lipososme što je uz povećanje veličine lipososma bila potvrda ostvarenih interakcija između pripremljenih lipososma (slika 10).[13]

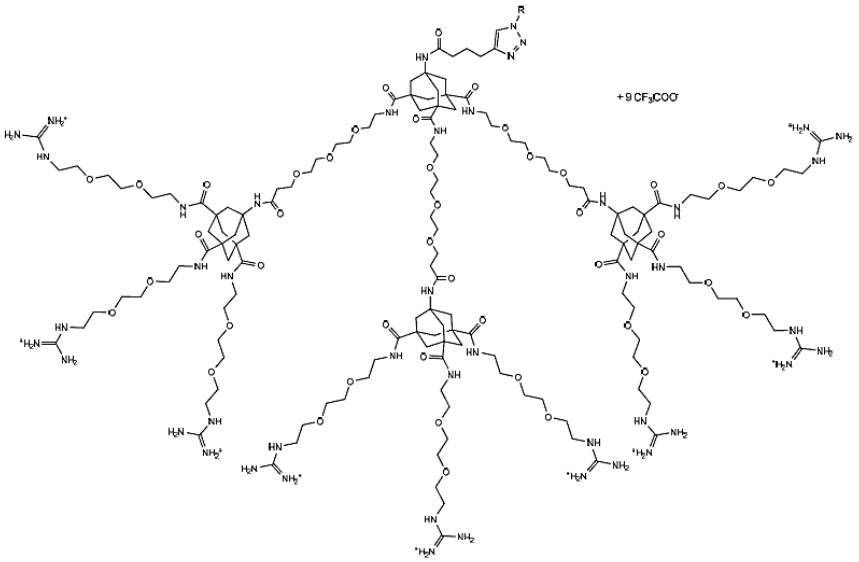


Slika 10. Prikaz interakcija između liposoma koji sadrže adamantanske gvanidine s komplementarnim liposomima na kojima je izložena fosfatna grupa.[13]

Veličina i geometrija kao i lipofilnost adamantana razlozi su savršenog uklapanja u šupljinu ß-ciklodekstrina.[30] Zbog ostvarivanja jakih „*host-guest*“ interakcija u kompleksima ß-ciklodekstrina i adamantana, ciklodekstrini su stabilni sustavi za dostavu lijekova u koje se mogu ugraditi različiti derivati adamantana.[47] Amfifilni derivati ciklodekstrina koji tvore vezikule otvaraju niz mogućnosti za pripravu funkcionalnih supramolekulskih sustava koji su opisani za primjenu u dostavi lijekova,[31] genskoj dostavi [10] ili biooslikavanju.[9]

Dendrimeri su razgranate makromolekule polimera koje na površini imaju izložene funkcionalne skupine. Dendrimeri se sastoje od jezgre obavijene ljuskama gdje svaka pojedina ljuska predstavlja jednu generaciju dendrona.[87] S obzirom na strukturu i svojstva, dendrimeri su organizirani kao jedinstvena skupina sintetskih nanostruktura, gdje se u jezgri

ispod ljuski nalaze nano-šupljine u koje je moguće ugraditi lijek. Dendrimeri građeni od polietilenimina (PEI) i poliamidoamina (PAMAM) su uz kationske lipide najefikasniji neviralni transfekcijski sustavi, no nažalost dendrimeri pokazuju i neke toksične nuspojave.[88] Stoga su razvijeni sustavi temeljeni na adamantanu.[89] Primjer dendrimera temeljenog na adamantanu gdje su gvanidnske skupine na površini dendrimera prikazan je na slici 11. Gvanidinske skupine koje se nalaze na površini adamantanskih dendrimera omogućavaju vezanje DNA i drugih farmakofaktora, te omogućava njihov transport u stanice bez izazivanja citotoksičnosti [90]



Slika 11. Polikationski dendron baziran na adamantanu sa gvanidniskom skupinom za kompleksiranje sa DNA.[85]

2.6. Fizikalno-kemijske metode za karakterizaciju supramolekulskih sustava

Određivanje veličine liposoma i efikasnosti ugrađivanja aktivnih molekula je važno za njihovu terapeutsku primjenu. Veličina liposoma može se odrediti mikroskopskim tehnikama, kromatografijom isključenja i metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS). Dinamičko raspršenje svjetlosti je metoda koja se vrlo često koristi za određivanje distribucije veličina malih čestica unutar neke suspenzije.[91] Raspršenje svjetlosti je prvi proučavao Rayleigh na vrlo malim česticama te ga je definirao jednadžbom (1):

$$I_s = \frac{8}{3}\pi N \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \alpha^2 I_0 \qquad (1)$$

pri čemu N predstavlja broj čestica, α polarizabilnost, λ valnu duljinu zračenja i I_o intenzitet upadnog zračenja.[92] Kod DLS-a prilikom analize potebno je uzeti u obzir Brownovo gibanje čestica jer DLS analizira vremensku ovisnost fluktuacije intenziteta raspršenog zračenja zbog Brownovog gibanja čestica u otopini. Brownovo gibanje predstavlja nasumično kretanje čestica u otopini, a ovisno o veličini čestica doći će do promjene u Brownovom gibanju. Što je čestica veća Brownovo gibanje će biti sporije, a samim time je i osciliranje intenziteta raspršenog zračenja manje.[91] Brzina Brownovog gibanja je definirana translacijskim difuzijskim koeficijentom (D) pomoću kojeg se može odrediti veličina čestica korištenjem Stokes-Einstein jednadžbe (2):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h} \tag{2}$$

gdje k predstavlja Boltzmanovu konstantu, T apsolutnu temperaturu, η viskoznost otapala, a d_h hidrodinamički promjer čestice.[91,92] Prednost korištenja DLS metode je mogućnost mjerenja u suspenziji, jednostavna priprava uzorka te je minimalna koncentracija potrebna za mjerenje. Naboj liposoma važno je svojstvo liposoma jer se pomoću njega može pretpostaviti stabilnost liposoma, a određuje se mjerenjem elektroforetske pokretljivosti liposoma koja korelira s površinskim nabojem, a izražava se zeta potencijalom (ζ). Elektrokinetički ili zeta potencijal definiran je udaljenošću između površine čestice i klizne plohe, a ovisi i o svojstvima površine (sastav lipida lipidnog dvosloja) i medija u kojem se nalaze čestice.[93] Također, definiran je energijom interakcija između čestica, o kojoj će ovisi njihova stabilnost.[94] Vrijednost zeta potencijala proporcionalna je debljini difuzijskog sloja, a određuje se mjerenjem potencijala na površini čestice. Negativan ili pozitivan naboj na površini liposoma dovodi do odbijanja među vezikulama što sprječava njihovu agregaciju i taloženje.[93,94] Suspenzije čestica čiji je zeta potencijal veći od 30 mV ili manji od -30 mV smatraju se stabilnim suspenzijama.[74]

Konstanta vezanja je vrijednost koja opisuje afinitet vezanja dviju molekula u ravnotežnom stanju. Neke od metoda za određivanje konstante vezanja (K_a) su: NMR titracija, izotermalna titracijska kalorimetrija (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) i metoda spektralne izmjene (engl. *spectral displacement technique*, SDT).[31,70] Metoda spektralne izmjene (engl. *spectral displacement technique*, SDT) se koristi za određivanje konstante vezanja β-ciklodekstrina s analitima koji su spektroskopski transparentni.[95] Temelji se na mjerenju apsorbancije kompetitivnog kromofornog liganda koji će biti istinut iz šupljine β-ciklodekstrina analitom koji ne sadrži svojstva kromofora.[95,96] Kao kromoforni ligandi za

određivanje konstante vezanja koristi se fenolftalein (PP) ili metiloranž koji se zbog svoje veličine mogu u potpunosti smjestiti u šupljinu β-ciklodekstrina.[96] Vrijednosti apsorbancije kromofora ovisit će o tome gdje je kromofor smješten: u šupljini β-ciklodekstrina ili se nalazi u vodenome mediju.[95] Prilikom smještanja kromofora u šupljinu β-ciklodekstrina formiraju se inkluzijskih kompleksi kod kojih ne dolazi do pucanja niti stvaranja kovalentnih veza što omogućava laku izmjenu s željenim analitom.[95] Također je važno prilikom određivanja konstante vezanja odabrati kromoforni ligand čija je konstanta vezanja slična ili veća od konstante vezanja β-ciklodekstrina i analita.[96]

Fluorescencijska spektroskopija je metoda koja se temelji na fluorescentnim svojstvima analita, a koristi za određivanje koncentracije analita u otopinu. Koncentracija analita se određuje na temelju emitirane svjetlost uslijed pobude UV/VIS zračenjem. Jedna od metoda koja se zasniva na fluorescentnoj spektroskopiji je fluorescencijska korelacijska spektroskopija (engl. *Fluorescence correlation spectroscopy*, FCS). Fluorescencijska korelacijska spektroskopija je eksperimentalna metoda koja se temelji na analizi fluktuacija fluorescentnog signala kako bi se odredio difuzijski koeficijent, lokalna koncentracija ili kinetika kemijskih reakcija.[97,98,99] FCS omogućava analizu interakcija između biomolekula pri nastajanju kompleksa, između fluorescentno obilježene molekule i druge molekule koja sudjeluje u procesu, mjereći promjenu difuzijskog koeficijenta fluorescentno obilježene molekule u homogenoj otopini.[100] Intenzitet fluktuacije $\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle$ se analizira korištenjem vremenski normalizirane autokorelacijske funkcije G(t) koja predstavlja funkciju korelacijskog vremena τ, a dana je jednadžbom (3):[14,97]

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t)^2 \rangle} \qquad (3)$$

Jedna od mogućih primjena FCS-a je za studiranje lipidnog dvosloja biomembrane. Korlach i suradnici su proučavali i karakterizirali velike unilamelarne vezikule (GUV) korištenjem konfokalne mikroskopije i FCS-a, pri čemu su koristili dvije fluorescentene probe koje su im omogućile mjerenje difuzijskog vremena. Na temelju dobivenih difuzijskih vremena uspješno su definirali sastav lipidnog dvosloja analiziranih vezikula GUV.[101]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Kemikalije i otapala korišteni u eksperimentalnom djelu bili su analitičke čistoće. Korišteni su: β-ciklodekstrin (β-CD), *N*-bromsukcinimid (NBS), trifenilfosfin (PPh_3), 1-dodekantiol, kalijev *tert*-butoksid (t-BuOK), etilen karbonat, tetrametilurea, natrijev metoksid (NaOMe), kalijev karbonat, dimetilformamid (DMF), 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etan sulfonska kiselina (HEPES) tvrtke Sigma-Aldrich; metanol (MeOH), heksan, aceton, etil-acetat, 2-propanol, kloroform tvrtke Kemika i L-α-fosfatidilkolin iz žumanjka jajeta proizvođača Avanti Polar Lipids.

Derivati adamantan gvanidilhidrazona: 2-(*N*-gvanidin)iminoadamantan hidroklorid (AG1) i 2,4-Bis(*N*,*N*'-gvanidin)iminoadamantan dihidroklorid (AG2), te derivati adamantan aminogvanidina:1-(3-aminogvanidin)adamantan hidrojodid (AG3), 2-(3-aminogvanidin)adamantan hidrojodid (AG4) i 1,3-Bis-(3-aminogvanidin)adamantan dihidrojodid (AG5) sintetizirani su na Institutu Ruđer Bošković.[13,68,69]

Tijek reakcija i njihov napredak praćen je tankoslojnom kromatografijom koja je rađena na silikagel pločicama 60 F_{254} (Merck). Za vizualizaciju produkata koristilo se prskanje s 20% H_2SO_4 u etanolu uz grijanje.

Apsorbancija uzoraka mjerena je spektrofotometrom Multiskan spectrum (Thermo Electron Corporation, USA).

Za uklanjanje neugrađenog materijala iz suspenzije liposoma korištena je centrifuga Eppendorf Centrifuge 5810 R.

Sonifikator Soniprep 150 korišten je za pripremu liposoma uniformnih veličina.

^{1}H-NMR spektri snimani su na spektrometru Bruker AV-600 pri 600 MHz.

Veličina i zeta potencijal liposoma mjereni su na na Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), a rezultati su obrađeni Zetasizer software 6.32 (Malvern instruments).

Ispitivanje interakcija između fluorescentno obilježene DNA i adanantanskih gvanidina ugrađenih u liposome i ciklodekstrinske vezikule provedeno je konfokalnim mikroskopom Leica DMi8.

Spektar masa dobiven je MALDI TOF/TOF spektrometrijom Applied BiosystemVoyager DE STR na instrumentu Foster City, CA.

Za pripravu liposoma metodom hidratacije tankog lipidnog filma korišten je rotavapor Rotavapor® RE-121 (Büchi) s vakum pumpom Vacuum Pump V-710 (Büchi) i ultrazvučna kupelj Branson 3510, USA.

3.2. Sinteza amfifilnog derivata β-ciklodekstrina, heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina (3)

*3.2.1. Sinteza heptakis-(6-bromo-6-deoksi)-β-ciklodekstrina, CD-Br (**1**)*

Prema literaturnim podacima provedena je sinteza heptakis-(6-bromo-6-deoksi)-β-ciklodekstrina (**1**).[102] U otopinu PPh_3 (9,34 g, 35,2 × 10^{-3} mol) u 40 ml DMF-a polagano je dokapana otopina NBS-a (6,35 g, 35,2 × 10^{-3} mol) otopljenog u 10 ml DMF-a. Reakcijska smjesa je miješana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta u reakcijsku smjesu postupno je dodan prethodno osušen β-ciklodekstrin (2,50 g, 2,2 × 10^{-3} mol) otopljen u 10 ml DMF-a. Reakcijska smjesa miješana je na 80°C preko noći u atmosferi argona. Reakcija se prati TLC-om u sustavu otapala etil-acetat : 2-propanol : 25% amonijev klorid : voda = 7 : 7 : 5 : 2. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je ohlađena do -15°C, pH je podešen na 9 dodatkom NaOMe (5,4 × 10^{-3} mol dm^{-3} u metanolu). Nakon dodatka NaOMe reakcijska smjesa miješana je 1 h bez grijanja, i dodana u 750 ml smjese vode i leda. Dobiveni talog je profiltriran i ispran s MeOH. Dobiveno je 2,80 g (81%) produkta **1**. Rf = 0,40. Izračunata Mr za $C_{42}H_{63}O_{28}Br_7$ = 1575,224 g mol^{-1}

^{1}H-NMR (DMF-d_7) δ/ppm: 6,25 (d, 7H, OH-2); 6,02 (d, 7H, OH-3); 5,11 (d, 7H, H-1); 4,15 (d,7H, H-6a); 4,05 (t, 7H, H-5); 3,90-3,80 (m, 14H, H-3, H-6); 3,59-3,46 (m, 14H, H-2, H-4 preklapa se s H_2O)

*3.2.2. Sinteza heptakis-(6-deoksi-6-dodeciltio)-β-ciklodekstrina, CD-SR (**2**)*

Sinteza heptakis-(6-deoksi-6-dodeciltio)-β-ciklodekstrina provedena je prema literaturnim podacima.[103,104] Pomiješa se 1-dodekantiol (2,68 ml, 11,2 × 10^{-3} mol) s 5 ml DMF-a, a zatim je postupno dodan t-BuOK (1,55 g, 11,19 × 10^{-3} mol) otopljen u 10 ml DMF-a. Nakon dodatka t-BuOK reakcijska smjesa miješana je 1 h na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Nakon 1 h u reakcijsku smjesu dodan je prethodno osušen spoj **1** (850 mg, 0,5 × 10^{-3} mol) otopljen u 10 ml DMF-a. Reakcija se prati TLC-om u sastavu otapala etil-acetat : 2-propanol : 25 % amonijev klorid : voda = 7 : 7 : 5 : 2. Reakcijska smjesa je miješana 5 dana pri

temperaturi 60-80°C u atmosferi argona. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu i ulivena u 200 ml ohlađene vode. Nastali talog je profiltriran i ispran s MeOH i heksanom. Osušeni talog je kuhan 1 h u 30 ml heksana. Zaostali talog je profiltriran i ispran u heksanu (20 ml). Dobiveno je 880 mg (59%) produkta **2**. Rf = 0,8. Izračunata Mr za $C_{12}6H_{238}O_{28}S_7$ = 2425,7 g mol^{-1}

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 6,69 (s, 7H, OH-2); 5,23 (s, 7H, OH–3); 4,96 (d, 7H, H-1); 4,03-3,88 (m, 14H, H-3, H-5); 3,72 (d, 7H, H-2); 3,70 (d, 7H, H-4); 3,06 (d, 7H, H_b-6); 2,87(m, 7H, H_a-6); 2,60 (t, 14 H, SC*H*$_2$); 1,65 (m, 14 H, SCH_2CH_2); 1,56 (m, 14H, $SCH_2CH_2CH_2$); 1,26 (br s, 126H, CH_2), 0,87 (t, 21H, CH_3).

*3.2.3. Sinteza heptakis-[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina, EO-CD-SR (**3**)*

Posljednji korak u sintezi heptakis-[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina **3** napravljen je prema literaturnim podacima.[105] Heptakis-(6-deoksi-6-dodeciltio)-β-ciklodekstrin **2** (200 mg, 0,082 × 10^{-3} mol), K_2CO_3 (20 mg, 0,15 × 10^{-3} mol, 10% mase spoja **2**) i etilen karbonat (360 mg, 4,1 × 10^{-3} mol) otope se u 2 ml tetrametiluree. Reakcijska smjesa miješa se 4 h na temperaturi od 150°C. Reakcija se prati TLC-om u sustavu otapala kloroform : metanol : voda = 5 : 1 : 0,1. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa upari se na vakuum pumpi uz tekući dušik. Dobiveni produkt heptakis-[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrin **3** pročisti se višestrukom prekristalizacijom iz 20% acetona u MeOH. Dobiveno je 150 mg (60 %) spoja **3**. Rf (EO-CD-SR) = 0,5. Izračunata Mr za $C_{154}H_{295}O_{42}S_7$ = 3034 g mol^{-1}. Izmjereno: MS (MALDI): m/z = 2815,8516 $[M_{9EO} + H]^+$, 2860,8606 $[M_{10EO} + H]^+$, 2903,8667 $[M_{11EO} + H]^+$, 2947,8958 $[M_{12EO} + H]^+$, 2991,8943 $[M_{13EO} + H]^+$, 3035,8867 $[M_{14EO} + H]^+$, 3079,8958 $[M_{15EO} + H]^+$, 3123,8853 $[M_{16EO} + H]^+$, 3167,8899 $[M_{17EO} + H]^+$, 3211,9041$[M_{18EO} + H]^+$.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 5,05 (br s, 7H, H-1); 4,17-3,44 (m, 84H, H-2, H-3, H-4, H-5, OCH_2CH_2O); 3,10-2,84 (m, 14H, H_a-6, H_b-6); 2,59 (m, 14 H, SCH_2); 1,57 (m, 14 H, SCH_2CH_2); 1,26 (br m, 126H, CH_2), 0,88 (t, 21H, CH_3).

3.3. Određivanje konstanti vezanja adamantanskih gvanidina i β-ciklodekstrina metodom spektralne izmjene

Metoda spektralne izmjene (SDT) korištena je za određivanje konstante vezanja (K_a') β-ciklodekstrina i adamantanskih gvanidina AG 1-5. Pripremljene su otopine fenolftaleina (1×10^{-4} mol dm^{-3}), β-ciklodekstrina (1×10^{-3} mol dm^{-3}) i adamantanskih gvanidina (1×10^{-3} mol dm^{-3} AG1, AG3, AG4 i 2×10^{-3} mol dm^{-3} AG2 i AG5) u 4×10^{-3} mol dm^{-3} Na_2CO_3 puferu pH 10,6. Eksperiment je proveden u mikrotitarskoj pločici. Apsorbancija je mjerena na spektrofotometru pri valnoj duljini od 552 nm. Svi uzorci mjereni su u duplikatu. U mikrotitracijsku pločicu pipetirane su pripremljene otopine da bi se dobila: a) ovisnost apsorbancije o koncentraciji fenolftaleina (PP), b) konstanta vezanja β-CD i PP te c) konstanta vezanja β-CD i AG 1-5.

a) Ovisnost apsorbancije o koncentraciji fenolftaleina

U jažice je dodano 200 μl pripravljenih standardnih otopina fenolftaleina (PP) u rasponu koncentracija od 3×10^{-6} mol dm^{-3} do 3×10^{-5} mol dm^{-3} dobivenih binarnim razrijeđenjem 1×10^{-4} mol dm^{-3} otopine fenolftaleina.

b) Konstanta vezanja (K_a) β-CD i PP

U mikrotitracijskoj pločici pripavljena je serija otopina u kojima je koncentracija PP bila konstantna (3×10^{-5} mol dm^{-3}), a mijenjala se koncentracija β-CD. Standardne otopine β-CD u rasponu koncentracija od 5×10^{-5} mol dm^{-3} do 8×10^{-4} mol dm^{-3} napravljene su binarnim razrijeđenjem 1×10^{-3} mol dm^{-3} otopine β-ciklodekstrina pri čemu je u jažice dodano 140 μl pripravljenih otopina i 60 μl fenolftaleina (1×10^{-4} mol dm^{-3}). Konstanta vezanja između β-ciklodekstrina i fenolftaleina dobivena je iz nagiba pravca.

c) Konstanta vezanja (K_a') β-CD i AG 1-5

Koncentracije β-ciklodekstrina (2×10^{-4} mol dm^{-3}) i fenolftaleina (3×10^{-5} mol dm^{-3}) u mikrotitracijskoj pločici bile su konstantne, a mijenjana je koncentracija adamantanskih gvanidina. U jažice je dodano 100 μl pripremljenih standardnih otopina adamantanskih gvanidina (AG1, AG3 i AG4 u rasponu koncentracija $1,5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} do 1×10^{-3} mol dm^{-3} te AG2 i AG5 u rasponu koncentracija $2,5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} do $1,3 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} dobivenim binarnim razrjeđenjem prethodno pripremljenih otopina), 40 μl β-ciklodekstrina (1×10^{-3} mol dm^{-3}) i 60 μl fenolftaleina (1×10^{-4} mol dm^{-3}). K_a' između β-ciklodekstrina i adamantanskih gvanidina dobivena je iz nagiba pravca.

3.4. Priprava liposoma i ciklodekstrinskih vezikula

Priređene su tri vrste vezikula koje su se sastojale od fosfatidilkolina (PC) i amfifilnog derivata β-ciklodekstrina:

1) PC liposomi
2) PC : EO-CD-SR liposomi u molarnom omjeru 2 : 1
3) EO-CD-SR vezikule

Amfifili, PC i EO-CD-SR, otopljeni su u kloroform : MeOH = 2 : 1. Ukupna koncentracija amfifila iznosila je 5×10^{-4} mol dm^{-3} (za SDT), 1×10^{-3} mol dm^{-3} (za DLS) ili 2×10^{-3} mol dm^{-3} (za FCS). Nakon uparavanja otapala lipidni film je hidratiziran s 10×10^{-3} mol dm^{-3} HEPES puferom pH 7,4. Liposomi i ciklodesktrinske vezikule su stavljene u ultrazvučnu kupelj 1 h. Pripravljeni liposomi i ciklodekstrinske vezikule ostavljeni su preko noći na 4°C kako bi se stabilizirali. Veličina liposoma i ciklodekstrinskih vezikula smanjena je sonificiranjem (Soniprep 150) 5 puta po 5 sekundi u tri ciklusa. Nakon sonificiranja u liposome i ciklodekstrinske vezikule dodane su otopine adamantanskih gvanidina (AG 1-5). Koncentracija dodanih adamantanskih gvanidina u ciklodekstrinske vezikule i PC : EO-CD-SR liposome jednaka je polovici koncentracije EO-CD-SR. Koncentracija AG u PC liposomima jednaka je kao u PC : EO-CD-SR liposomima.

3.5. Ugrađivanje spojeva adamantanskih gvanidina u prethodno pripravljene liposome i ciklodekstrinske vezikule

Efikasnost ugrađivanja derivata adamantanskih gvanidina u liposome i ciklodekstrinske vezikule određena je spektrofotometrijski u supernatantima nakon centrifugiranja mjerenjem apsorbancije spojeva pri valnoj duljini od 240 nm. Liposomi i ciklodekstrinske vezikule su centrifugirani pri 3220 rpm, 1 h na 10°C da bi se odvojio neugrađeni AG. Standardne krivulje za pojedini AG konstrutirane su prije analize supernatana liposoma i ciklodekstrinskih vezikula. Koncentracije AG korištenih za standardne krivulje iznose od 1×10^{-5} mol dm^{-3} do 2×10^{-4} mol dm^{-3}. Količina neugrađenih spojeva u supernatantima određena je iz standardnih pravaca, a količina ugrađenog materijala indirektno je izračunata oduzimanjem količine spojeva u supernatantima od ukupne količine spojeva korištenih za pripravu liposoma i ciklodekstrinskih vezikula. Na temelju omjera mase ugrađenog i početnog materijala određena je efikasnost ugrađivanja u liposome i ciklodekstrinske vezikule.

3.6. Određivanje veličine i zeta potencijala liposoma i ciklodekstrinskih vezikula

Veličina i zeta potencijal liposoma i ciklodekstrinskih vezikula sa i bez dodanih derivata AG 1-5 određeni su korištenjem Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) opremljen zelenim laserom (532 nm). Sva mjerenja provedena su pri 25° C u 10×10^{-3} mol dm^{-3} HEPES puferu pH 7,4. Koncentracija amfifila u liposomima i ciklodekstrinskim vezikula iznosila je 2×10^{-4} mol dm^{-3}. Veličina liposoma i ciklodekstrinskih vezikula iskazana je kao srednja vrijednost mjerenja dobivenih korištenjem softvera Zetasizer Nano. Svi uzorci mjereni su deset puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.

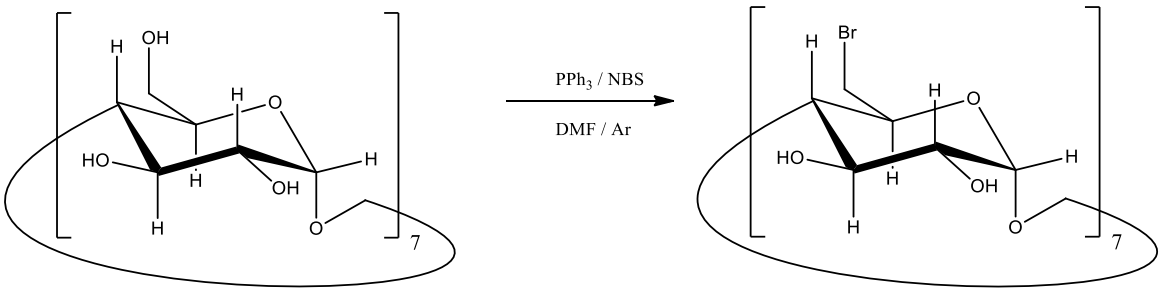
3.7. Određivanje interakcija DNA i adamantanskih gvanidina ugrađenih u liposome i ciklodekstrinske vezikule

Određivanje interakcije između liposoma i ciklodekstrinskih vezikula s ugrađenim adamantanskim gvanidinima (AG 1-5) i fluorescentno obilježene dvolančane DNA provedeno je korištenjem fluorescencijske korelacijske spektroskopije (FCS). Za ispitivanje elektrostatskih interakcija korištena je dvolančana DNA s 120 parova baza (dsDNA 120) obilježena fluoroforom cijanin 5 (Cy5) konačne koncentracije 20×10^{-9} mol dm^{-3}. FCS mjerenja provedena su na Leica DMi8 konfokalnom mikroskopu sustava s PicoHarp 300 vremenski koreliranim modulom i s diodnim detektorima. Mjerenja u trajanju od 100 s napravljena su pri valnoj duljini od 632 nm. Korelacijska analiza napravljena je korištenjem programa Quick Fit 3,0 software. Eksperiment je poveden u ibidi pločicama s 8 jažica. Konačna koncentracija amfifila u liposomima i ciklodekstrinskim vezikulama sa ili bez ugrađenih spojeva za FCS mjerenja iznosila je $1,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}. Liposomi i ciklodekstrinske vezikule pripravljene su u HEPES puferu (10×10^{-3} mol dm^{-3}, pH 7,4). U suspenziju liposoma i ciklodekstrinskih vezikula dodana je Cy5 dsDNA 120 (20×10^{-9} mol dm^{-3}). U otopinama liposoma i ciklodekstrinskih vezikula kod kojih je uočeno postojanje interakcija s Cy5 dsDNA napravljena je titracija tako da je 20×10^{-9} mol dm^{-3} Cy5 dsDNA 120 titrirana sa suspenzijama liposoma i ciklodekstrinskih vezikula u koje su ugrađeni AG 1-4 (koncentracija amfifila $1,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}). Sva FCS mjerenja provedena su u HEPES puferu (10×10^{-3} mol dm^{-3}, pH 7,4) na sobnoj temperaturi.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina

Prvi specifični cilj diplomskog rada bila je sinteza heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina koja se sastoji od tri koraka. Prvi korak sinteze je priprava heptakis-(6-bromo-6-deoksi)-β-ciklodekstrina **1**[102] koji je dobiven nukleofilnom supstitucijom OH skupine na C-6 položaju β-ciklodekstrina sa bromom. Kao izvor broma u reakciji korišten je *N*-bromsukcinimid (NBS). Reakcijom PPh_3 i NBS-a nastaje fosfonijeva sol koja prilikom reakcije s OH skupinom β-ciklodekstrina tvori alkoksifosfonijevu sol, a otpušta se sukcinimid. Zagrijavanjem reakcijske smjese pri 80°C formira se produkt heptakis(6-bromo-6-deoksi)-β-ciklodekstrin **1** (Shema 3) uz otpuštanje trifenilfosfin oksida. Produkt **1** je izoliran filtriranjem dobivenog precipitata ulijevanjem reakcijske smjese u vodu ohlađenu na 0°C i ispiranjem dobivenog taloga s MeOH da se ukloni trifenilfosfinijev oksid koji nastaje u reakciji. Heptakis(6-bromo-6-deoksi)-β-ciklodekstrin **1** dobiven je u dobrom iskorištenju (81%), a struktura je potvrđena ^{1}H-NMR spektroskopijom.

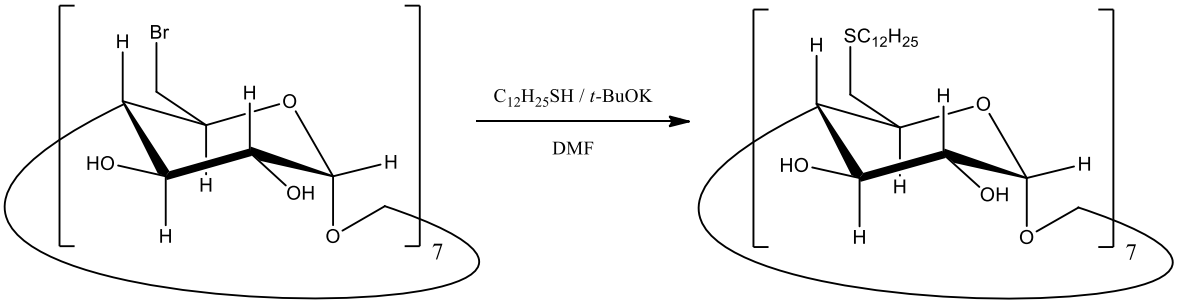


1

Shema 3. Shematski prikaz priprave spoja heptakis-(6-deoksi-6-bromid)-β-ciklodekstrina **1**

Drugi korak je sinteza spoja heptakis(6-deoksi-6-dodeciltio)–β-ciklodekstrina **2**[103,104] koji je dobiven alkiliranjem C-6 položaja heptakis(6-bromo-6-deoksi)-β-ciklodekstrina **1** (shema 4). Nukleofil, dodekantiolni anion, dobiven je *in situ* reakcijom 1-dodekantiola i *t*-BuOK, kao baze. Reakcija je vrlo spora zbog čega se provodi 5 dana. Ulijevanjem reakcijske smjese u

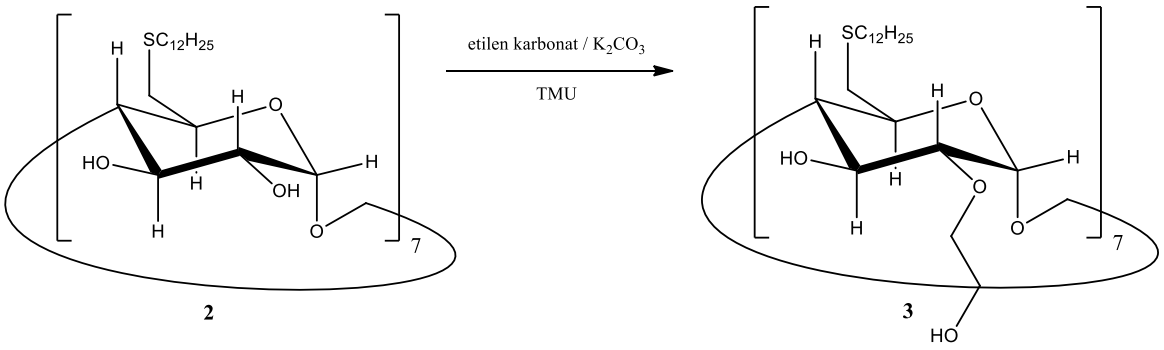
hladnu vodu dolazi do precipitacije produkta **2** koji je ispran s MeOH i heksanom. Kako bi se uklonio neizreagirani 1-dodekantiol, dobiveni talog se kuha u heksanu. Struktura dobivenog produkta heptakis-(6-deoksi-6-dodeciltio)-β-ciklodekstrina **2** potvrđena je ^{1}H-NMR spektroskopijom.



1 **2**

Shema 4. Shematski prikaz priprave spoja heptakis-(6-deoksi-6-dodeciltio)-β-ciklodekstrina **2**

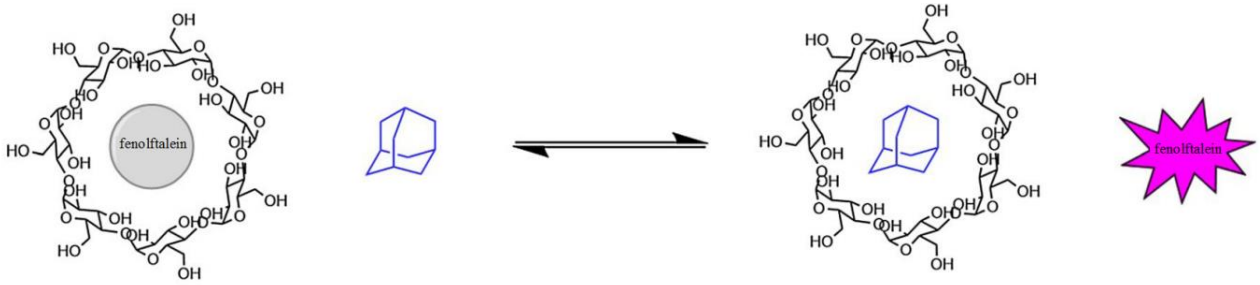
Treći, posljednji korak je sinteza heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikola)]-β-ciklodekstrina **3**[105] iz prethodno dobivenog heptakis-(6-deoksi-6-dodeciltio)-β-ciklodekstrina **2**, etilen karbonata i K_2CO_3 (shema 5). Kao otapalo korištena je tetrametilurea (TMU) zbog visokog vrelišta, budući da je za provođenje reakcije potrebna temperatura od 150°C. K_2CO_3 je korišten kao baza za deprotoniranje najkiselijeg protona (OH-2) β-ciklodekstrina pri čemu se formira nuklofil koji će uzorkovat adiciju etilen karbonata. Adicijom etilen karbonata dolazi do otvaranja prstena cikličkog estera uz eliminaciju CO_2 što rezultira razvijanjem topline. Dobiveni produkt heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrin **3** se pročisti prekristalizacijom iz 20% acetona u MeOH, a njegova struktura je potvrđena ^{1}H-NMR spektroskopijom i MS-om. MS spketroskopijom (engl. *mass spectroscopy*, MS) potvrđen je polimerni slijed od 9 do 18 etilen glikolnih jedinica vezanih na sekundarni obod β-ciklodekstrina pri čemu su dobiveni pikovi odvojeni za 44 masene jedinice što odgovara masi jedne etilen glikolne jedinice. Pokazano je da najintenzivniji pik odgovara polimernom slijedu od 13 etilen glikolnih jedinica što govori u prilog da je taj polimerni slijed najzastupljeniji na sekundarnom obodu β-ciklodekstrina.



Shema 5. Shematski prikaz priprave spoja heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrina **3**

4.2. Određivanje konstanti vezanja adamantanskih gvanidina i ß-ciklodekstrina metodom spektralne izmjene

Konstanta vezanja je vrijednost koja opisuje afinitet vezanja dviju molekula u ravnotežnom stanju. SDT je korištena za određivanje kostante vezanja (K_a') između β-ciklodekstrina i derivata adamantanskih gvanidina, pri čemu je kao kompetitivni kromoforni ligand korišten fenolftalein (slika 12).[96] Istiskivanjem kromofornog liganda drugim analitom iz šupljine β-ciklodekstrina posljedica je podjednake veličine analita i kromofornog liganda.[95,96] Prilikom ugradnje PP u β-ciklodekstrinsku šupljinu dolazi do promjene u strukturi PP, pri čemu se ružičasto obojena dianionska forma transformira u bezbojnu laktanoidnu formu. Zbog nastanka laktanoidnog oblika fenolftaleina dolazi do obezbojenje ružičaste otopine fenolftaleina.[106]

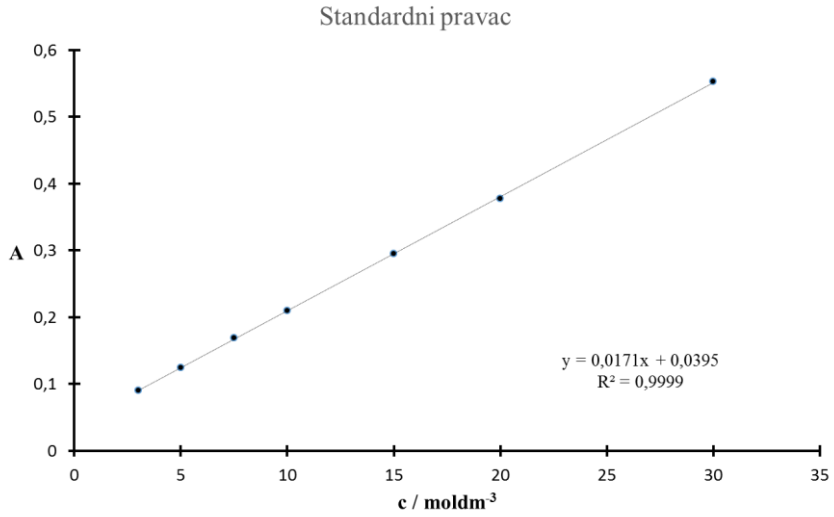


Slika 12. Shematski prikaz izmjene kromofora (PP) i analita (adamantan) u otopini[96]

a) Ovisnost apsorbancije o koncentraciji fenolftaleina

Kako bi se konstruirao standardni pravac korištene su priređene otopine fenolftaleina u rasponu koncentracija od 3×10^{-6} mol dm^{-3} do 3×10^{-5} mol dm^{-3} te je izmjerena apsorbancija

pri 552 nm. Konstruiran je standaradni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji fenolftaleina kako bi se u daljnjim eksperimentima mogla odrediti konstanta vezanja. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji fenolftaelina prikazana je na slici 13.



Slika 13. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji fenolftaleina. [PP] = 3×10^{-6} mol dm^{-3} do 3×10^{-5} mol dm^{-3}

b) Konstanta vezanja (K_a) β-CD i PP

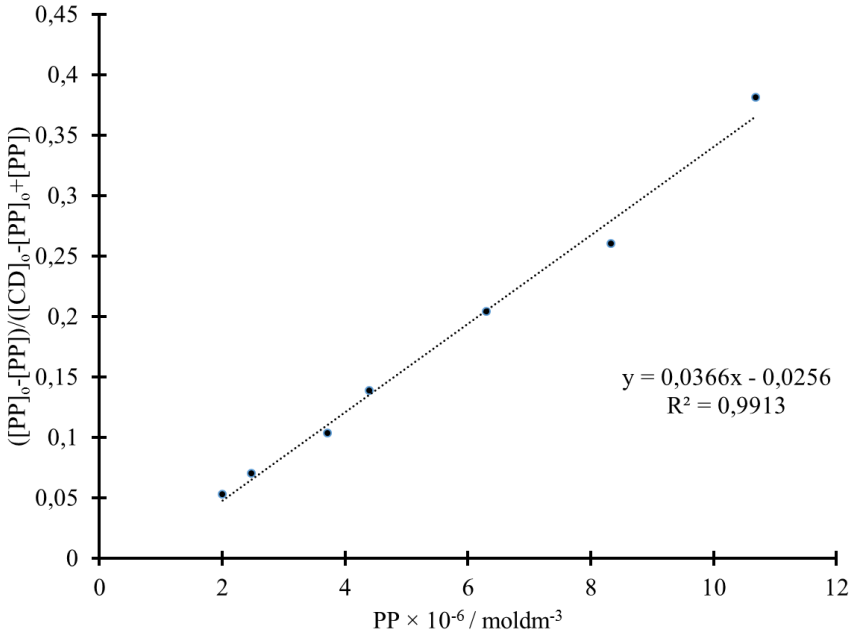
Konstanta vezanja (K_a) β-ciklodekstrina i fenolftaleina dobivena je korištenjem otopina β-ciklodekstrina u rastućem rasponu koncentracija (35×10^{-6} mol dm^{-3} do 560×10^{-6} mol dm^{-3}) pri čemu je koncentracija dodanog fenolftaleina bila stalna (30×10^{-6} mol dm^{-3}). Dodatkom fenolftaleina u otopine β-ciklodekstrina rastućih koncentracija dolazi do gubitka ružičastog obojenja što je dokaz ugrađivanja molekula fenolftaleina u šupljinu β-ciklodekstrina. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije pri 552 nm, iz standardnog pravca, izračunata je koncentracija PP u otopinama i napravljena je ovisnost $([PP]_0 - [PP]) / ([CD]_0 - [PP]_0 + [PP])$ o [PP] (slika 14). Iz jednadžbe pravca određena je K_a vrijednost koja odgovara nagibu pravca, a definirana je jednadžbom (4).[96]

$$K_a = \frac{[PP]_o - [PP]}{[PP]([CD]_o - [PP]_o + [PP])} \quad (4)$$

gdje je $[PP]_0$ – početna koncentracija fenolftaleina, [PP]-konačna koncentracija fenolftaleina, $[CD]_0$- početna koncentracija β-ciklodekstrina.

Dobivena vrijednost konstante vezanja između β-ciklodekstrina i fenolftaleina iznosi $3{,}39 \pm 0{,}19 \times 10^4$ dm^3 mol^{-1}. Iz jednadžbe pravca određena je vrijednost K_a koja se nalazi u rasponu

literaturnih[100] vrijednosti od 3,1 × 10^4 dm^3 mol^{-1} do 3,4 × 10^4 dm^3 mol^{-1} čime je pokazano da se fenolftalein uspješno ugrađuje u šupljinu β-ciklodekstrina u postavljenim eksperimentalnim uvjetima.



Slika 14. Primjer grafičkog prikaza ovisnosti $([PP]_o-[PP])/([CD]_o-[PP]_o+[PP])$ i [PP] za određivanje konstante vezanja (K_a) između PP i CD. $[PP]_0 = 30 \times 10^{-6}$ mol/dm^3, $[CD]_0 = 35 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} do 560 × 10^{-6} mol dm^{-3}. Koncentracija PP je određena iz apsorbancije pri 552 nm pomoću standardnog pravca

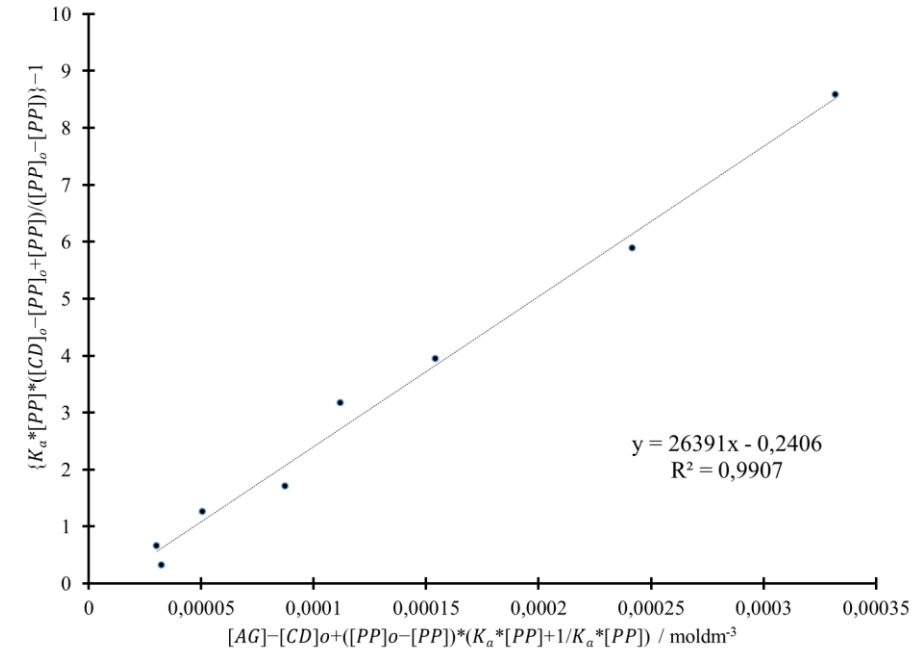
c) Konstanta vezanja (K_a') β-CD i AG 1-5

Na temelju literaturnih podataka,[97] pod pretpostavkom da dolazi do 1:1 kompleksiranja između β-ciklodekstrina i adamantanskih gvanidina, određena je kostanta vezanja (K_a') između β-ciklodekstrina i adamantanskih gvanidina, a definirana je jednadžbom (5)[96]:

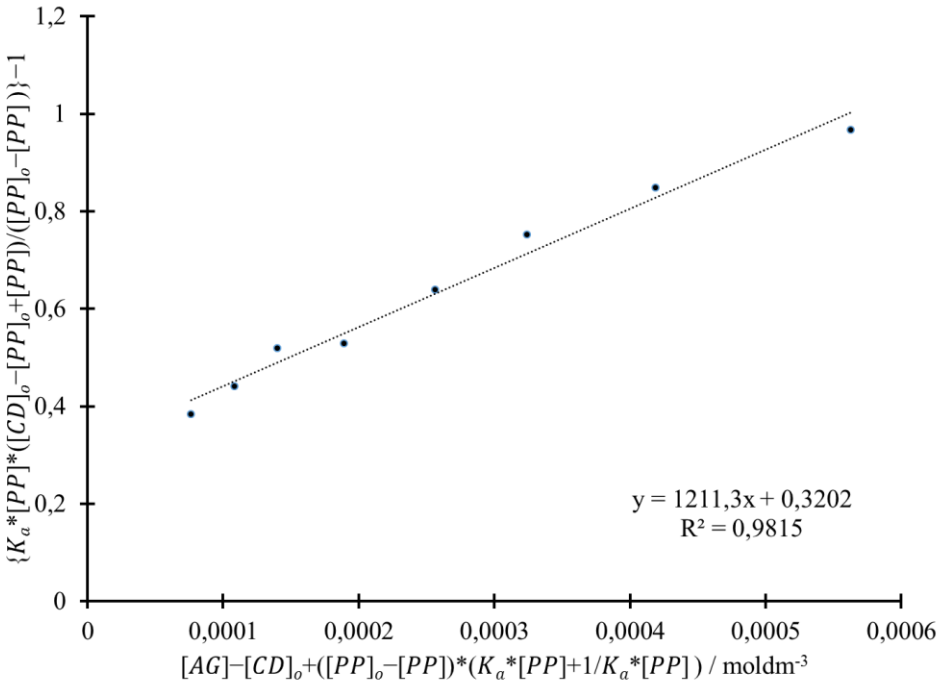
$$K_a' = \frac{\frac{Ka[PP]([CD]_o-[PP]_o+[PP])}{[PP]_0-[PP]}-1}{[AG]-[CD]_0+([PP]_0-[PP])\left(\frac{Ka[PP]+1}{Ka[PP]}\right)} \qquad (5)$$

gdje je [AG]-koncentracija adamantanskih gvanidina u jažicama, K_a – konstanta vezanja fenolftaleina i β-ciklodekstrina, $[PP]_0$ – početna koncentracija fenolftaleina, [PP]-konačna koncentracija fenolftaleina, $[CD]_0$- početna koncentracija β-ciklodekstrina.

a)



b)



Slika 15. Određivanje vrijednosti konstante K_a' za: a) monosupstituriani AG (AG1) i β-CD te b) disupstituirani AG (AG5) i β-CD iz ovisnosti $\{K_a*[PP]*([CD]–[PP]_0+[PP])/ [PP]_0-[PP]\}-1$ o $[AG]–[CD]_0+([PP]_0-[PP])*(K_a*[PP]+1 / K_a * [PP])$. $K_a = 3,39 \pm 0,19 \times 10^4$ dm^3 mol^{-1}, $[PP]_0 = 30 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3}, [CD] = 2×10^{-4} mol dm^{-3}, koncentracije adamantanskih gvanidina iznosile su od $1,25 \times 10^{-4}$ do $6,5 \times 10^{-4}$ mol/dm^3. Koncentracija PP je određena iz apsorbancije pri 552 nm.

Konstanta vezanja (K_a') β-ciklodekstrina i derivata adamantanskih gvanidina (AG 1-5) određena je dodatkom β-ciklodekstrina (2×10^{-4} mol dm^{-3}) i fenolftaleina (3×10^{-5} mol dm^{-3}), u otopine rastućih koncentracija adamantanskih gvanidina. Pri većim koncentracijama adamantanskih gvanidina ne dolazi do gubitka ružičastoga obojenja što je posljedica istiskivanja fenolftaleina iz šupljine β-ciklodekstrina uz pomoć adamantanskih gvanidina. S obzirom da PP i β-CD u alkalnom mediju tvore 1:1 komplekse te dodatkom adamantanskih gvanidina dolazi do djelomičnog istiskivanja fenolftalein dianiona koji uzrokuje ružičasto obojenje.[107] Iz nagiba pravca koristeći jednadžbu (5) određena je konstanta vezanja K_a' između β-ciklodekstrina i adamantanskih gvanidina (slika 15). Srednje vrijednost K_a' adamantanskih gvanidina i β-ciklodekstrina nalaze se u Tablici 1.

Tablica 1. Dobivene konstante vezanja K_a' između derivata adamantanskih gvanidina i β-ciklodekstrina korištenjem SDT metode. Konstanta vezanja K_a između fenolftaleina i β-ciklodekstrina iznosi $3{,}39 \pm 0{,}19 \times 10^4$ dm^3 mol^{-1}. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost četiri mjerenja ± standardna devijacija.

Spoj	K_a' / dm^3 mol^{-1}
AG1	$2{,}48 \pm 0{,}31 \times 10^4$
AG2	$1{,}20 \pm 0{,}31 \times 10^3$
AG3	$4{,}35 \pm 0{,}39 \times 10^4$
AG4	$3{,}92 \pm 0{,}37 \times 10^4$
AG5	$1{,}11 \pm 0{,}29 \times 10^3$

U literaturi je opisano kompleksiranje β-ciklodekstrina i adamantana te derivata adamantana, adamantan-1-ola i 1-adamantanmetanola, za koje su izračunate konstante vezanja SDT metodom.[96] Dobivene konstante K_a su u rasponu vrijednosti od $1{,}41 – 1{,}91 \times 10^3$ dm^3 mol^{-1}. Ukoliko ih usporedimo s eksperimentalno dobivenim vrijednostima za adamantanske gvanidine, vidljivo je da se konstante vezanja značajno ne razlikuju.

Ravoo i suradnici[108] proučavali su kompleksiranje između derivata adamantana i β-CD. Određena je vrijednost konstante vezanja (K_a') između maltoza-adamantan konjugata i β-CD izotermalnom titracijskom kalorimetrijom (ITC) pri čemu je K_a' bila u rasponu vrijednosti od $4{,}41 \times 10^4$ dm^3 mol^{-1} i $4{,}02 \times 10^4$ dm^3 mol^{-1}. Osim Ravooa, Car i suradnici su također ispitavili kompleksiranje između derivata adamantana i β-ciklodekstrina ITC-om.[15] Odredili su K_a' između adamantil glikokonjugata i β-ciklodekstrina pri čemu je K_a' bila u rasponu vrijednosti od $2{,}9 – 4{,}1 \times 10^4$ dm^3 mol^{-1}. Na temelju dobivenih vrijednosti vidljivo je da su derivati adamantana dobre inkluzijske (*guest*) molekule za β-ciklodekstrinske (*host*) molekule bez obzira na supstituente vezane na adamantan.[22] Osim određivanja konstante vezanja između β-CD i derivata adamantana, Ravoo i suradnici[104] također su proučavali ostvarivanje inkluzijskih interakcija između adamantan karboksilata i vezikula amfifilnog CD. Konstantu vezanja (K_a') su određivali korištenjem kapilarne elektroforeze uz rastuću koncentraciju adamantan karboksilata.[104] Dobivena vrijednost K_a' je iznosila $7{,}1 \times 10^3$. ITC-om je određena konstanta vezanja između adamantan karboksilata i β-CD te je dobivena vrijednosti iznosila $3{,}2 \times 10^4$ dm^3 mol^{-1}. Pokazano je da dolazi do smanjenja konstante vezanja što je posljedica prisutstva oligo-(etilen glikolnih) jedinica na sekundarnom obodu molekule koje ometaju ulazak adamantana u šupljinu ciklodekstrina.[104,108]

4.3. Priprava liposoma i ciklodekstrinskih vezikula

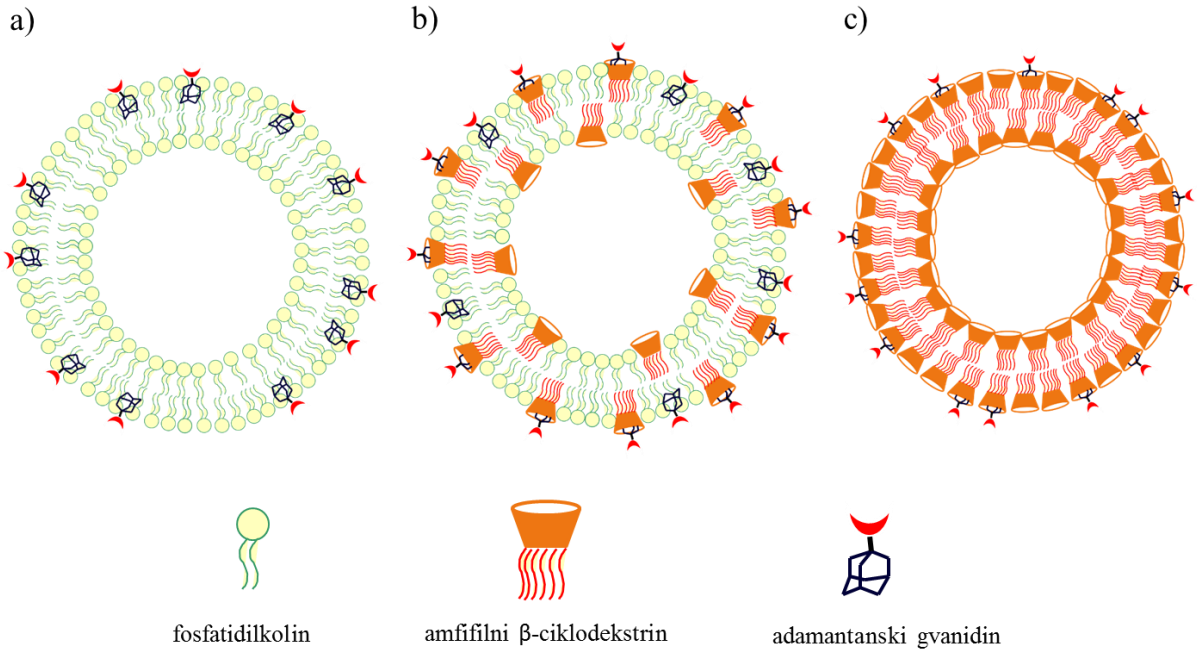
Amfifilni β-CD dobiven je vezanjem hidrofobnog alkilnog lanca na primarnoj i hidrofilnog oligo-(etilen glikola) na sekundarnoj strani β-CD. Amfifilni EO-CD-SR u vodenoj otopini formira unilamelarne vezikule.[104] Poznato je da supramolekulski sustavi amfifilnih CD koji sadrže ugrađene kationske spojeve mogu tvoriti komplekse s DNA te se zbog toga ispituju kao sustavi za gensku dostavu.[9] U prijašnjim istraživanjima pokazano je da se derivati adamantanskih gvanidina ugrađuju u liposome s adamantanskim dijelom kao sidrom dok gvanidinska skupina ostaje izložena na površini liposoma te prepoznaje fosfatne skupine na komplementarnim liposomima.[13] Na temelju prijašnjih istraživanja i literaturnih podataka cilj je bio pripraviti funkcionalni supramolekulski sustav temeljen na kompleksima amfifilnog EO-CD-SR i adamatanskih gvanidina koji bi mogao stvarati komplekse s DNA te se koristiti transfekciji. Stoga je ispitana efikasnost ugrađivanja derivata adamantanskih gvanidina u liposome i ciklodekstrinske vezikule, a također su ispitane interakcije između gvanidinske

skupine izložene na površini liposoma i ciklodekstrinskih vezikula s fluorescentno obilježenom DNA.

Priređene su tri vrste supramolekulskih sustava koji su se sastojali od fosfatidilkolina (PC) i amfifilnog derivata β-ciklodekstrina (slika 16):

1) PC liposomi
2) PC : EO-CD-SR liposomi u molarnom omjeru 2 : 1
3) EO-CD-SR vezikule

Multilamelarni liposomi i ciklodekstrinske vezikule pripravljeni su metodom tankoga lipidnog filma. Hidratacijom lipidnog filma nastaje suspenzija liposoma i ciklodekstrinskih vezikula koje se sastoje od različitih veličina liposoma i ciklodekstrinskih vezikula. Ovakvim načinom priprave formiraju se veliki multilamelarni liposomi i ciklodekstrinke vezikule. Kako bi se postigla suspenzija koja sadrži liposome i ciklodekstrinske vezikule uniformnih veličina, dobivene suspenzije su sonificirane. Nakon stabilizacije liposoma i ciklodekstrinskih vezikula dodani su derivati adamantanskih gvanidina (AG 1-5). Koncentracija dodanih adamantanskih gvanidina bila je jednaka polovici koncentracije EO-CD-SR zato što se AG ugrađuju samo u EO-CD-SR koji su izloženi na vanjskoj površini ciklodekstrinskih vezikula i liposoma. Koncentracija AG u PC liposomima bila je jednaka koncentraciji u PC : EO-CD-SR liposomima da bi se usporedila razlika u ugrađivanju AG u liposome kada je u lipidni dvosloj ugrađen EO-CD-SR.



Slika 16. Shematski prikaz pripravljenih funkcionalnih supramolekulskih sustava temeljenih na kompleksima liposoma i amfifilnog ciklodekstrina s adamantanskim gvanidinima. a) PC liposomi s AG, b) PC : EO-CE-SR liposomi s AG, c) EO-CE-SR vezikule s AG

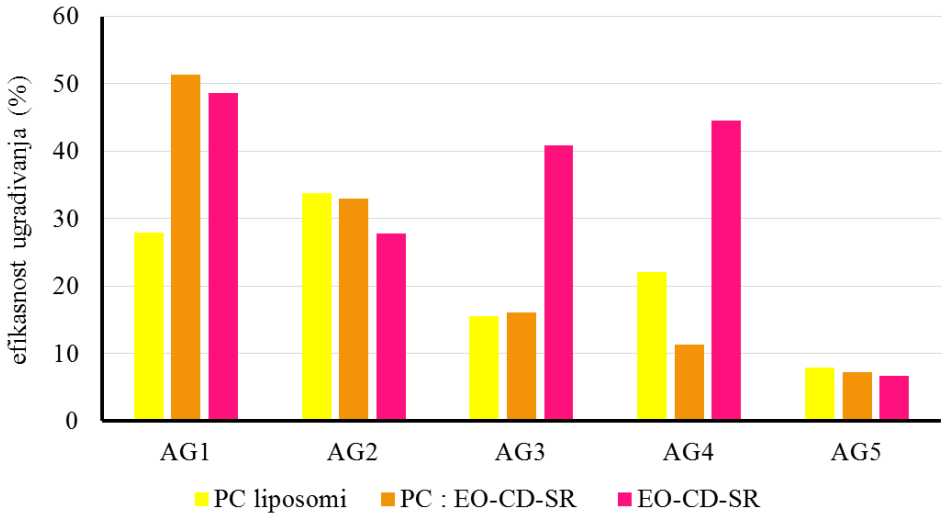
4.4. Određivanje efikasnosti ugrađivanja adamantanskih gvanidina u liposome i ciklodekstrinske vezikule

Kako bi se odredila efikasnost ugrađivanja željenih spojeva u liposome i ciklodekstrinske vezikule potrebno je odvojiti neugrađeni materijal od pripravljenih suspenzija liposoma i ciklodekstrinksih vezikula. Najčešće korištene metode kojima je moguće ukloniti neugrađeni materijal su: dijaliza, gel-filtracijska kromatografija i centrifugiranje.[70,73] Postotak ugrađivanja željenih spojeva u liposome i ciklodekstrinske vezikule ovisit će o raznim faktorima kao što su: steričke smetnje, veličina, sastav i naboj liposoma, metode priprave i kemijska svojstva spojeva koji se želi ugraditi u liposome i ciklodekstrinske vezikule.[109]

Neugrađeni adamantanski gvanidini (AG 1-5) su uklonjeni centrifugiranjem. Dobiveni supernatanti su analizirani spektrofotometrijski, a količina neugrađenog materijala određena je indirektno pomoću baždarnih pravaca.[13] Efikasnosti ugrađivanja spojeva prikazani su na slici 17 iz koje je vidljivo da AG1 ima najveću efikasnost ugrađivanja u liposome i ciklodekstrinske vezikule u odnosu na ostale spojeve (AG 2-5). AG1 ima najveću efikasnost ugrađivanja zbog vezane jedne gvanidinske skupine na adamantan te ne dolazi do steričkog ometanja nastajanja kompleksa. Osim vezane jedne gvanidinske skupine pretpostavlja se da

na efikasnosti ugrađivanja ima utjecaj prisutstva dvostruke veze kojom je gvanidinska skupina vezana na adamantansku strukturu. Uspoređujući efikasnost ugrađivanja AG2 i AG5 gdje oba spoja sadrže dvije gvanidinske skupine vezane na adamantan, vidljivo je da se AG5 mnogo slabije ugrađuje u liposome i ciklodekstrinske vezikule od AG2. Pretpostavka je da na slabiju ugradnju utječe prostorni razmještaj gvanidinskih skupina vezanih na adamantanu te vrsta veze (jednostruka ili dvostruka) pomoću koje se povezuju adamantanska i gvanidinska podjedinica (slika 5). Nadalje efikasnost ugrađivanja AG3 i AG4 je podjednaka budući da se njihove strukture značajno ne razlikuju te se adamantanska skupina može sa svojim velikim dijelom ugraditi u liposome i ciklodekstrinske vezikule. Najslabije ugrađivanje u liposome i ciklodesktrinske vezikule je očekivano za AG5 kao što je prethodno navedeno zbog prostornog razmještaja supstituenata. Dobiveni rezultati su pokazali da efikasnost ugrađivanja derivata adamantanskih gvanidina ovisi o geometriji molekula kao i kemijskoj strukturi ispitivanih spojeva.

Efikasnost ugrađivanja spojeva u liposome ovisi o strukturi molekule, kako fizikalno kemijskim svojstvima tako i stereokemijskim te o metodi ugrađivanja i sastavu liposoma.[13] Dobiveni rezultati koreliraju s razlikama u strukturi ispitivanih adamantanskih gvanidina.



Slika 17. Grafički prikaz efikasnosti ugrađivanja derivata adamantanskih gvanidina (AG 1-5) u liposome i ciklodekstrinske vezikule.

4.5. Određivanje veličine i zeta potencijala liposoma i ciklodekstrinskih vezikula

Svojstva i ponašanje liposoma u *in vivo* uvjetima u velikoj mjeri ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama kao što su veličina, oblik, lamelarnost, efikasnost ugrađivanja i naboj površine liposoma, stoga ih je potrebno karakterizirati.[70,77]

Najčešće korištene tehnike za određivanje veličine liposoma kao i ostalih vezikula koje se koriste kao sustavi za dostavu lijekova su: tehnike elektronske mikroskopije (TEM, „cryo“ TEM, AFM), „field-flow“ frakcioniranje, gel kromatografija (SEC, HPLC-SEC) te statičko ili dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS). [70,77]

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti se često koristi zbog jednostavnosti i brzine provođenja. Međutim njezin nedostatak je što određuje prosječnu, a ne apsolutnu veličinu liposoma. U ovom eksperimentu za određivanje veličine liposoma i ciklodekstrinskih vezikula korištena je DLS metoda zato što se proučavalo kolika je veličina liposoma i ciklodekstrinskih vezikula te dolazi li do promjene u veličini liposoma i ciklodekstrinskih vezikula prilikom ugradnje ispitivanih spojeva.

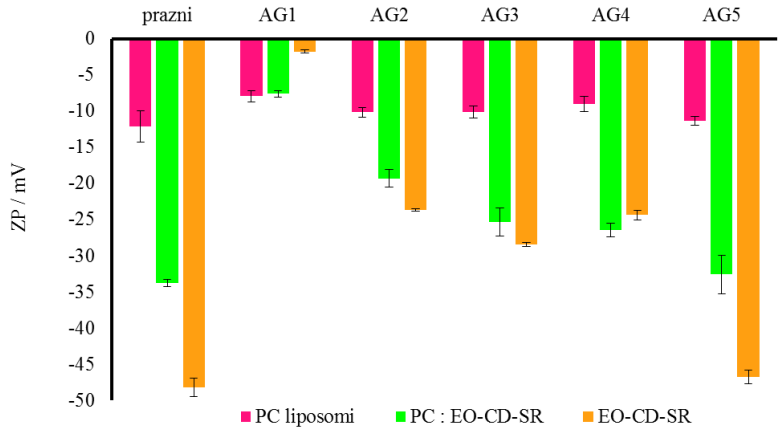
Metodom taknog lipidnog filma nastaju veliki multilamelarni liposomi, stoga je suspenzija liposoma i ciklodekstrinskih vezikula sonificirana kako bi se smanjila polidisperznost suspenzije i dobili liposomi i ciklodekstrinske vezikule manjih veličina. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 2. Dodatkom AG 1-5 u otopine liposoma i ciklodekstrinskih vezikula nije uočena statistički značajna promjena u veličini liposoma i ciklodekstrinskih vezikula.

Tablica 2. Veličina liposoma i ciklodekstrinskih vezikula te indeks polidisperznosti (PdI) dobiveni DLS metodom. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 10 mjerenja ± standardna devijacija

Vrste liposoma i vezikula	d / nm	PdI
PC	164,56 ± 9,11	0,39 ± 0,03
PC : EO-CD-SR	101,86 ±2,34	0,20 ± 0,01
EO-CD-SR	142,55 ± 5,44	0,46 ± 0,06

Također, izmjeren je zeta potencijal liposoma i ciklodekstrinskih vezikula s i bez ugrađenih spojeva (AG 1-5). Rezultati su prikazani na slici 18 iz kojih je vidljivo da

ugrađivanjem spojeva (osim AG 5) dolazi do smanjenja negativne vrijednosti zeta potencijala tj. liposomi i ciklodekstrinske vezikule postaju pozitivnije. Uspoređujući zeta vrijednost za prazne liposome i ciklodekstrinske vezikule te one sa ugrađenim derivatima adamantanskih gvanidina vidljivo je da je najveće smanjenje negativne vrijednosti ugradnjom spojeva u ciklodekstrinske vezikule. Dodatkom AG1 koji sadrži jednu gvanidinsku skupinu dolazi do njegovog lakog smještanja u lipidni dvosloj liposoma i u šupljinu CD što je rezultiralo najvećim smanjenjem zeta potencijala. Uspoređujući ga s AG2 vidljivo je da dodatak AG2 smanjuje negativan zeta potencijal u manjoj mjeri nego AG1, a posljedica je prisutnost dviju gvanidinskih skupina koje otežavaju ulazak u CD šupljinu. Također AG2 zbog svoje strukture teže se smješta i u lipidni dvosloj liposoma što je vidljivo malim smanjenjem negativnog potencijala. Uspoređujući vrijednost zeta potencijala za AG3 i AG4 vidljivo je da nema velike razlike u dobivenim vrijednostima što je upravo posljedica slične strukture između AG3 i AG4. Prilikom dodatka AG5 u liposome i ciklodekstrinske vezikule vrijednost zeta potencijala se ne mijenja što je očekivano zbog sterički smetnji jer se AG5 najteže smješta u liposome i ciklodekstrinske vezikule. Dobiveni rezultati kojima je pokazano smanjenje negativnog potencijala prilikom dodavanja AG 1-4 u liposome i ciklodekstrinske vezikule pokazuju da se dodani AG nalazi na površini liposoma i ciklodekstrinskih vezikula.



Slika 18. Grafički prikaz promjene zeta potencijala liposoma i ciklodekstrinskih vezikula bez i s ugrađenim spojevima. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 3 mjerenja ± standardna devijacija

U literaturi je opisana vrijednost zeta potencijala za vezikule EO-CD-SR u fosfatnom puferu (pH 7,1) te ona iznosi -12,5 mV. Negativan potencijal površine vezikula amfifilnog β-ciklodekstrina objašnjava se prisutnošću etilen glikolnih jedinica na površini vezikula.[110]

Navedena opažanja su u skladu s dobivenim vrijednostima u ovome eksperimentu zbog prisutnosti oligo-(etilen glikolnih) jedinica na površini EO-CD-SR vezikula.

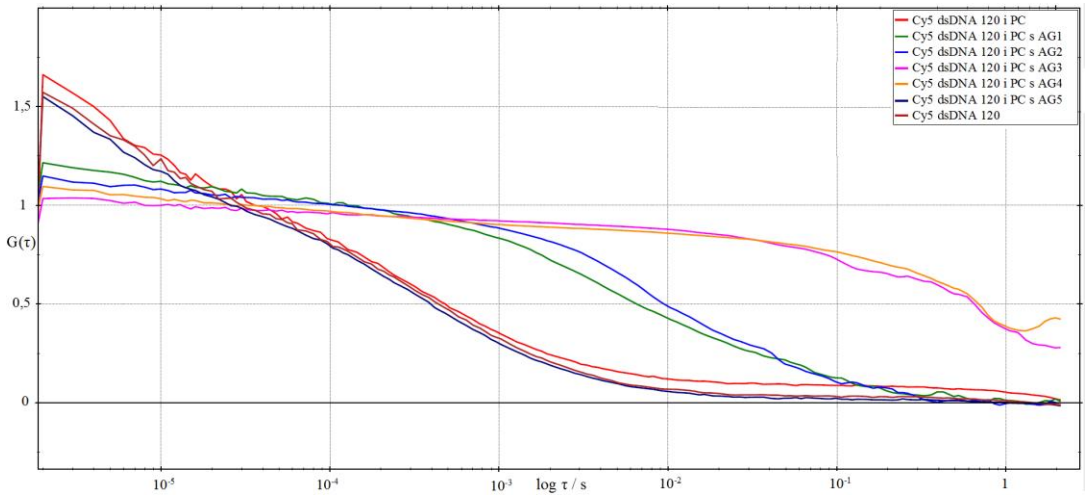
4.6. Određivanje interakcija DNA i adamantanskih gvanidina ugrađenih u liposome i ciklodekstrinske vezikule

Fluorescentna korelacijska spektroskopija (FCS) je metoda se temelji na analiziranju varijacija u difuzijskom koeficijentu fluorofora i moguće ju je koristiti u istraživanjima „host-guest“ kompleksiranja kada je fluorofor vezan na molekulu domaćina ili gosta. Povećanje molekulske mase prilikom formiranja „*host-guest“* kompleksa rezultira promjenom difuzijskog koeficijenta iz čega je moguće izračunati konstantu nastajanja kompleksa.[111] Kod fluorescencijske korelacijske spektroskopije ključno je korištenje fluorofora kako bi se ispitalo istvarivanje interakcija kod molekula domaćina i gosta koje ne posjeduju svojstva fluorofora.[111]

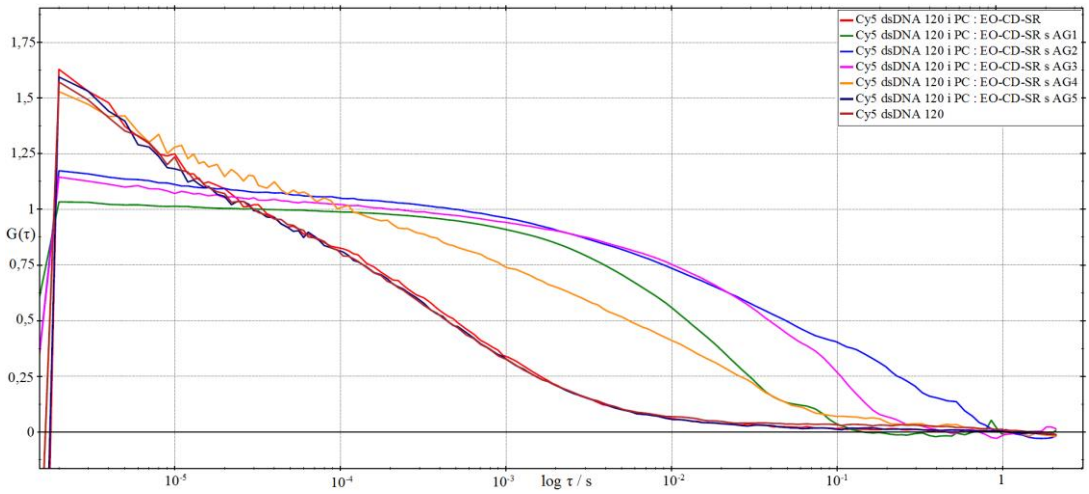
FCS metoda je korištena za ispitivanje interakcija između liposoma i ciklodekstrinskih vezikula u koje su ugrađeni derivati adamantanskih gvanidina (AG 1-5) i fluorescentno obilježene DNA, Cy5 dsDNA 120. Rezultati su potvrdili kako dolazi do interakcije između gvanidinske skupine koja se nalazi na površini liposoma i ciklodekstrinskih vezikula i fosfatnih skupina polinukleotidnog lanca DNA. Vezanje Cy5 dsDNA 120 (brzo difundirajuće molekule) i liposoma i ciklodekstrinskih vezikula s ugrađenim adamantanskim gvanidinima (sporo difundirajuće molekule) praćeno je mjerenjem promjene u difuzijskom vremenu.

Ugradnja adamantanskih gvanidina, AG 1-4 (osim AG5), u liposome i ciklodekstrinske vezikule utječe na promjenu u difuzijskom vremenu Cy5 dsDNA 120. Ugradnja AG5 u liposome i ciklodekstrinske vezikule ne utječe na promjenu u difuzijskom vremenu Cy5 dsDNA 120. Već je pokazano da steričke smetnje ometaju ugrađivanje AG5, jer AG5 sadrži dvije gvanidinske skupine koje se nalaze jedna nasuprot druge što otežava smještaj u lipidni dvosloj liposoma ili u šupljinu β-ciklodekstrina.[13] Slika 19 prikazuje normalizirane autokorelacijske krivulje iz kojih se jasno vidi kako prilikom vezanja Cy5 dsDNA 120 s liposomima i ciklodekstrinskim vezikulama s ugrađenim derivatima AG 1-4 dolazi do povećanja difuzijskog vremena DNA što je pokazatelj ostvarivanja pozitivnih intrakcija između gvanidinske skupine i fosfatnih skupina polinukleotidnog lanca Cy5 dsDNA 120. Također na slici 19 je vidljivo da prilikom miješanja Cy5 dsDNA 120 i praznih liposoma i ciklodekstrinskih vezikula kao i kada je korišten spoj AG5 nema promjene u difuzijskom vremenu Cy5 dsDNA 120.

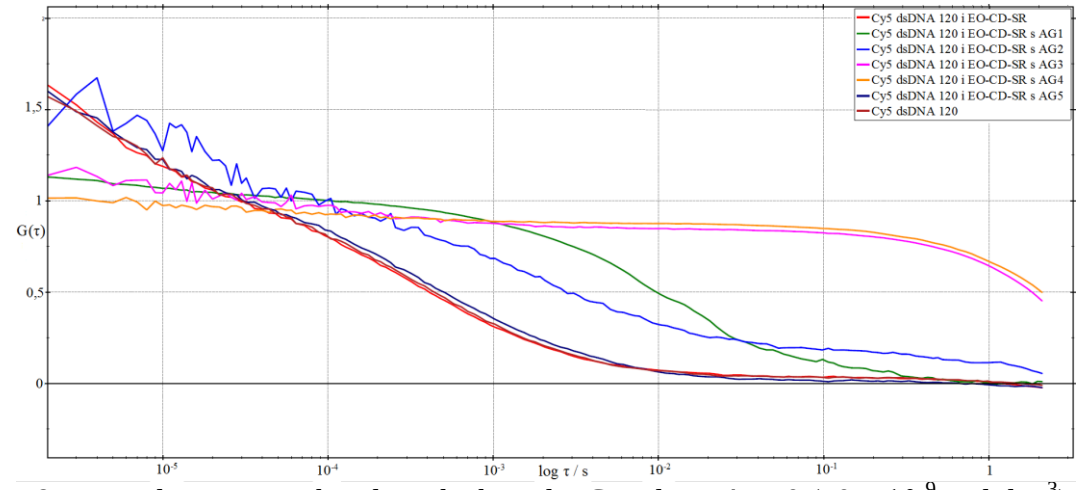
a)



b)

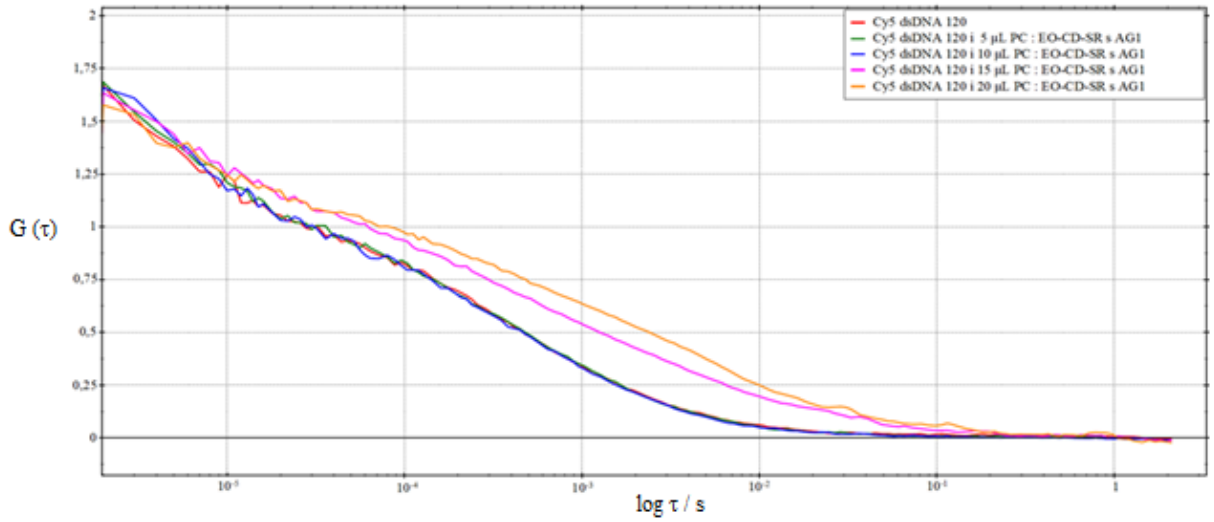


c)



Sika 19. Normalizirane autokorelacijske krivulje Cy5 dsDNA 120 (20×10^{-9} mol dm^{-3}) i liposoma i ciklodekstrinskih vezikula (koncentracija amfifila $1{,}5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}) sa i bez AG 1-5 u 10×10^{-3} mol/dm^{-3} HEPES puferu pH 7,4. a) PC liposomi b)PC : EO-CD-SR liposomi c) EO-CD-SR vezikule

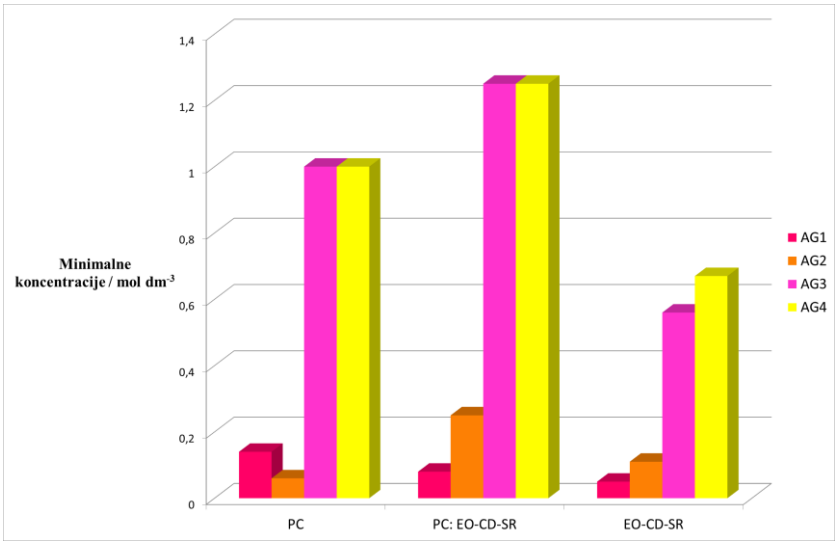
Kako bi se ispitale granične koncentracije amfifila u liposomima i ciklodekstrinskim vezikulama s AG 1-4 potrebne za ostvarivanje interakcija s DNA, provedena je titracija Cy5 dsDNA 120 s liposomima i ciklodekstrinskim vezikulama u koje su ugrađeni derivati adamantanskih gvanidina AG 1-4. Na slici 20 prikazan je primjer titracije Cy5 dsDNA 120 s PC : EO-CD-SR liposomima u koje je bio ugrađen spoj AG1. Uočava se da povećanjem volumena, a samim time i koncentracije, PC : EO-CD-SR liposoma s ugrađenim AG1 dolazi do postupnog povećanja difuzijskog vremena Cy5 dsDNA 120. Postupno povećanje difuzijskog vremena je posljedica ostvarivanja interakcija između Cy5 dsDNA 120 i gvanidinskih skupina izloženih na površini liposoma, a također i ciklodekstrinskih vezikula.



Slika 20. Primjer titracijske krivulje Cy5 dsDNA 120 (20×10^{-9} mol dm^{-3}) s PC : EO-CD-SR liposoma s AG1 dobivene FCS metodom. Koncentracija amfifila iznosila je $1,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}. Mjerenje je rađeno u 10×10^{-3} mol dm^{-3} HEPES puferu pH 7,4

Na slici 21 prikazane su minimalne koncentracije potrebne za ostvarivanje interakcija između Cy5 dsDNA 120 i liposoma i ciklodekstrinskih vezikula s ugrađenim adamantanskim gvanidinima. Minimalne koncentracije dobivene su titracijom Cy5 dsDNA 120 s funkcionalnim supramolekulskim sustavima postupnim povećavanjem volumena dok nije uočeno da dolazi do promjene u difuzijskom vremenu Cy5 dsDNA 120. Iz slike 21 vidljivo je da AG1 i AG2 ugrađeni u liposome, liposome s amfifilnim derivatom ciklodekstrina, PC : EO-CD-SR, i ciklodekstrinske vezikule vežu Cy5 dsDNA 120 bolje nego što je to slučaj za spojeve AG3 i AG4. Preliminarni rezultati su pokazali je kako je FCS izvrsna metoda za analizu interakcija pripravljenih funkcionalnih supramolekulskih sustava s fluorescentno

obilježenom DNA, no za potpuno razumijevanje opaženih interakcija potebni su dodatni eksperimenti i precizno definirani eksperimentalni uvjeti.



Slika 21. Minimalne koncentracije amfifila (PC i EO-CD-SR) u supramolekulskim sustavima s ugrađenim spojevima (AG 1-4) potrebne za ostvarivanje interakcija s Cy5 dsDNA 120 (20×10^{-9} mol dm^{-3}) u HEPES puferu 10×10^{-3} mol dm^{-3}, pH 7,4.

Al-Soufi i suradnici[111] su proučavali ostvarivanje interakcija između fluorescentno obilježenih derivata adamantana i β-ciklodekstrina fluorescentnom korelacijskom spektroskopijom. Pokazano je kako prilikom dodatka β-ciklodekstrina u otopinu fluorescentno obilježenog derivata adamantana, bojom Alexa 488, dolazi do promjene u difuzijskom vremenu.[111] Također su titracijom fluorescento obilježenog adamantana s β-ciklodekstrinom, već pri vrlo niskim koncentracijama β-ciklodekstrina pokazali da dolazi do promjene (povećanje) difuzijskog vremena. Povećanjem difuzijskog vremena već pri niskim koncentracijama potvrđeno je da se derivati adamantana uspješno smještaju u šupljinu β-ciklodesktrina.[111]

§ 5. ZAKLJUČAK

Sintetiziran je amfiflni derivat β-ciklodekstrina, heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-ß-ciklodekstrin (EO-CD-SR) (**3**), s dodeciltiolnim lancima na primarnoj strani i hidrofilnim oligo-(etilen glikolnim) jedinicama na sekundarnoj strani.

Opisano je nastajanje kompleksa između adamantanskih gvanidina i ß-ciklodekstrina metodom spektralne izmjene te je izračunata konstanta vezanja K_a' za sve testirane adamantanske gvanidine AG 1-5. Pokazano je kako se monosupstituirani derivati adamantana bolje ugrađuju u ß-ciklodekstrine od disupstituiranih derivata.

Priređeni su i karakterizirani funkcionalni supramolekulski sustavi adamantanskih gvanidina, AG 1-5 s liposomima građenim od fosfatidilkolina, liposomima u koje je ugrađen amfifilni derivat ciklodekstrina te ciklodekstrinskim vezikulama građenim samo od amfifilnog derivata ciklodekstrina, EO-CD-SR.

Efikasnost ugrađivanja adamantanskih gvanidina u priređene supramolekulske sustave određena je spektrofotometrijski, a veličina i površinski naboj određeni su metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Ispitivani spojevi se uspješno ugrađuju u priređene supramolekulske sustave. Efikasnost ugrađivanja je sukladna kemijskoj strukturi i geometriji molekula te je nađeno da se najslabije ugrađuje spoj adamantanski aminogvanidin, AG5 koji ima dvije gvanidinske skupine na primarnim ugljikovima atomima. Priređeni liposomi i ciklodekstrinske vezikule su negativno nabijeni u opisanim eksperimentalnim uvjetima, a ugrađivanjem adamantanskih gvanidina dolazi do smanjenja negativnog zeta potencijala kao posljedica izloženosti kationa gvanidina na površini.

Interakcije između priređenih kompleksa liposoma i ciklodekstrinskih vezikula s adamantanskim gvanidinima i fluorescentno obilježene DNA potvrđene su metodom fluorescencijske korelacijske spektroskopije. Preliminarni rezultati su pokazali kako pripravljeni funkcionalni supramolekulski sustavi s ugrađenim adamantanskim gvanidinima kompleksiraju Cy5 dsDNA 120, te kako je potrebno dodatno istražiti njihov potencijal za primjenu u genskoj dostavi. Prikupljeni rezultati su originalan znanstveni doprinos bazičnim

istraživanjima novih nanomaterijala za primjenu u biomedicini kao i specifičnu primjenu u genskoj terapiji.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AG1	2-(*N*-gvanidin)iminoadamantan hidroklorid
AG2	2,4-Bis(*N*,*N*'-gvanidin)iminoadamantan dihidroklorid
AG3	1-(3-aminogvanidin)adamantan hidrojodid
AG4	2-(3-aminogvanidin)adamantan hidrojodid
AG5	1,3-Bis-(3-aminogvanidin)adamantan dihidrojodid
CD	β-ciklodekstrin
Cy5	cijanin 5
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*)
DMF	dimetilformamid
dsDNA 120	dvolančana DNA s 120 parova baza
EO-CD-SR	heptakis[6-deoksi-6-dodeciltio-2-*O*-oligo-(etilen glikol)]-β-ciklodekstrin
FCS	fluorescencijska korelacijska spektroskopija (engl. *Fluorescence correlation spectroscopy*)
HEPES	4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etan sulfonska kiselina
MeOH	metanol
MS	masena spektrometrija
NaOMe	natrijev metoksid
NBS	*N*-bromsukcinimid
NMR	nuklearna magnetska rezonanca (engl. *Nuclear magnet resonance*)
PC	L-α-fosfatidilkolin
PPh_3	trifenilfosfin
PP	fenolftalein
SDT	metoda spektralne izmjene (engl. *spectral displacement technique)*
t-BuOK	kalijev *tert*-butoksid

TLC	tankoslojna kromatografija (engl. *thin layer chromatography*)
TMU	tetrametilurea
UV	ultraljubičasto zračenje (engl. *ultraviolet*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. Szejtli, T. Osa, *Comprehensive Cyclodextrin Chemistry*; Pergmon: Oxford, UK, 1996; Volume 3.
2. J. Li, X. J. Loh, *Adv. Drug Deliv. Rev*. **60** (2008) 1000-1017.
3. A.W. Coleman, A. Kasselouri, *Supramol. Chem*. **1** (1993) 155-161.
4. F. Sallas, R. Darcy, *Eur. J. Org. Chem.* **6** (2008) 957–969.
5. J. M. Lehn, Tow, *Proc. Natl. Acad. Sci*. **99** (2002) 4763-4768.
6. G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Science* **295** (2002) 2418-2421.
7. E. Bilensoy, *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, J.Wiley 2011.
8. B. J. Ravoo, R. Darcy, *Angew. Chem. Int. Ed*. **39** (2000) 4324-4326.
9. X. Ma, Y. Zhao, *Chem. Rev.* **115** (2015) 7794-7839.
10. C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *Chem Soc Rev*. **40** (2011) 1586-1608.
11. J. P. Vigneron, N. Oudrhiri, M. Fauquet, L. Vergely, J. C. Bradley, M. Basseville, P. Lehn, J. M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci*. **93** (1996) 9682-9686.
12. R. Duncan, L. Izzo, *Adv. Drug Delivery Rev*. **57** (2005) 2215-2237.
13. M. Šekutor, A. Štimac, K. Mlinarić-Majerski, R. Frkanec, *Org. Biomol. Chem*. **12** (2014) 6005-6013.
14. D. Granadero, J. Bordello, M. J. Perez-Alvite, M. Novo, W. Al-Soufi, *Int. J. Mol. Sci*. **11** (2010) 173-188.
15. Ž. Car, I. Kodrin, J. Požar, R Ribić, D. Kovačević,V. Petrović Peroković, *Tetrahedron* **69** (2013) 8051-8063.
16. J. M. Lehn, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl*. **27** (1988) 89-112.
17. B. Rybtchinski, A*CS Nano* **5** (2011) 6791-6818.
18. K. Liu, Y. Kang, Z. Wang, X. Zhang, *Adv. Mater*. **25** (2013) 5530-5548.
19. K-J. Chen, M. A. Garcia, H.–R.Wang, Tseng, *Supramolecular Nanoparticles for Molecular Diagnostics and Therapeutics. Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd.: New York, 2012.
20. X. Yan, F. Wang, B. Zheng, F. Huang, *Chem. Soc. Rev*. **41** (2012) 6042-6066.

21. E. Marttin, J. C. Verhoef, F. W. M. Merkus, *J. Drug Target*. **6** (1998) 17-36.
22. M. D. Moya-Ortega, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, T. Loftsson, *Int. J. Pharm*. **428** (2012) 152-163.
23. G. Chen, M. Jiang, *Chem. Soc. Rev*. **40** (2011) 2254-2267.
24. D.-S. Guo, Y. Liu, *Acc. Chem. Res*. **47** (2014) 1925-1934.
25. Q. Zhang, N. Re Ko, K. Oh, *J. Chem. Commun*. **48** (2012) 7542-7553.
26. V. Bagnacani, V. Franceschi, L. Fantuzzi, A. Casnati, G. Donofrio, F. Sansone, R. Ungaro, *Bioconjugate Chem*. **23** (2012) 993-1002.
27. E. M. Del Valle, *Process Biochem.* **39** (2004) 1033–1046.
28. J. Boger, R. J. Corcoran, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **61** (1978) 2190-2218.
29. J. Chen, W.-L. Lu, W. Gu, S.-S. Lu, Z.-P. Chen, B.-C. Cai, X.-X. Yang, *Expert Opin. Drug Deliv*. **11** (2014) 565-577.
30. J. Szejtli, *Chem. Rev*. **98 (**1998) 1743-1753.
31. A. Štimac, M. Šekutor, K. Mlinarić-Majerski, L. Frkanec R. Frkanec, *Molecules* **22** (2017) 1-14.
32. T. Ogoshi, A. Harada, *Sensors* **8** (2008) 4961-4982.
33. G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **33** (1994) 803-822.
34. M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc*. **124** (2002) 813-826.
35. T. Irie, K. Uekama, *Adv. Drug Delivery Rev.* **36** (1999) 101-123.
36. S. A. Nepogodiev, J. F. Stoddart, *Chem. Rev*. **98 (**1998) 1959-1976.
37. K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev*. **98** (1998) 2045-2076.
38. R. Villalonga, R. Cao, A. Fragoso, *Chem. Rev*. **107** (2007) 3088-3116.
39. R. Breslow, S. D. Dong, *Chem. Rev*. **98** (1998) 1997-2012.
40. S. Li, W. C. Purdy, *Chem. Rev*. **92** (1992) 1457-1470.
41. A. Harada, Y. Takashima, M. Nakahata, *Acc. Chem. Res.* **47** (2014) 2128–2140.
42. A. E. Christian, M. P. Haynes, M. C. Phillips, G. H. Rothblat, *J. Lipid Res.* **38** (1997) 2264-2272.
43. P. G. Yancey, W. V. Rodrigueza, E. P. C. Kilsdonk, G. W. Stoudt, W. J. Johnson, M. C. Phillips, G. H. Rothblat, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 16026–16034.
44. T. Irie, K. Uekama, *J. Pharm. Sci.* **86** (1997) 147-162.
45. J. Martin, S. Navas, M. Fernandez, M. Rico M. Pardo J. A. Quiroga, F. Zahm, V. Carreno, *Antiviral Res*. **42** (1999) 59-62.

46. T. Sukegawa, T. Furuike, K. Niikura, A. Yamagishi, K. Monde, S.-I. Nishimura, *Chem. Comm*. **0** (2002) 430-431.
47. L. Zerkoune, A. Angelova, S. Lesieur, *Nanomaterials* **4** (2014) 741-765.
48. R. Auzély-Velty, B. Perly, O. Taché, T. Zemb, P. Jéhan, P. Guenot, J.-P. Dalbiez, F. Djedaïni-Pilard, *Carbohydr. Res.* **318** (1999) 82–90.
49. R. Auzély-Velty, F. Djedaïni-Pilard, S. Désert, B. Perly, T. H. Zemb, *Langmuir* **16** (2000) 3727–3734.
50. R. Donohue, A. Mazzaglia, B. J. Ravoo, R. Darcy, *Chem. Commun.* **7** (2002) 2864–2865.
51. A. Kasselouri, A.W. Coleman, A. Baszkin, *J. Colloid Interface Sci.***180** (1996) 384–397.
52. A. Angelova, C. Fajolles, C. Hocquelet, F. Djedaïni-Pilard, S. Lesieur, V. Bonnet, B. Perly, G. Lebas, L. Mauclaire, *J. Colloid Interface Sci.* **322** (2008) 304–314.
53. U. Kauscher, M. C. Stuart, P. Drucker, H.-J. Galla, B. J. Ravoo, *Langmuir* **29** (2013) 7377-7383.
54. R. Frkanec, V. Noethig Laslo, B. Vranešić, K. Mirosavljević, J. Tomašić, *Biochim. Biophys. Acta* **1611** (2003) 187–196.
55. E. I. Bagrij, Adamantan, Nauka, Moscow, 1989.
56. R. C. Fort, *Adamantan – the Chemistry of Diamond Molecules*, Marcel Decker, Inc., New York, 1976.
57. V. Prelog, R. Seiwerth, *Ber. Dtsch. Chem. Ges*. **74** (1941) 1644-1648.
58. P. V. R Schleyer, M. M. Donaldson, R. D. Nicholas, C. Cupas, *Org. Synth*. **42** (1962) 1-4.
59. W. L. Davies, R. R. Grunert, R. F. Haff, J. W. McGahen, E. M. Neumayer, M. Paulshock, J. C Watts, T. R. Wood, E. C. Hermann i C. E. Hoffmann, *Science* **144** (1964) 862–863.
60. V. V. Zarubaev, E. L. Golod, P. M. Anfimov, A. A. Shtro, V. V. Saraev, A. S. Gavrilov, A. V. Logvinov, O. I. Kiselev, *Bioorg. Med. Chem*. **18** (2010) 839 – 848.
61. K.W. Cochran, H. F. Maassab, *Science* **145** (1964) 1443–1444.
62. J. Martin, S. Navas, M. Fernandez, M. Ricom, M. Pardo, J. A. Quiroga, F. Zahm, V. Carreno, *Antiviral Res.* **42** (1999) 59-70.
63. F. Blandini, J. T. Greenamyre, *Drugs Today* **35** (1999) 413–483.
64. L. Wanka, K. Iqbal, P. R. Schreiner, *Chem. Rev.* **113** (2013) 3516–3604.

65. K. Gerzon, E. V. Krumkalus, R. L. Brindle, F. J. Marshall, M. A. Root, *J. Med. Chem.* **6** (1963) 760–763.
66. C. F. Chew, A. Guy, P. C. Biggin, *Biophys. J.* **95** (2008) 5627-5636.
67. G. Lättig-Tunnemann, M. Prinz, D. Hofmann, J. Behlke, C. Palm-Apergi, I. Morano, H. D. Herce, M. C. Cardoso, *Nat. Commun.* **2** (2011) 453–459.
68. M. Šekutor, K. Mlinarić-Majerski, T. Hrenar, S. Tomić i I. Primožič, *Bioorg.Chem.* **41-42** (2012) 28-34.
69. M. Šekutor, Adamantanski spojevi s gvanidinskom podjedinicom: sinteza, karakterizacija i primjena, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013.
70. A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. Woo Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, *Nanoscale Res. Lett.* **8** (2013) 1-8.
71. A. D. Bangham, J. C. Glover, S. Hollingshead, B. A. Pethica, *Biochem. J.* **84** (1962) 513-517.
72. A. Samad, Y. Sultan M. Aqil, *Current Drug Delivery* **4** (2007) 297-305.
73. J. S. Dua, A. C. Rana, A. K. Bhandari, *Int. J. Pharm. Stu. Res.* **3** (2012) 14-20.
74. A. Laouini C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *Jour. of Colloid Sci. and Biotech.* **1** (2012) 147-168.
75. S. S. Chrai, R. Murari, I. Ahmad, *BioPharm* **14** (2001) 10-14.
76. http://www.probonobio.com/technology/sequessomes (11. ožujka 2017.).
77. K. Shashi, K. Satinder, P. Bharat, *Inter. Research Jour of Phar*. **7** (2012) 10-15.
78. S. K. Sahoo, V. Labhasetwar, *Drug Discov. Today* **8** (2003) 1112-1120.
79. http://www.gurupendidikan.co.id/perbedaan-fosfolipid-dan-trigliserida-dalam-biologi/ (11.ožujka 2017.).
80. D. Swaay, A. DeMello, *Lab. Chip* **13** (2013) 752-767.
81. K. Sharma Vijay, D. N. Mishra, A. K. Sharma, B. Srivastava B, *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **1** (2010) 6-16.
82. D. D. Lasic, *Tibitech* **16** (1998) 307-321.
83. A. Sharma, U. S. Sharma, *Int. J. Pharm.* **154** (1997) 123-140.
84. K. C. Duff, A. J. Cudmore, J. P. Bradshaw, *Biochim. Biophys. Acta* **1145** (1993) 149-156.

85. A. Štimac, S. Šegota, M. Dutour Sikirić, R. Ribić, L. Frkanec, V. Svetličić, S. Tomić, B. Vranešić, R. Frkanec, *Biochim. Biophy. Acta* **1818** (2012) 2252–2259.
86. S. Sinha, G. Gupta, M. Vijayan, A. Surolia, *Curr Opin Struct Biol.* **17** (2007) 498-505.
87. M. V. Walter, M. Malkoch, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 4593–4609.
88. R. Duncan, L. Izzo, *Adv. Drug Deliv. Rev*. **57** (2005) 2215–2237.
89. G. Lamanna, J. Russier, C. Menard-Moyon, A. Bianco, *Chem. Commun*. **47** (2011) 8955–8957.
90. M. Grillaud, J. Russier, A. Bianco, *J. Am. Chem. Soc*. **136** (2014) 810–819.
91. Malvern technical note: Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes, MRK656-01.
92. R. Pecora, *Dynamic light scattering: Applications of Photon Crrelation Spectroscopy*, Plenum Press New York and London, 1985, 97 str. 7-15;.
93. B. J. Kirby, E. F. Hasselbrink, *Electrophoresis* **25** (2004) 187–202.
94. R. J. Hunter, *Zeta potencial in colloid science: Principles and Applications*, Alden Press, Great Britain, 1988.
95. L. A. Selvidge, M. R. Eftink, *Anal. Biochem*. **154** (1986) 400-408.
96. K. Sadrerafi, E. E. Moore, M. W. Lee Jr., *J. Incl Phenom Macrocyl Chem*. **83** (2015) 159-166.
97. N. L. Thompson *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 1, Springer US, 1991. str. 337-378.
98. O. Krichevsky, G. Bonnet, *Rep. Prog. Phys.* **65** (2002) 251–297.
99. A. M. Melo, M. Prieto, A. Countinho, *Biochim. Biophys. Acta* **1808** (2011) 2559-2568.
100. J. Ries, P. Schwille, *Bioessays* **34** (2012) 361-368.
101. J. Korlach, P. Schwille, W. W. Webb, G. W. Feigenson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** (1999) 8461–8466.
102. Q. Zhang, L. Su, J. Collins, G. Chen, R. Wallis, D. A. Mitchell, D. M. Haddletou i C. Remzi Becer, *J. Am. Chem. Soc* **11** (2014) 4325-4332.
103. K. Kobayashi, K. Kajikawa, H. Sasabe W. Knoll, *Thin Solid Film* **349** (1999) 244-249.
104. P. Falvey, C. W. Lin, R. Darcy, T. Revermann, U. Karst, M. Giesbers, A. T. M. Marcelis, A. Lazar, A. W. Coleman, D. N. Reinhoudt, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **11** (2005) 1171-1180.

105. A. Mazzaglia, R. Donohue, B. J. Ravoo, R. Darcy, *Eur. J. Org. Chem*. **2001** (2001) 1715-1721.
106. K. Taguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 2705-2709.
107. G. Radis Baptista, *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology-From Analytical Procedures to Biomedical Applications*; Chapter 19, InTech, 2013.
108. J. Voskuhl, M. C. Stuart, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **16** (2010), 2790-2796.
109. S. B. Kulkarni, G. V. Betageri, M. Singh, *J. Microencapsul.* **12** (1995) 229-246.
110. J. Voskuhl, T. Fenske, M. C. Stuart, B. Wibbeling, C. Schmuck, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **16** (2010) 8300-8306.
111. W. Al-Soufi, B. Reija, M. Novo, S. Felekyan, R. Kühnemuth, C. A. Seidel, *J Am Chem Soc*. **127** (2005) 8775-8784.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Matea Tokić

Datum rođenja: 8. 12. 1993.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2000. – 2008.	Osnovna škola [II. osnovna škola, Vrbovec]
2008. – 2012.	Srednja škola [Srednja škola Vrbovec, Vrbovec]
2012. – 2015.	Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer na Kemijskom odsjeku, područje: Biokemija i Organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
rujan 2015.	Prvostupnik kemije na Pridrodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu
2015. – 2017.	Diplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer na Kemijskom odsjeku, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,

Postignuća

2015-2017	Demonstrator iz Općeg organskog praktikuma I i II, Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

travnja 2017.	10. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno−matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
travnja 2016.	9. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno−matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
travnja 2015.	8. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno−matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
travnja 2014.	7. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno−matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu