

Priprava i karakterizacija nanokompozitnog hidrogela temeljenog na samoorganizaciji peptida i poli(vinil-alkohola) za biomedicinsku primjenu

Moharić, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:315865>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

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



zir.nsk.hr



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Josip Moharić

**Priprava i karakterizacija nanokompozitnog hidrogela temeljenog
na samoorganizaciji peptida i poli(vinil-alkohola) za biomedicinsku
primjenu**

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Josip Moharić

**Priprava i karakterizacija nanokompozitnog hidrogela temeljenog
na samoorganizaciji peptida i poli(vinil-alkohola) za biomedicinsku
primjenu**

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
Drug research and development

Josip Moharić

**Preparation and characterization of the nanocomposite hydrogel
based on self-assembly of peptides and poly(vinyl alcohol) for
biomedical applications**

Graduate thesis

Rijeka, 2020

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za supramolekulsku kemiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu te u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu. Izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost (HrZZ) IP-2018-01-6910 pod nazivom „Sinteza supramolekulskih samo-udruženih nanostrukture za izgradnju naprednih funkcionalnih materijala (SUPeRNANO).“

Mentor rada: Prof. dr. sc. Leo Frkanec, redoviti profesor

Komentor rada: Izv.prof. dr. sc. Ruža Frkanec, znanstveni savjetnik

Diplomski rad obranjen je dana _____ pred povjerenstvom:

1. dr.sc. Karlo Wittine, izvanredni profesor
2. dr.sc. Mirela Sedić, izvanredni profesor
3. prof. dr. sc. Leo Frkanec, znanstveni savjetnik IRB, redoviti profesor

Rad ima 73 stranica, 40 slika, 13 tablica i 50 literaturna navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Leu Frkancu na izboru teme, stručnoj pomoći, savjetima i prenesenom znanju prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se komentorici izv. prof. dr. sc. Ruži Frkanec na prenesenom znanju, svim savjetima te strpljenju i pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Tomislavu Portadi na korisnim savjetima, prijedlozima te na ustupljenim spojevima.

Doktorandici Niki Gazdek hvala na moralnoj podršci i ugodnom društvu.

Viktoru Škorjancu hvala na ustupljenim spojevima.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Instituta Ruđer Bošković i Centra za istraživanja i prijenos znanja u biotehnologiji koji su mi na bilo koji način pomogli tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim profesorima na prenesenom znanju i pomoći prilikom studiranja.

Veliko hvala svim mojim prijateljima i kolegama 4M zbog kojih ću uvijek pamtiti svoje studentske dane. Veliko hvala i Bobani za svu pomoć prilikom studiranja.

Veliko hvala Ilijani na svojoj ljubavi, strpljenju i razumijevanju tijekom ovih godina. Hvala ti na svakoj pomoći i savjetu.

Veliko hvala mojoj obitelji na neizmjerljivoj podršci, ljubavi, odricanjima i razumijevanju tijekom svih godina studiranja.

SAŽETAK

Supramolekulski samoorganizirajući funkcionalni materijali posjeduju specifična fizikalna i biološka svojstva koja se u nekim slučajevima mogu kontrolirati vanjskim podražajima (temperatura, pH, UV-zračenje). Prepoznati su kao izvrsna platforma za primjenu u raznim područjima, uključujući razvoj senzora, biomaterijala te tkivnog inženjerstva i sustava za dostavu lijekova. Hidro- i organo-gelovi su biokompatibilni, biorazgradivi i netoksični materijali pogodni za primjenu u biomedicini. Kombinacijom supramolekulskih organizacija s različitim anorganskim ili organskim spojevima nastaju nanokompozitni materijali koji imaju poboljšana fizikalna i biološka svojstva. Samoorganizacije organskih molekula male molekulske mase temeljenih na malim peptidima dobro su opisane u literaturi te je pokazana njihova biokompatibilnost. U okviru ovog diplomskog rada, sintetizirani su tripeptidni hidrogelatori Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂, Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe i 4-pikolilamidni derivati L-fenilalanin·HCl i D-fenilglicin·HCl. Navedenim gelatorima ispitana su gelirajuća svojstva te je također ispitivano njihovo geliranje dodatkom polimera poli(etilen-glikola) (PEG) i poli(vinil-alkohola) (PVA). Svojstva najboljeg geliranja pokazao je 4-pikolilamidni derivat D-fenilglicina·HCl uz dodatak PVA. Provedeno je preliminarno testiranje kinetike otpuštanja doksorubicina (DOX) iz gela s dodatkom PVA i bez PVA. Rezultati su pokazali da iako PVA utječe na geliranje 4-pikolilamidnog derivata D-fenilglicina·HCl, ubrzava ga i smanjuje kritičnu koncentraciju gelatora, doksorubicin se brže otpušta iz gela koji sadržava PVA.

KLJUČNE RIJEČI: peptidni hidrogel, dostava lijekova, DOX, PVA, PEG, supramolekulski nanokompozitni gel

SUMMARY

Supramolecular self-organizing functional materials possess specific physical and biological properties that can in some cases be controlled by external stimuli (temperature, pH, UV radiation). They are recognized as an excellent platform for application in various fields, including sensor development, biomaterials, tissue engineering and drug delivery systems. Hydro- and organogels are biocompatible, biodegradable and non-toxic materials that are suitable for biomedical use. Combining supramolecular organizations with various inorganic or organic compounds, nanocomposite materials with improved physical and biological properties are formed. Self-organizations of low molecular weight organic molecules (LMWG) based on small peptides are well described in the literature and their biocompatibility has already been shown. In the framework of this thesis, tripeptide hydrogelators Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂, Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe and 4-picolylamide derivatives of L-phenylalanine·HCl and D-phenylglycine·HCl were synthesized. These gels were tested for their gelling properties before and after the addition of polymers of poly (ethylene glycol) (PEG) and poly (vinyl alcohol) (PVA). 4-Picolylamide derivative of D-phenylglycine·HCl with the addition of PVA showed the best gelling properties. Preliminary testing of the release of doxorubicin (DOX) from the gel with the addition of PVA and without PVA has been tested. The results indicate that PVA affects the gelling of 4-picolylamide derivative of D-phenylglycine·HCl, accelerating it and reducing the critical concentration of the gelator while doxorubicin is released more rapidly from the gel containing PVA.

KEY WORDS: peptide hydrogel, drug delivery, DOX, PVA, PEG, supramolecular nanocomposite gel

POPIS SIMBOLA I KRATICA

AFM – mikroskopija atomskih sila (eng. atomic force microscopy)

CDCl_3 - kloroform

CGC – kritična koncentracija geliranja (eng. critical gel concentration)

DMSO – dimetil-sulfoksid

DOX - doksorubicin (eng. doxorubicin)

EISA – enzimom kontrolirane samoorganizacije (eng. enzyme-linked immunosorbent assay)

EPR – pojačani učinak propusnosti i zadržavanja (eng. enhanced permeability and retention effect)

IR - infracrvena spektroskopija (eng. infrared spectroscopy)

LMWG - molekule gelatora male molekulske mase (eng. low molecular weight gelator)

MDR – višestruka otpornost na lijekove (eng. multi drug resistance)

MeOH – metanol (eng. methanol)

NMR - nuklearna magnetska rezonancija (eng. nuclear magnetic resonance)

PEG – poli(etilen-glikol)

PVA - poli(vinil-alkohol)

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. scanning electron microscopy)

TEM - transmisijaska elektronska mikroskopija (eng. transmission electron microscopy)

TLC - tankoslojna kromatografija (eng. thin layer chromatography)

UV-Vis - ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (eng. ultraviolet-visible spectroscopy)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Supramolekulski biofunktionalni materijali.....	2
1.2. Hidrogelovi.....	3
1.3. Nanokompozitni supramolekulski gelovi s dodatkom polimera.....	8
1.4. Supramolekulske interakcije u hidrogelovima.....	11
1.5. Supramolekulski sustavi za dostavu lijekova.....	14
2. CILJ RADA.....	18
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Uvodne napomene.....	20
3.2. Sinteze tripeptidnih hidrogelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH ₂ (G1), Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (G2).....	21
3.2.1. Sinteza Ala-OMe x HCl.....	21
3.2.2. Sinteza Boc-L-Phe-L-Ala-OMe.....	22
3.2.3. Skidanje Boc-zaštite sa Boc-Phe-Ala-OMe (H ₂ N-Phe-Ala-OMe).....	23
3.2.4. Sinteza Boc-Phe-Phe-Ala-OMe.....	24
3.2.5. Skidanje Boc-zaštite sa Boc-Phe-Phe-Ala-OMe (H ₂ N-Phe-Phe-Ala-OMe).....	25
3.2.6. Acetiliranje H ₂ N-Phe-Phe-Ala-OMe (Ac-Phe-Phe-Ala-OMe).....	26
3.2.7. Aminiranje Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (Ac-Phe-Phe-Ala-NH ₂).....	27
3.3. Ispitivanje gelirajućih svojstava peptidnih hidrogelatora.....	28
3.3.1. Ispitivanje kritične koncentracije gelatora (CGC).....	28
3.3.2. Ispitivanje učinka polimera PVA i PEG na formiranje gela.....	28
3.3.3. Ispitivanje učinka vrijednosti pH na formiranje gela.....	29
3.3.4. Ispitivanje kinetike otpuštanja DOX iz gela.....	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. Sinteza tripeptidnih gelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH ₂ (G1) i Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (G2).....	30
4.1.1. Učinak polimera na gelirajuća svojstva hidrogelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH ₂ (G1).....	33
4.1.2. Učinak polimera na gelirajuća svojstva hidrogelatora Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (G2).....	35
4.2. Gelirajuća svojstva hidrogelatora 4-pikolilamidnog derivata L-fenilalanina·HCl (G3) i 4-pikolilamidnog derivata D-fenilglicina·HCl (G4).....	37
4.2.1. Gelirajuća svojstva hidrogelatora 4-pikolilamidnog derivata L-fenilalanina·HCl (G3).....	37
4.2.2. Gelirajuća svojstva hidrogelatora 4-pikolilamidnog derivata D-fenilglicina·HCl (G4).....	41
4.2.3. Morfološka analiza hidrogelova transmisijom elektronskom mikroskopijom.....	44
4.2.4. Kinetika otpuštanja doksorubicina iz gela.....	48
5. RASPRAVA.....	53
5.1. Analiza i usporedba gelirajućih svojstava tripeptidnih hidrogelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH ₂ , G1 i Ac-Phe-Phe-Ala-OMe, G2.....	53

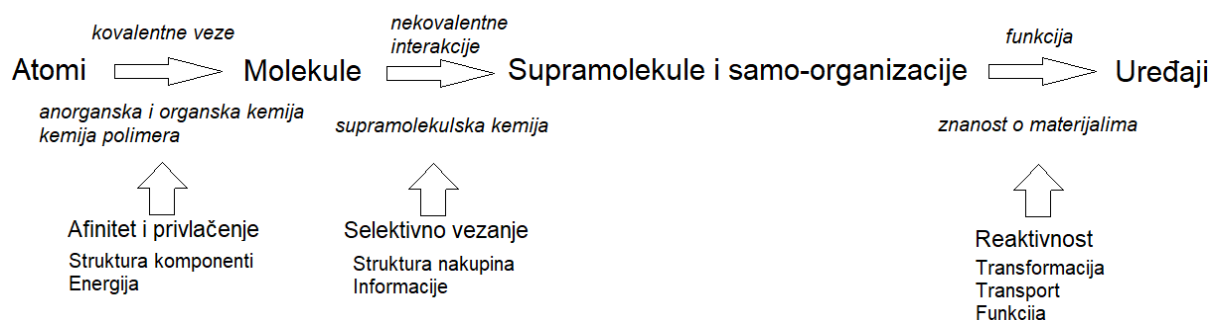
5.2. Ispitivanje utjecaja PVA na gelirajuća svojstva hidrogelatora 4-pikolilamidnog derivata L-fenilalanina·HCl (G3) i 4-pikolilamidnog derivata D-fenilglicina·HCl (G4).....	55
6. ZAKLJUČAK.....	59
7. LITERATURA	60
8. PRILOG – Spektri ^1H NMR spojeva	65
9. ŽIVOTOPIS.....	69

1. UVOD

Supramolekulska kemija je kemija međumolekulskih veza koja obuhvaća strukture i uloge entiteta (odnosno molekulskih nakupina) dobivenih udruživanjem dviju ili više kemijskih vrsta (1). Tako je supramolekulsku kemiju definirao Jean-Marie Lehn koji je 1987. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju zajedno s Donaldom J. Cramom i Charlesom J. Pedersenom za rad i proučavanje molekula sa strukturno specifičnim interakcijama velike selektivnosti (2). Principi supramolekulske kemije uključuju molekulsko prepoznavanje i samoudruživanje (eng. self-assembly) koji se primjenjuju u sintezi novih supramolekulskih sustava (2).

Dva ili više spoja stupaju u međusobnu interakciju kroz različite međumolekulske veze čime nastaju velike molekulske nakupine ili tzv. „supermolekule“ (Slika 1). Primjeri supramolekularnih sustava uključuju mnoge biološke sustave, kao što su kompleksi enzima sa specifičnim supstratima i molekula DNA. Molekula DNA svoju strukturu dvostruke zavojnice ima upravo zbog intermolekulskih i intramolekulskih vodikovih veza. Jedan od najvažnijih primjera molekulskog samoudruživanja je i stanična membrana, građena od organiziranih molekula fosfolipida, glikolipida te brojnih proteina i glikoproteina. Osim kemije i biokemije, supramolekulska kemija kao multidisciplinarno područje obuhvaća i molekularnu biologiju te u posljednje vrijeme sve više biomedicinu i nanotehnologiju. Međumolekulske interakcije uglavnom uključuju elektrostatske interakcije (ion-ion, ion-dipol, dipol-dipol), vodikove veze, π - π interakcije, van der Waalsove interakcije i hidrofobne veze, a ovisе o strukturi molekula koje se povezuju u supramolekulske strukture. istraživanja ovog područja uključuju molekularnu nanotehnologiju, tkivno inženjerstvo, molekularne senzore, nanoreaktore, kemijsku katalizu, regenerativnu medicinu i sustave za dostavu lijekova (2).

Interdisciplinarna priroda supramolekulske kemije



Slika 1. Shematski prikaz hijerarhije međumolekulskih interakcija

U ovom radu priredit će se i ispitati svojstva nanokompozitnih materijala temeljenih na tripeptidnim hidrogelatorima Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂, Ac-Phe-Phe-Ala-OMe i 4-pikolilamidni derivati L-fenilalanina·HCl i D-fenilglicina·HCl uz dodatak poli(vinil-alkohola) (PVA) i poli(etilen-glikola) (PEG) koji imaju poboljšana fizikalna i biološka svojstva. Isto tako, iz nanokompozitnog materijala koji će imati najbolja svojstva, ispitat će se otpuštanje lijeka doksorubicina kako bi se procijenile mogućnosti primjene materijala kao sustava za dostavu lijekova.

1.1. Supramolekulski biofunkcionalni materijali

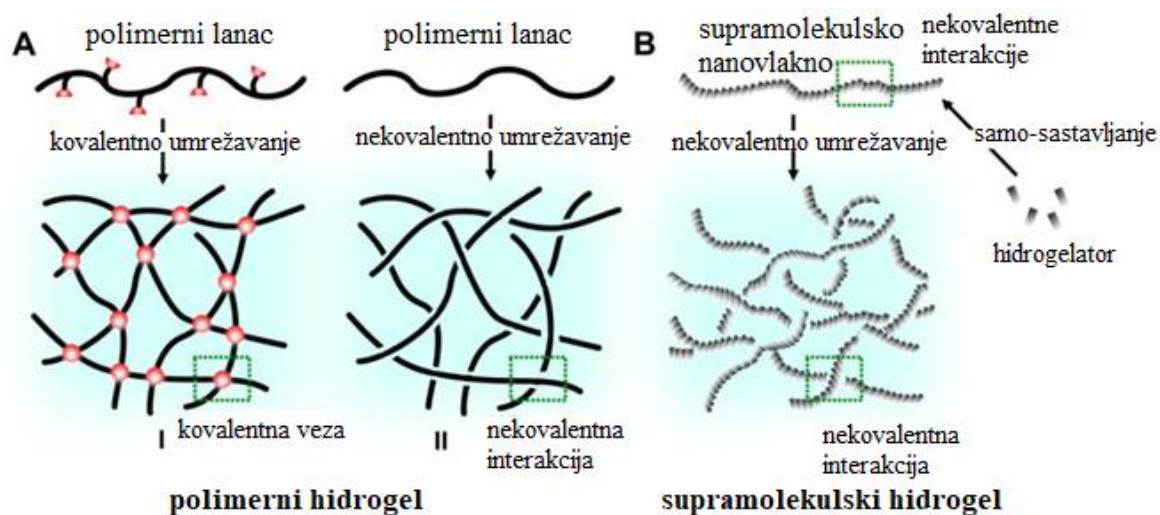
Od svog nastanka pa sve do danas supramolekulska kemija dokazala se izuzetno korisnom u razvoju novih materijala, katalizatora i nanočestica te isto tako i u samom razvoju novih lijekova i sustava za njihovu dostavu (3). Posebnu ulogu u području supramolekulske kemije imaju polimerni biomaterijali (4). Biomaterijali se mogu definirati kao materijali pripremljeni za izradu proizvoda, implantata ili drugih pomoćnih sredstava, koji mogu biti primijenjeni u živim organizmima i čovjeku. Početna i jedna od najvažnijih karakteristika je njihova biokompatibilnost. (3). Razvoj biomaterijala započeo je iz drvenih proteza prije nekoliko tisuća godina te se kretao kroz razvoj metala, keramike i polimera koji se koriste za povećanje, popravak ili zamjenu bolesnog i oštećenog tkiva (3). Premda su

biomaterijali nekad igrali važnu ulogu kao materijali plastične kirurgije i materijali zamjene ortopedskih zglobova, njihova upotreba danas, u sklopu nove klase biomaterijala, izraženija je u polju regenerativne medicine (3). Novu klasu prilagodljivih modularnih biomaterijala čine polimerni lanci umreženi supramolekulskim, usmjerenim i reverzibilnim nekovalentnim interakcijama (4). Prilikom sinteze odgovarajućeg biomaterijala posebnu pažnju potrebno je obratiti na izbor kemijske jedinice koja se koristi u umrežavanju, o čemu u konačnici ovise termodinamički i kinetički parametri asocijacije, odnosno povezanost i dinamika sustava (3). Navedeni parametri, kao i sama polimerna struktura, mogu se dizajnirati tako da kontrolirano odgovaraju na poticaje iz okruženja te da imaju određenu viskoelastičnost (3). Imajući u vidu ova svojstva razvijaju se napredni biomaterijali s poboljšanim mehaničkim svojstvima, samo-popravljanjem i produženim otpuštanjem. Biomaterijali za dostavu lijekova moraju se moći lako aplicirati, metabolizirati i biti sposobni za kontrolirano otpuštanje lijekova kroz duže vremensko razdoblje (3). Potrebni su materijali koji pokazuju kemijske i fizikalne karakteristike na biološki prihvatljiv način (2). Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća, upravo su supramolekulski hidrogelovi prepoznati kao materijali koji bi mogli zadovoljiti navedene uvjete (3).

1.2. Hidrogelovi

Premda su hidrogelovi otkriveni početkom 19. stoljeća, supramolekulska priroda ovih materijala bila je slabo poznata te su oni u velikoj mjeri bili zanemareni sve do kraja 20. stoljeća. Otkrića gelatorskih spojeva događala su se najčešće slučajno, obično iz neuspjelih pokušaja kristalizacije. Svojstva geliranja posjeduju molekule različitih kemijskih struktura - od najjednostavnijih alkana pa do kompleksnih ftalocijanina. Fokus istraživanja gelatora je na sintezi gelova s točno određenim svojstvima. Istraživanje se provodi tako da se u molekule ugrade točno određeni strukturni elementi. Uobičajena priprava hidrogelova je grijanjem gelatora u pripadajućem

otapalu i hlađenje te izotropne otopine na sobnu temperaturu. Proces geliranja uključuje samoorganizacije molekula gelatora, kako bi se formirala duga vlakna koja se umreže formirajući gelsku mrežu koja zarobljava otapalo, slika 2 (5).



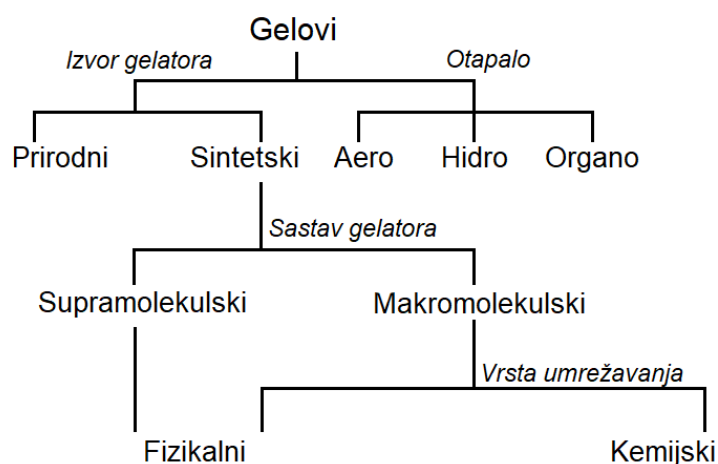
Slika 2. Shematski prikaz (A) kovalentnog umrežavanja funkcionalnog polimernog lanca/prekursora i nastajanje kovalentnog polimernog hidrogela (tip I) i nekovalentnog umrežavanja funkcionalnog polimernog lanca/prekursora i nastajanje polimernog hidrogela (tip II) i (B) nastajanje supramolekulskih nanovlakana preko nekovalentnih interakcija i samoudruživanja malih molekula, koje se dalje umrežavaju i formiraju supramolekulsku hidrogelsku mrežu.

Proces sprječava otjecanje otapala zbog gravitacijske sile te molekule otapala i gelatora ostaju čvrsto vezane. Struktura matriksa je heterogena te se kao rezultat samoorganizacije mogu naći superstrukture reda veličine od nanometara pa sve do mikrometara. Ovisno o veličini vlakna u gelu, može se govoriti o kvaliteti gela. Struktura i morfologija supramolekulskih gelova istražuje se konvencionalnim tehnikama poput TEM, SEM i AFM (5).

Hidrogelovi se definiraju kao fizikalno ili kemijski povezane trodimenzijske mreže hidrofilnih polimernih lanaca. Zbog svoje hidrofilne strukture,

hidrogelovi su sposobni održavati veliku količinu vode u sebi preko kapilarnih sila i površinske napetosti (6). Velik sadržaj vode zajedno s elastičnim karakteristikama gela omogućuju hidrogelovima bolje oponašanje ljudskog tkiva nego bilo koje druge klase sintetičkih biomaterijala. Slijedom toga, hidrogelovi imaju širok raspon primjene, posebno u dostavi lijekova i u tkivnom inženjerstvu (3). Važnije karakteristike hidrogelova uključuju dobru biokompatibilnost, veliku permeabilnost za lijekove topljive u vodi, podesiva biomimetička mehanička svojstva, predvidljive brzine degradacije te osjetljivost na različite podražaje. Hidrogelovi mogu biti pripremljeni od prirodnih ili sintetskih polimera, a prema vrsti umrežavanja koje stvaraju, mogu biti okarakterizirani kao kemijski ili fizikalni gelovi (7).

Gelovi se mogu klasificirati na različite načine, ovisno o svom podrijetlu, sastavu, vrsti umrežavanja koje stvaraju te medij koji obuhvaćaju (Slika 3.) (8).

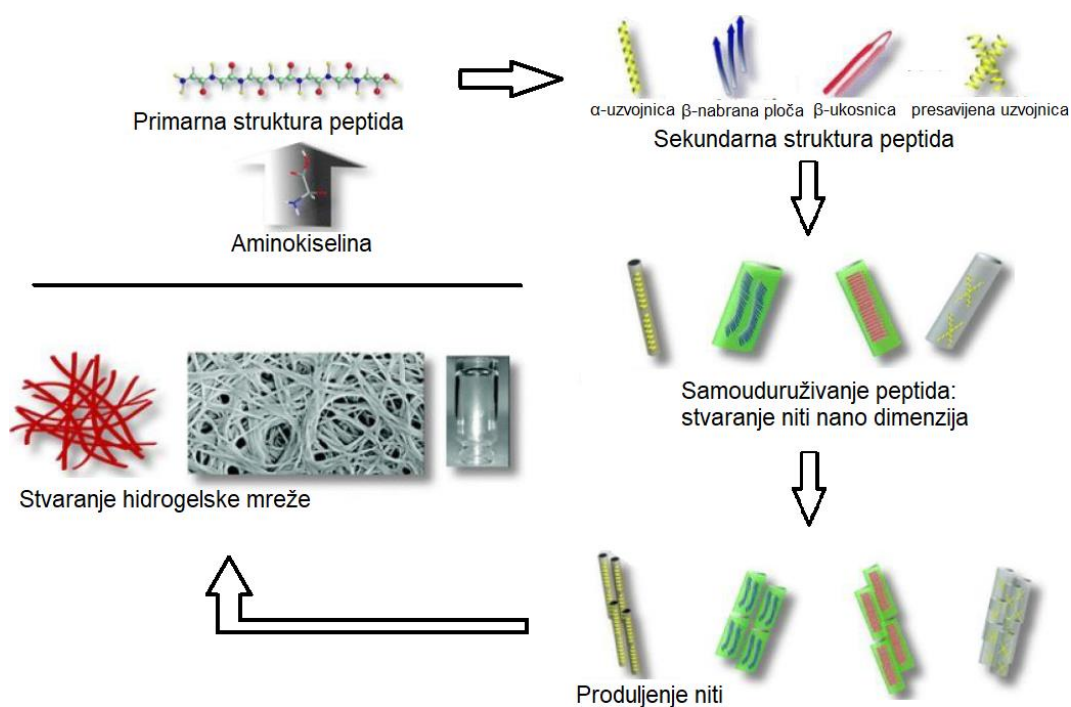


Slika 3. Dijagram klasifikacije gelova

Kemijski umreženi hidrogelovi opisani su kao polimerni lanci međusobno povezani trajnim nereverzibilnim vezama. Kemijsko umrežavanje korisno je iz razloga što se vrlo jednostavno može podesiti za mijenjanje mehaničkih svojstava završnog materijala te se uobičajeno koristi kad su potrebni čvrsti

i stabilni hidrogelovi. Zbog kovalentne prirode njihova umrežavanja, kemijski hidrogelovi su često krhki, netransparentni te nisu samopopravljivi nakon razbijanja gela. S druge strane, fizikalni gelovi oslanjaju se na stvaranje prolaznih mreža između polimernih lanaca. Njihovo geliranje pokreće molekulsko samo-udruživanje te zbog toga fizikalno geliranje izbjegava štetne posljedice kemijskog umrežavanja (primjerice krhkost, naticanje), po cijenu mehanički slabijeg sustava. Isto tako, fizikalno umrežavanje može bolje kontrolirati viskoelastičnost. Zbog modularnosti mreža, lakog mehanizma geliranja, korisnih mehaničkih svojstava i izvanrednih sposobnosti repliciranja biološke viskoelastičnosti, supramolekulski polimerni hidrogelovi sve se više koriste kao napredni biomaterijali za biomedicinsku primjenu (3).

Supramolekulski peptidni hidrogelovi, slika 4., nastali nekovalentnim umrežavanjem u vodenim otapalima, čine klasu materijala koji se mogu specifično razviti za dostavu lijekova i biomedicinsku primjenu. Biokompatibilnost, reaktivnost na vanjske podražaje i veliki kapacitet funkcionalizacije polimernih mreža čini hidrogelove dobrim kandidatima za dizajn novih naprednih oblika za ciljanu dostavu lijekova (9).

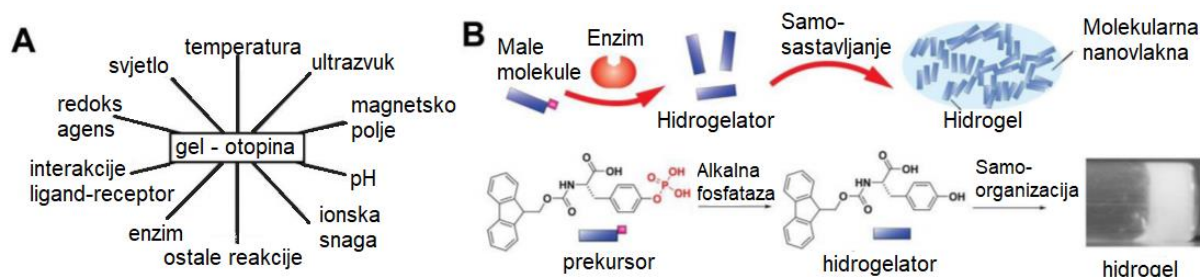


Slika 4. Shematski prikaz hijerarhijskog samoudruživanja peptida u hidrogel

Važna karakteristika nekih supramolekulskih hidrogelova je samo-popravljivost (10). Samo-popravljivi supramolekulski hidrogelovi imaju važne prednosti koje uključuju mimikriju nativnog tkiva i injektabilnost materijala. Samo-popravljenje gelova temelji se na tiksotropnim svojstvima nekih hidrogelatora (10). Već je dugo poznat fenomen ne-izotermne, reverzibilne gel-sol transformacije koja se naziva tiksotropija (11). Naziv je prvi put upotrijebio Peterfi 1927. godine, a potječe od grčkih riječi *thixis* što znači dodir, udar i riječi *trepo* što znači promjena. Prednost tiksotropnih supramolekulskih hidrogelova je mogućnost jednostavne aplikacije hidrogela putem injekcije. Hidrogel se jednostavnim miješanjem, primjenom mehaničke sile prevede u viskoznu tekućinu koju je moguće aplicirati injekcijom. Ovisno o svojstvima, tako aplicirana otopina može *in vivo* ponovo prijeći u stanje gela. Zahvaljujući tiksotropnim svojstvima hidrogelova, brojni vodotopljivi lijekovi mogu se jednostavno ugraditi u gel

na sobnoj temperaturi u visokom postotku ugrađivanja bez gubitka materijala i bez gubitka aktivnosti uslijed samog postupka ugrađivanja (11).

Proces gel-sol, odnosno transformacija gel-otopina, predstavlja kemijsku transformaciju sustava iz tekuće otopine (uglavnom koloidne suspenzije čestica) u želatinoznu mrežu, gelsku fazu, slika 5. (11).

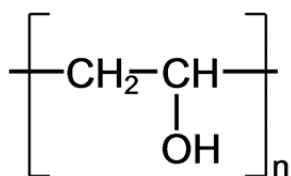


Slika 5. Transformacija gel-otopina ili otopina-gel postignuta različitim fizikalnim, kemijskim ili biološkim podražajima. (B) shematski prikaz enzimom-kontrolirane samo-organizacije (EISA) malih molekula i nastajanje supramolekulskog hidrogela.

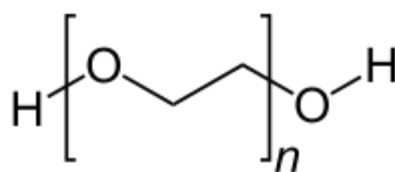
1.3. Nanokompozitni supramolekulski gelovi s dodatkom polimera

Polimeri su ugrađeni u mnoge anorganske ili organske sustave za poboljšanje određenih kemijskih ili fizikalnih svojstava ili za prevladavanje određenih ograničenja. Polimeri se između ostalog koriste za modificiranje kemijske funkcionalnosti (12), povećanje fotokatalitičke aktivnosti (13), poboljšanje mehaničkih (14) i toplinskih svojstava (15), modificiranje određenih fizikalnih parametara (npr. vodljivost, permitivnost) (16) ili za smanjenje citotoksičnosti anorganskih materijala (17). Biokompatibilni i ekološki prihvatljivi polimeri, primjerice, poli(etilen-glikol) (PEG), poli(vinil-alkohol) (PVA), polilaktid (PLA) i poliacetileni koriste se u biomedicini, u tkivnom inženjerstvu (18), regenerativnoj medicini, za razvoj sustava za dostavu lijekova te kao poveznica kojom je lijek vezan kovalentno za nosač (19).

Supramolekulski gelovi imaju brojne prednosti, no imaju problem s mehaničkom stabilnošću koja je ograničena. Slaba vanjska mehanička sila može narušiti slabe intermolekulske sile kao što su vodikove veze i π - π interakcije koje drže molekule na okupu. Polimeri su, nasuprot tome, mehanički stabilni jer sadržavaju monomerne jedinice povezane kovalentnim vezama. Kombinacijom mehanički stabilnih i otpornih polimera s termoreverzibilnim supramolekulskim sustavima koji odgovaraju na vanjske podražaje moguće je dobiti nove nanokompozitne materijale poboljšanih mehaničkih svojstava sa svim karakteristikama i prednostima supramolekulskih sustava. Poli(vinil-alkohol) (PVA) je polimer koji se sintetizira polimerizacijom monomera vinil-acetata, slika 6 (18).



a)



b)

Slika 6. Kemijska struktura a) poli(vinil-alkohola) i b) poli(etilen-glikola)

Ovaj monomer je polimeriziran u poli(vinil-acetat), a zatim je hidrolizom dobiven PVA. Biokompatibilnost PVA čini ga izvrsnim materijalom za upotrebu u biomedicini. PVA se koristi za dugotrajne implantate, uključujući umjetnu gušteraču i umjetnu hrskavicu (20). PVA je dostupan s različitim postotkom polimerizacije i molekulskim masama i kao takav može se koristiti u različite svrhe. PVA se istražuje kao potencijalni sustav za ciljanu dostavu lijekova (21). Konjugati lijek-polimer kandidati su za ciljanu dostavu lijekova u tumorsko tkivo (20). U prethodnim studijama, utvrđeno je da povećanje topljivosti polimera u vodi pomaže stabilizaciji fibrila i generira općenito stabilnije hidrogelske sustave (22). Inkorporacija PEG u hidrogelske tripeptidne sustave ne samo da stabilizira hidrogelske sustave,

već i poboljšava mehanička i tiksotropna svojstva hibridnih hidrogelova (23). Kombiniranjem polimera sa supramolekulskim gelom stvara se novi poboljšani sustav s odličnom mehaničkom stabilnošću koji zadržava karakteristike i prednosti supramolekulskog gela. Polimeri mogu stupiti u interakciju sa sustavom direktnim interakcijama s nitima, fibrilima hidrogela adsorpcijom polimera ili indirektnim interakcijama mijenjajući viskozitet otopine (24).

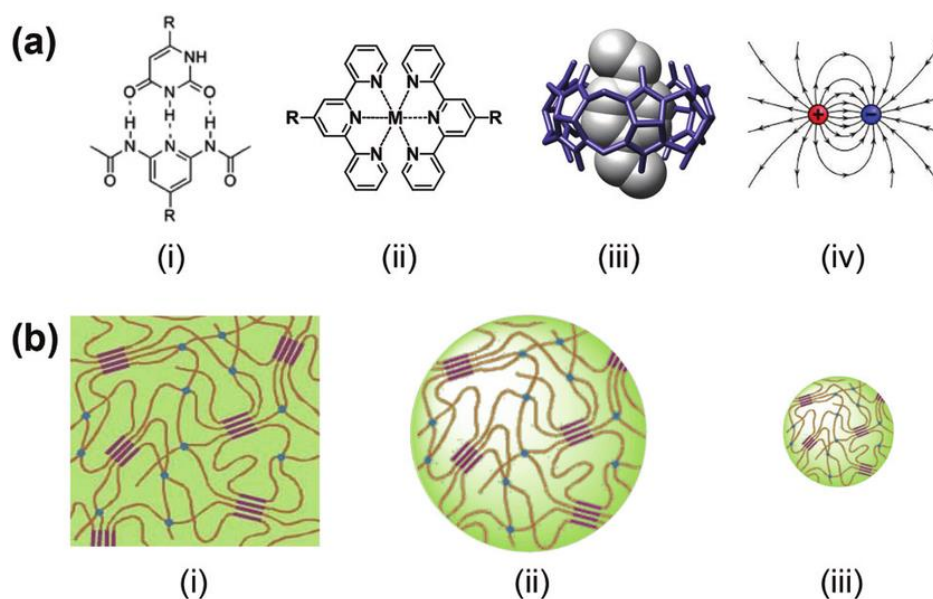
Dodatak polimera često pokazuje svojstva učvršćivanja gela. U radu Hanabuse 1999. i suradnika opisano je kako dodatak poli(N-vinilpirolidona) ili PEG-a u derivat benzen dikarbonila koji sadržava L-valin u 1-propanolu poboljšava čvrstoću dobivenog gela. Liu i suradnici pokazali su kako kopolimer poli(etilen-vinil-acetat) (PEVA) može inducirati dramatičnu promjenu u izgledu nanostruktura gelova. Slična opažanja uočili su Nandi i suradnici u gelovima folne kiseline i kitosana. Prije dodatka polimera, gelatorski sustav stvarao je neprozirne gelove s iglastom strukturom. Nakon dodatka polimera, gelovi su postali transparentni te su se fibrili međusobno umrežili. (23-28).

Dodatak polimera nerijetko pokazuje i suprotna svojstva te on može i sprječavati supramolekulsko samoudruživanje u gel. Adams i suradnici pokazali su kako dodatak dekstrana u pH-ovisni hidrogel naftalenskog dipeptida mijenja viskozitet otopine što se povezuje s tanjim vlaknima i smanjenom mehaničkom stabilnošću (29). Mehaničke promjene koje su dovele do povećanja viskoziteta otopine uočene su nakon dodatka polimera. Molekule gelatora (LMWG) imaju smanjenu sposobnost difuzije što dovodi do manje mehaničke čvrstoće (30). Napravljena je i komparativna studija o dodatku drugih polimera poput PEG-a, poli(vinil pirolidona) i poli(akrilne kiseline) s gelatorima male molekulske mase (24). Iznenadujuće, u svim slučajevima sustav je pokazao svojstva smanjenje mehaničke čvrstoće (24). McNeil i suradnici pokazali su kako dodatak specifične poli(akrilne

kiseline) u piridinu formiran organogel dovodi do stvaranja tanjih vlakana s većom čvrstoćom gela i manjom CGC. Rezultat interakcije polimera s gelatorom nije jasan. Izbor gelatora i komplementarnog polimera važni su faktori u određivanju povećanja ili smanjenja mehaničke čvrstoće (24).

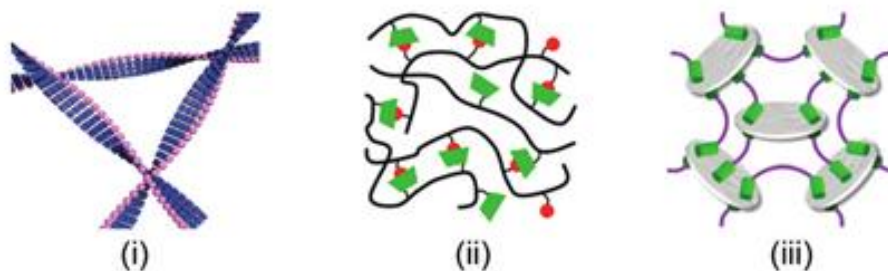
1.4. Supramolekulske interakcije u hidrogelovima

U posljednja dva desetljeća intenzivnog istraživanja postignut je značajan napredak u razumijevanju strukture i mehanizama nastajanja supramolekulskih hidrogelova kroz povezivanje molekula specifičnim, usmjerenim, nekovalentnim vezama, uključujući vodikove veze, koordinacije metal-ligand, interakcije domaćin-gost te ionske interakcije, shematski prikazano na slici 7 (31). Supramolekulski hidrogelovi s obzirom na građevne jedinice prikazani su na slici 8. Nekovalentne interakcije ostvaruju se s odgovarajućom konstantom ravnoteže (K_{eq}) i odgovarajućim konstantama asocijacije (k_a) i disocijacije (k_d). Termodinamički i kinetički parametri nude uvid u mehanizme vezanja te osiguravaju informacije za razuman izbor supramolekulskog sustava na kojem će se temeljiti novi biomaterijal koji se razvija. Termodinamička konstanta (K_{eq}) u vezi je sa stupnjem samoudruživanja u sustav. S druge strane, kinetički parametri (k_a i k_d) u vezi su s dinamikom vezivanja sustava. Pri dizajniranju supramolekulskog biomaterijala posebna pažnja mora se posvetiti na molekulske mase molekula, gustoće poprečnih veza te na koncentraciju samih molekula. Svojstva hidrogelova ovise o termodinamičkim i kinetičkim svojstvima samih molekula hidrogelatora (3).



Slika 7. (a) Shematski prikaz različitih tipova nekovalentnih interakcija pri nastajanju supramolekulskih hidrogelova (i) vodikove veze, (ii) kordinacija metal–ligand, (iii) prepoznavanje „host–guest“ i (iv) elektrostatske interakcije. (b) supramolekulski hidrogelovi s obzirom na veličinu: (i) makrohidrogel, (ii) mikrohidrogel i (iii) nanohidrogel (30).

Peptidi su najčešće upotrebljavane biološke građevne jedinice korištene za dizajn samoorganiziranih sintetskih materijala i posjeduju mnoge prednosti koje ih čine posebno atraktivnim za tu svrhu (32). Peptidi poprimaju specifične konfiguracije ovisno o razmještaju skupina na bočnim lancima. U dizajnu samoorganiziranih peptida može se manipulirati brojem, tipom i slijedom aminokiselina što kao posljedicu daje određen odnos između aminokiselinskog slijeda i strukture. Fizikalno-kemijska stabilnost i mogućnost sinteze na velikoj skali, čini peptide idealnim građevnim jedinicama za nove bioinspirirane supramolekulske materijale (33).



Slika 8. Supramolekulski hidrogelovi s obzirom na građevne jedinice: (i) molekulski hidrogelovi, (ii) supramolekulski polimerni hidrogelovi i (iii) supramolekulski hibridni hidrogelovi (32).

U biološkim sustavima, supramolekulske interakcije od najvećeg strukturnog značenja su vodikove veze. Vodikove veze su dinamične, usmjerene interakcije u kojima je atom vodika vezan za elektronegativniji atom kao što su atomi dušika, kisika ili fluora. Vodikove veze su odgovorne za određivanje i održavanje trodimenzijskih struktura bioloških makromolekula. Prekid samo jedne vodikove veze može izazvati promjenu u strukturi koja uzrokuje promjene u biološkoj aktivnosti makromolekule. Amidne veze u peptidima u velikoj mjeri pogoduju nastajanju vodikovih veza jer postoje i donori i akceptori vodikovih veza koje omogućavaju povezivanje molekula što je preduvjet za njihovu samoorganizaciju i hidrogelaciju. Uobičajena konformacija u supramolekulskim nano-vlaknima malih peptidnih hidrogelova je „ β -sheet” odnosno β -nabrana ploča. Pojedinačni par vodikove veze čini relativno slabe interakcije, međutim, zbog svoje specifičnosti i usmjerenosti, konstanta asocijacije uvelike se povećava zbog mnoštva vodikovih veza i multivalentnih interakcija. Konstanta ravnoteže interakcije vodikovih veza snažno ovisi o otapalu. Polarne molekule otapala, poput vode, natječu se za mjesta vezanja i ometaju sposobnost komplementarnih jedinica za udruživanje (primjerice gelator i PVA) (3).

1.5. Supramolekulski sustavi za dostavu lijekova

U razvoju novih sustava za dostavu lijekova, supramolekulski hidrogelovi pokazuju brojne prednosti, poput velikog udjela vode koju sadržavaju, za difuziju ugrađenih molekula, specifična mehanička svojstva koja su slična kao u ljudskim tkivima, jednostavnu biorazgradivost *in vivo* (34), mogućnost tvoriti hidrogel *in situ* u dodiru s tkivima, jednostavnu ugradnju funkcionalnih komponenata, mogu se koristiti za poboljšanje topljivosti lijeka u vodi i veću biorazpoloživost, mogu produžiti vrijeme cirkulacije lijeka, inducirajući preferencijalnu akumulaciju na mjestima tumora kroz pojačani učinak propusnosti i zadržavanja (EPR) te mogu smanjiti sistemske nuspojave terapijskih sredstava, lijekova (35). Postignut je značajan napredak u razvoju sustava za "pametnu" isporuku, gdje biomaterijali omogućavaju lijeku da prevlada određene biološke barijere (36). Istraživanje sustava za dostavu lijekova motivirano je poboljšanjem efikasnosti lijekova, nižim doziranjem (sukladno tome i nižom cijenom terapije) te povećanjem kvalitete života pacijenta, posebno kada je riječ o antitumorskim lijekovima (3). Produljeno otpuštanje lijekova i mogućnost aktivacije različitim vanjskim podražajima značajne su prednosti i karakteristike supramolekulskih hidrogelova u razvoju naprednih sustava isporuke lijeka (37). Injektabilnost omogućuje relativno jednostavnu administraciju materijala te se temelji na tiksotropnim svojstvima i popravljaju peptidnih hidrogelova. Brzo samopopravljanje smanjuje brzo otpuštanje lijeka tijekom pucanja gela, te omogućava kontrolirano otpuštanje lijeka koje ovisi o strukturi i ponašanju materijala. Zbog modularnosti supramolekulskog umrežavanja, postoji značajna fleksibilnost u odabiru komponenata koje mogu rezultirati istim završnim makroskopskim svojstvima, zadržavajući minimalnu toksičnost. Ova fleksibilnost omogućuje da materijali imaju module i viskoelastična svojstva koja su najviše kompatibilna s biološkim okruženjem. Stimulirano oslobađanje je svojstvo koje posjeduju supramolekulski sustavi kojima je

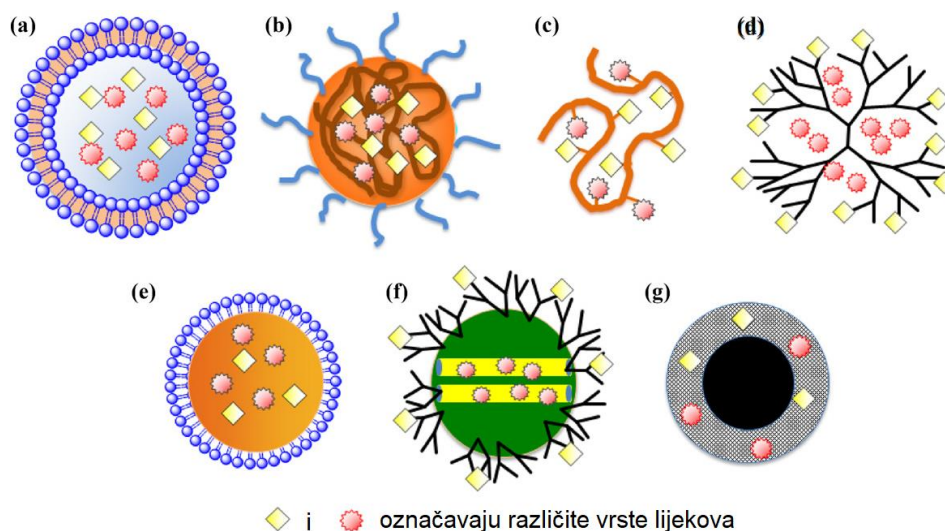
moгуće pomoću promjene pH, temperature, ionske jakosti ili nekog drugog vanjskog podražaja utjecati na oslobađanja lijekova (3).

Opisani su brojni primjeri sustava za dostavu lijekova u terapiji karcinoma i drugih poremećaja koji se temelje sa supramolekulskim hidrogelovima, tablica 1. Posebno su razvijeni peptidni hidrogelovi koji su osjetljivi na promjenu pH okoline i pokazano je da efikasno mogu dostaviti lijek u tumorsko tkivo koje ima niži pH od zdravog tkiva (38). Kationski supramolekulski hidrogelovi imaju sposobnost kondenzacije i prijenosa nukleinske kiseline u specifične stanice ili tkiva tumora, te mogu poslužiti kao potencijalni nevirusni vektori za gensku terapiju *in vitro* ili *in vivo* (39).

Tablica 1. Lijekovi na bazi hidrogela odobreni od strane FDA ili u kliničkom razvoju (40).

Komercijalni naziv	Lijek	Regulatorni status	Upotreba
Eligard	Leuprolid-acetat	Odobren od strane FDA	Karcinom prostate
Lupron depot	Leuprolid-acetat	Odobren od strane FDA	Uznapredovali karcinom prostate
Sandostatin	Oktreotid-acetat	Odobren od strane FDA	Akromegalija
Cervidil	Dinoproston	Odobren od strane FDA	Liječenje cerviksa
Timoptic-XE	Timolol maleat	Odobren od strane FDA	Glaukom
POSIDUR	Bupivacain	Klinička faza III	Postoperativna bol
Oncogel	Paklitaksel	Klinička faza II	Antitumorska terapija
Relday	Risperidon	Predklinička faza	Šizofrenija i bipolarni poremećaj

Doksorubicin (DOX) je antitumorski lijek koji se koristi u kemoterapiji različitih tumora i nalazi se na popisu esencijalnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije (32, 33). Unatoč svojoj efikasnosti, lijek je izuzetno toksičan i ima brojne nuspojave; poput nepovratne kardiotoksičnosti i reverzibilne nefrotoksičnosti zbog čega je njegova primjena ograničena. DOX je uobičajena terapija prve linije za brojne vrste karcinoma, uključujući karcinom dojke, jajnika, mjehura i pluća. Iako se mehanizam djelovanja DOX još uvijek proučava, predloženi mehanizmi uključuju interkalaciju u DNA čime se stvara disrupcija genetske ekspresije, stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i inhibiciju topoizomerase II – giraze važne za sintezu i replikaciju DNA (41). Nanotehnologija može značajno pridonijeti razvoju antitumorskih lijekova s unaprijeđenom terapijskom i komercijalnom vrijednošću slika 9. Uklapanjem antitumorskih lijekova u odgovarajuće terapijske nanosustave mogu se optimizirati biofarmaceutska i farmakokinetička svojstva lijeka, a time povećati djelotvornosti i/ili sigurnost. Jedna od prednosti antitumorskih nanoformulacija nad konvencionalnim liječenjem je i mogućnost prevladavanja višestruke rezistencije odnosno otpornosti na antitumorske lijekove (MDR) (34).



Slika 9. Shematski prikaz nosača lijekova nano dimenzija koji se koriste za kombiniranu dostavu lijekova: (a) liposom, (b) polimerna micela,

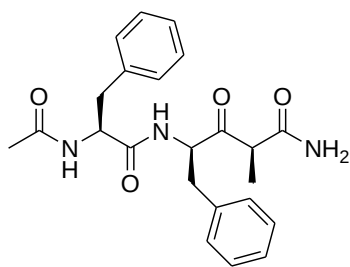
(c) konjugat polimer-lijek, (d) dendrimer, (e) nanoemulzija ulja, (f) nanočestica mezoporoznog silicijevog dioksida i (g) nanočestica željezovog oksida (42).

Lijek Doxil® je prvi odobren antitumorski nanofarmaceutik gdje su molekule doksorubicina uklopljene u liposome s ciljem smanjenja brze eliminacije lijeka iz cirkulacije kao i zaštite zdravog tkiva od toksičnih nuspojava koje lijek uzrokuje. Pripravak je pokazao produljeno vrijeme zadržavanja u sistemske cirkulaciji ($t_{1/2}$ = 3-4 dana) što se smatra preduvjetom za postizanje značajne pasivne akumulacije na mjestu tumora. Stoga, liposomi održavaju razinu DOX u krvi dulje vrijeme kako bi veća koncentracija lijeka dospjela do stanica tumora, istodobno ograničavajući ulazak lijeka u srčani mišić čime se smanjuje pojava najčešće i potencijalno najopasnije nuspojave (43).

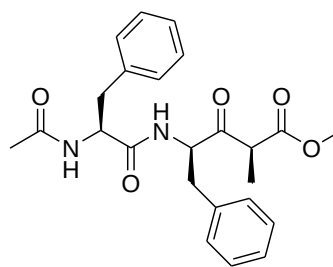
2. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada bio je prirediti nanokompozitne supramolekulske sustave temeljene na tripeptidnim hidrogelatorima Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (**G1**), Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (**G2**), 4-pikolilamidni derivat L-fenilalanina·HCl (**G3**) i 4-pikolilamidni derivat D-fenilglicina·HCl (**G4**) prikazanih na slici 10., uz dodatak polimera, poli(vinil-alkohola) i poli(etilen-glikola) koji će imati poboljšana mehanička svojstva. Priređeni supramolekulski sustavi karakterizirat će se klasičnim kemijskim metodama, dok će se preliminarna morfološka ispitivanja provesti elektronskom mikroskopijom.

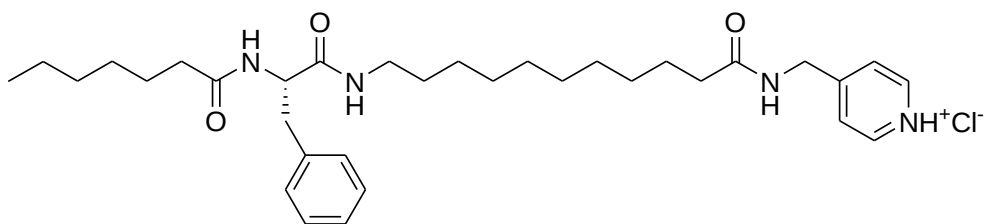
Cilj je, također, evaluirati priređene nanokompozitne materijale i njihovu primjenjivost u biomedicini, u području regenerativne medicine kao i u području razvoja sustava za dostavu lijekova. Ispitat će se tiksotropna svojstva priređenih gelova s dodatkom polimera i mogućnost samopopravljanja. Pratit će se kinetika otpuštanja doksorubicina iz nanokompozitnog materijala koji će imati najbolja svojstva kako bi se procijenile mogućnosti primjene nanomaterijala kao sustava za dostavu lijekova.



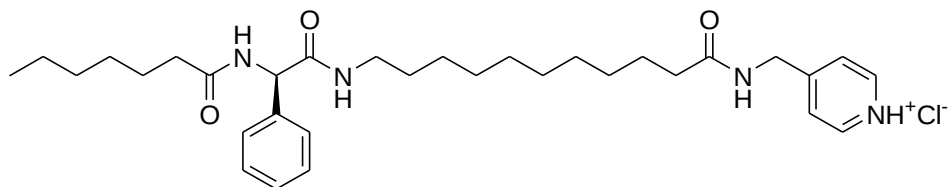
Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (**G1**)



Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (**G2**)



4-pikolilamidni derivat L-fenilalanin·HCl (**G3**)



4-pikolilamidni derivat D-fenilglicina·HCl (**G4**)

Slika 10. Kemijske strukture ispitivanih peptidnih hidrogelatora male molekulske mase

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uvodne napomene

Kemikalije korištene za sintezu svih spojeva kupljene su od proizvođača Sigma Aldrich. Također, korišteni su i 4-pikolilamidni derivat L-fenilalanina·HCl (**G3**) i 4-pikolilamidni derivat D-fenilglicina·HCl (**G4**) čija sinteza i karakteristike su detaljno opisane. u radu Viktora Škorjanca „Kinetika otpuštanja hidroklorida 4-aminosalicilne kiseline iz biološki prihvatljivih pH-ovisnih 4-pikolilamidnih hidrogelatora male molekulske mase“ rad nagrađen Rektorovom nagradom za studentski rad Sveučilišta u Zagrebu, u akademskoj godini 2019./2020. Korišten je i Doksorubicin Pliva 2 mg/mL, otopina za injekcijsku infuziju.

Tankoslojna kromatografija dobivenih spojeva (TLC) rađena je na pločicama silikagela (Merck 60 F₂₅₄) uz vizualizaciju UV-lampom (254 nm). Temperatura prijelaza određivana je u termobloku (Eppendorf, ThermoMixer C). Korištena je Milli-Q voda. Milli-Q označava visoko pročišćenu vodu (otpor 18,2 MΩ cm, TOC < 5 ppb) pomoću sustava za purifikaciju vode, Millipore, Simplicity 185. Sistem funkcionira na način da mjeri koncentraciju iona tako što mjeri električni otpor vode. Viši otpor znači da postoji manje iona koji nose naboj.

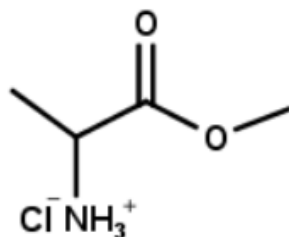
Čistoća svih sintetiziranih spojeva provjerena je spektroskopijom NMR. ¹H spektri snimljeni su spektrofotometrom Bruker Avance DPX 300 s unutarnjim standardom tetrametilsilanom (TMS). Uzorci od 2 do 5 mg svakog produkta uzeti su za NMR analizu (otapalo DMSO/CDCl₃). Konstantne sprege (*J*) izražene su u hercima (Hz), a kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm. Vrste cijepanja označeni su na slijedeći način: s (singlet), d (dublet), t (triplet), dd (dublet dubleta), m (multiplet). Analize spektara ¹H-NMR svih sintetiziranih spojeva priložene su u radu.

Otpuštanje doksorubicina iz gelova praćeno je UV-Vis spektrofotometrijom. UV-Vis-spektri snimljeni su spektrofotometrima Varian Cary 4 i Varian Cary

100 Bio spektrofotometrom u području valnih duljina od 400 do 200 nm, pri čemu je korištena kvarcna kiveta (10 mm) ili optička sonda. Optička rotacija mjerena je na polarimetru AA-10 na valnoj duljini od 589,3 nm. Kemijske strukture spojeva, reakcije i mehanizmi reakcija crtani su u programu MarvinSketch 6.3.0. Rezultati NMR-analize spojeva obrađeni su u programu SpinWorks 4.2.10. Morfologija gelskih niti određena je transmisijском elektronskom mikroskopijom (TEM, Zeiss EM 10A, napon ubrzanja 60 kV i HRTEM JEOL 2100, napon ubrzanja 200 kV). Uzorci gela za potrebe snimanja TEM-om kontrastirani su 2 %-tnom vodenom otopinom kalijeve soli fosfovolframske kiseline ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$, PWK) ili su sjenčani paladijem.

3.2. Sinteze tripeptidnih hidrogelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (G1), Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (G2)

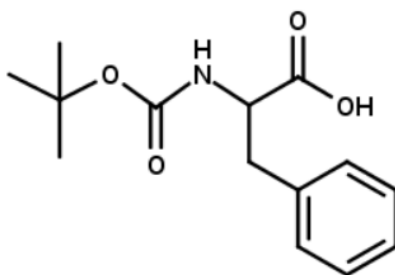
3.2.1. Sinteza Ala-OMe x HCl



Na dvogrlu reakcijsku tikvicu opremljenu hladilom za refluks te lijevkom za dokapavanje montirana je klorkalcijska cijev na oba grla. U tikvicu se zatim doda 60mL apsolutnog metanola i L-alanin (2,666 g, 15 mmol) te se tikvica stavi u ledenu kupelj. U smjesu se još dokapa i tionil-klorid (6 mL, 40,8 mmol). Nakon četverosatnog miješanja pri $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ smjesa se miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Slijedeći dan reakcijska smjesa zagrije se na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ u uljnoj kupelji uz refluks te se nakon hlađenja, uzorak upari do suha uz dodatak male količine MeOH uz postupno dodavanje 228 mL bezvodnog etera (dietil-eter) pri čemu se iz smjese iskristalizira hiroklorid kao fini kristalni prah. Nakon dužeg stajanja, smjesa se ohladi u ledenoj kupelji i filtrira Büchnerovim lijevkom. Bijeli talog se ispere bezvodnim

eterom te stavi sušiti u eksikator. Opisanim postupkom dobiveno je 3,6132 g (86,32 %) produkta; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 8,50 (s, 1H, NHC^*H), 4,09 (q, 1H, $J = 7,2$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,75 (s, 3H, OCH_3), 3,34 (dd, 1H, $J = 11,0$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 3,17 (dd, 1H, $J = 3,7$, CH_2Ph), 2,50 (dd, 1H, $J = 6,7$, CH_2Ph), 1,41 (d, 3H, $J = 3,4$, CH_3_{Ala}), 1,24 (s, 2H, NH_2).

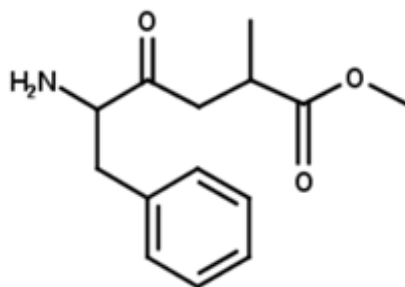
3.2.2. Sinteza Boc-L-Phe-L-Ala-OMe



U tikvicu je stavljena otopina Boc-L-PheOH (4,8864 g, 10 mmol) i 40 mL suhog diklormetana (CH_2Cl_2). Tikvica je zatim stavljena na miješalicu u ledenu kupelj na 450 rpm te je otopina ostavljena da se ohladi pri $-10\text{ }^\circ\text{C}$ na 15 min. Nakon hlađenja, u otopinu su dodani L-Ala-OMe·HCl (2,5694 g, 10 mmol), diizopropiletilamin (DIPEA) (2,8886 g, 10 mmol), *N,N'*-dicikloheksilkarbodimid (DCC) (3,7855 g, 10 mmol) i katalitička količina 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Otopina se miješa u ledenoj kupelji 30 min, nakon čega se makne kupelj te se miješa na sobnoj temperaturi 20 - 24 h uz TLC provjeru reakcije. Talog nusprodukta *N,N'*-dicikloheksiluree (DCHU) odsiše se pod sniženim tlakom pomoću Büchnerovog lijevka uz ispiranje taloga s diklormetanom. Filtrat se zatim prenese u lijevak za odjeljivanje te se ekstrahira polaganim dodavanjem po stijenkama lijevka za odijeljivanje s najprije 100 mL destilirane vode, zatim 10 % KHSO_4 ($V = 100\text{ mL}$), 10 % NaHCO_3 ($V = 100\text{ mL}$) te opet destiliranom vodom (80 mL). Nakon ekstrakcije organskog sloja, organski filtrat se suši na Na_2SO_4 10-ak minuta. Uzorak se potom profiltrira te ostavi na $-8\text{ }^\circ\text{C}$ 24 - 48 h kako bi se istaložio preostali DCHU. Uzorak se opet profiltrira kroz naborani filter papir te se upari do suha na rotavaporu (240 mbar, $40\text{ }^\circ\text{C}$, 2,5 rpm). Doda se 20

mL CH₂Cl₂ i 60 mL petroletera kako bi istaložio bijeli produkt. Opisanim postupkom dobiveno je 2,0289 g (33,82 %) produkta; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,34-7,17 (m, 10H, 2 x Ph), 6,39 (bs, 2H, 2 x NHC*H), 4,98 (bs, 1H, NHC*H), 4,53 (dd, 1H, *J* = 6,8, C*H_{Phe}), 4,35 (q, 1H, *J* = 8,8, C*H_{Phe}), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,14-3,0 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,35 (d, 3H, *J* = 7,6, CH₃Ala).

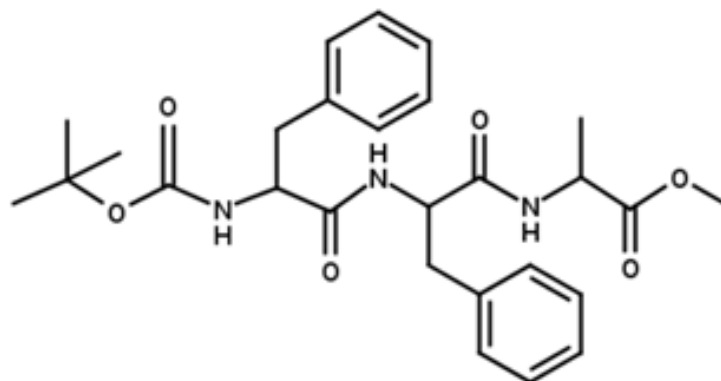
3.2.3. Skidanje Boc-zaštite sa Boc-Phe-Ala-OMe (H₂N-Phe-Ala-OMe)



U ledenu kupelj temperature oko –10 °C stavljena je tikvica od 50 mL te je u nju dodan Boc-Phe-Ala-OMe (4,4096 g, 13 mmol) i 18 mL suhog CH₂Cl₂. Kad se otopina ohladi, doda se 12 mL trifluoroctene kiseline (TFA). Otopina se miješa 30 min pri 0 °C te ostavi miješati preko noći na sobnoj temperaturi. Slijedeći dan, otapalo se upari na 330 mbar i 50 °C te se dobiveno žuto ulje otopi u 20 mL CH₂Cl₂. Otopina se zatim stavlja u ledenu kupelj gdje se neutralizira s 40 mL 10 % KHCO₃. pH se provjerava lakmus papirom. Kad se dobije neutralna otopina, prelije se u lijevak za odjeljivanje gdje se dodaje CH₂Cl₂ u vodeni sloj te se ekstrahira donji organski od gornjeg anorganskog sloja (ukupno 3 ispiranja). Isto tako, organski sloj se 3x ispire i sa vodom. Nakon ispiranja, u donji organski sloj doda se Na₂SO₄ da se sloj osuši. Sloj se profiltrira i upari do suha te se dobije produkt u obliku žutog ulja. Opisanim postupkom dobiveno je 2,5895 g (51,79 %) produkta; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H/ppm: 7,76 (d, 1H, *J* = 3,447, NHC*H), 7,37 - 7,20 (m, 5H, Ph), 4,60 (q, 1H, *J* = 7,632, C*H_{Ala}), 3,75 (s,

3H, OCH₃), 3,65 (dd, 1H, $J = 2,8, 7,0$, C*H_{Phe}), 3,25 (dd, 1H, $J = 2,8, 7,9$, CH₂Ph), 2,73 (dd, 1H, $J = 2,05, 11,14$, CH₂Ph), 1,50 (s, 2H, NH₂), 1,40 (d, 3H, $J = 3,49$, CH_{3Ala}).

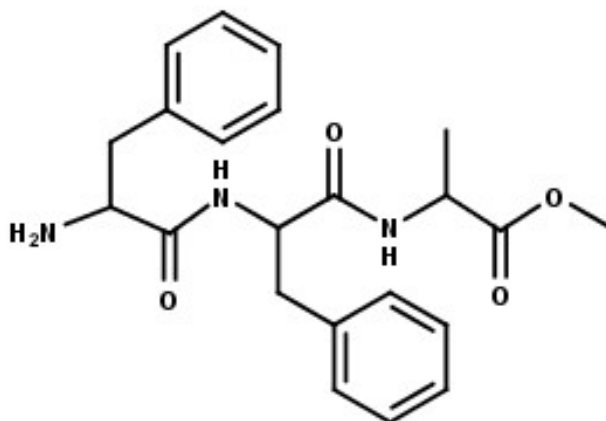
3.2.4. Sinteza Boc-Phe-Phe-Ala-OMe



U tikvicu je stavljena otopina H₂N-Phe-Ala-OMe (2,5895 g, 10 mmol) i 30 mL suhog CH₂Cl₂. Tikvica je zatim stavljena na miješalicu u ledenu kupelj na 450 rpm. Otopina je ostavljena da se ohladi pri –10 °C na 15 min. Nakon hlađenja, u otopinu je dodan Boc-Phe-OH (2,745 g, 10 mmol), DCC (2,135 g, 17 mmol) i katalitička količina DMAP. Otopina se miješa na miješalici 30 min, nakon čega se makne kupelj te se miješa na sobnoj temperaturi 20 – 24 h uz TLC provjeru reakcije. Nakon što TLC kromatografijom potvrdimo da nema početnih reaktanata, otopina se nekoliko puta profiltrira Büchnerovim lijevkom. Ostatak otopine ispire se iz tikvice sa CH₂Cl₂ te se filtracijom dobije filtrat blago žućkaste boje. Dobivena otopina/filtrat se zatim prenese u lijevak za odjeljivanje te se ekstrahira polaganim dodavanjem po stijenkama lijevka za odijeljivanje s 40 mL destilirane vode, zatim 10 % KHSO₄ ($V = 40$ mL), 10 % NaHCO₃ ($V = 40$ mL) te opet destiliranom vodom (30 mL). Nakon ekstrakcije organskog sloja, organski filtrat se suši na Na₂SO₄ 10-ak minuta. Uzorak se profiltrira te ostavi u frižideru na –8 °C 24 h kako bi se istaložio DCHU. Uzorak se opet profiltrira kroz naborani filter papir te se upari do suha. Doda se 20 mL CH₂Cl₂ i 60 mL petroletera kako bi se istaložio bijeli

produkt. Opisanim postupkom dobiveno je 2,6262 g (50,90 %) produkta; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,35-7,01 (m, 10H, 2 x Ph), 6,40 (bs, 2H, 2 x NHC^*H), 4,80 (bs, 1H, NHC^*H), 4,62 (dd, 1H, $J = 3,676, 10,417$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,44 (q, 1H, $J = 6,127$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,29 (d, 1H, $J = 6,740$, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,70 (s, 3H, OCH_3), 3,19-2,84 (m, 4H, 2 x CH_2Ph), 1,33 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,30 (d, 3H, $J = 3,582$, CH_3_{Ala}).

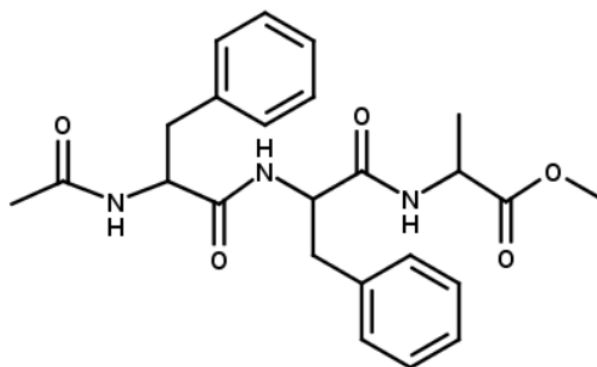
3.2.5. Skidanje Boc-zaštite sa Boc-Phe-Phe-Ala-OMe ($\text{H}_2\text{N-Phe-Phe-Ala-OMe}$)



U ledenu kupelj temperature oko $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ stavljena je tikvica od 100 mL te je u nju dodan Boc-Phe-Phe-Ala-OMe (2,6262 g, 5,272 mmol) i 30 mL suhog CH_2Cl_2 . Kad se otopina ohladi, doda se 6 mL trifluoroctene kiseline (TFA). Otopina se miješa 30 min pri $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ te ostavi miješati preko noći na sobnoj temperaturi. Slijedeći dan, otapalo se upari na 330 mbar i $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ te se dobiveno žuto ulje otopi u 20 mL CH_2Cl_2 . Otopina se stavlja u ledenu kupelj gdje se neutralizira s cca 40 mL 10 % KHCO_3 . pH se provjeri lakmus papirom. Kad se dobije neutralna otopina, u otopinu se doda CH_2Cl_2 te se ekstrahira donji organski od gornjeg vodenog sloja (ukupno 3 ispiranja). Isto tako, 3x se ispire i sa vodom. Nakon ispiranja, u donji organski sloj doda se Na_2SO_4 da se sloj osuši. Sloj se profiltrira i upari do suha te se dobije produkt u obliku žutog ulja. Opisanim postupkom dobiveno je 1,77 g (90,31 %) produkta; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO) $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,80 (d, 1H, $J =$

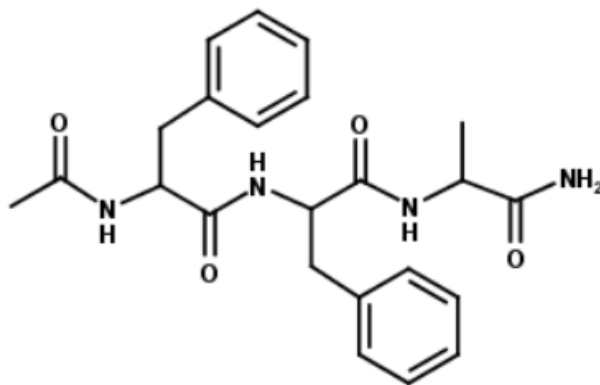
3,971, NHC*H), 7,33-7,11 (m, 10H, 2 x Ph), 6,46 (d, 1H, $J = 3,667$, NHC*H), 4,64 (dd, 1H, $J = 5,648$, 12,707, C*H_{Phe}), 4,48 (q, 1H, $J = 9,2$, C*H_{Ala}), 3,69 (s, 3H, OCH₃), 3,16-3,03 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,58 (bs, 2H, NH₂), 1,30 (d, 3H, $J = 29,307$, CH_{3Ala}).

3.2.6. Acetiliranje H₂N-Phe-Phe-Ala-OMe (Ac-Phe-Phe-Ala-OMe)



Otopina spoja H₂N-Phe-Phe-Ala-OMe (1,77 g, 4,453 mmol) u suhom CH₂Cl₂ (65 mL) ohladi se na -10 °C u ledenoj kupelji. U otopinu se zatim doda DIPEA (1,11 mL, 0,85 mmol) i dokapava se acetil-klorid (0,442 mL, 0,948 mmol). Reakcijska smjesa se zatim miješa 1 h na 0 °C te se ostavi miješati preko noći na sobnoj temperaturi. Slijedeći dan, nakon hlađenja u ledenoj kupelji, reakcijska smjesa se ispiri vodom, 5 % NaHCO₃, 1 M HCl te ponovno vodom. Organski sloj suši se na Na₂SO₄ te se otapalo otpari pod sniženim tlakom. Dobiveno je 0,9202 g (47,02 %) bijelog praškastog produkta Ac-Phe-Phe-Ala-OMe; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ_{H} /ppm: 8,40 (d, 1H, $J = 5,15$, NHC*H), 8,10-7,98 (dd, 2H, $J = 5,76$, 2 x NHC*H), 7,37-7,13 (m, 10H, 2 x Ph), 4,76 (dt, 1H, $J = 4,7$, 8,9, C*H_{Phe}), 4,50-4,40(m, 1H, C*H_{Phe}), 4,30 (dt, 1H, $J = 7,86$, C*H_{Ala}), 3,62 (s, 3H, OCH₃), 3,05 (dd, 1H, $J = 3,72$, 14,2, 2 x CH₂Ph), 2,92 (dd, 1H, $J = 5,2$, 13,9, 2 x CH₂Ph), 2,79 (dd, 1H, $J = 9,2$, 14,2, 2 x CH₂Ph), 2,66 (dd, 1H, $J = 9,8$, 14,0 2 x CH₂Ph), 1,72 (s, 3H, COCH₃), 1,28 (d, 3H, $J = 7,2$, CH₃).

3.2.7. Aminiranje Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂)



Spoj Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (0,9202 g, 2,094 mmol) otopi se u zasićenoj otopini amonijaka u metanolu (30 mL) te se stavi u ledenicu na miješalicu da stoji. Nakon 7 dana dolazi do taloženja produkta. Spoj se odsiše Büchnerovim lijevkom i ispere s MeOH te ostavi sušiti na zraku. Opisanim postupkom dobiveno je 0,3621 g (40,74 %) produkta; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ_{H} /ppm: 8,10 (d, 1H, $J = 4,691$, NHC*H), 8,02 (d, 1H, $J = 4,691$, NHC*H), 7,96 (d, 1H, $J = 2,814$, NHC*H), 7,28 - 7,14 (m, 11H, 2 x Ph + NH(NH₂)), 7,01 (bs, 1H, NH(NH₂)), 4,53-4,41 (m, 2H, 2 x C*H_{Ph}), 4,19 (p, 1H, $J = 7,085$, C*H_{Ala}), 3,12-2,62 (m, 4H, 2 x CH₂Ph), 1,72 (s, 3H, COCH₃), 1,20 (d, 3H, $J = 7,121$, CH_{3Ala}).

3.3. Ispitivanje gelirajućih svojstava peptidnih hidrogelatora

Ispitivanje gelirajućih svojstava gelatora, odnosno ispitivanje formiranja gela, vrši se na 2 načina. Prvi način jest okretanjem epruvete – ukoliko okretanjem epruvete uzorak ne teče, radi se o gelu. Drugi način je test metalne kuglice. Test se provodi tako da se na uzorak stavi metalna kuglica te ukoliko ona počne tonuti, znači da uzorak popušta, odnosno da se nije formirao dovoljno čvrst gel. Važno je naglasiti da se prilikom geliranja moraju koristiti epruvete jednakih dimenzija. U ovom radu za ispitivanje gelirajućih svojstava korištene su epruvete promjera 10 mm u koje je izvagano po oko 5 mg gelatora uz postepeno dodavanje alikvota (100–200 μ L) vode ili pufera. Nakon svakog dodatka alikvota otapala, epruveta se zagrijava kako bi se hidrogelator iz gela preveo u sol-fazu tj. u otopinu. Nakon otapanja gelatora, epruveta se s otopinom hladi u vodenoj kupelji pri sobnoj temperaturi (25 °C) sve dok ne nastane gel. Prilikom dodavanja polimera, nastali gel je najprije otopljen te je nakon svakog dodavanja alikvota polimera (75-100 μ L), otopina sonificirana u ultrazvučnoj kupelji 1 minutu te ostavljena da se hladi. Razlog zbog kojeg se dodaju manje količine alikvota otapala, odnosno polimera u gelator je taj kako bi gelator dobio dovoljno vremena i mogućnosti da na neki način „nauči“ formirati gel.

3.3.1. Ispitivanje kritične koncentracije gelatora (CGC)

U epruvetu promjera 10 mm izvaže se oko 5 mg gelatora te se u njega postupno dodaje alikvot vode ili pufera. CGC označava najmanju koncentraciju pri kojoj gelator još može stvarati gel. U trenutku kada gelator zadnje stvara gel (točka iznad koje više ne stvara gel) znači da je dostignuta CGC.

3.3.2. Ispitivanje učinka polimera PVA i PEG na formiranje gela

U epruvetu promjera 10 mm izvaže se oko 5 mg gelatora te se u njega postupno dodaje alikvot vode (ukupno 500 μ L). Mjeri se temperatura pri kojoj gel prelazi u otopinu. Dodatkom PVA ($M = 89\,000 - 98\,000$ g/mol) ili

PEG ($M = 400$ g/mol; $M = 4000$ g/mol) promatran je utjecaj polimera na gelirajuća svojstva hidrogelatora, na stabilnost gela te na temperaturu pri kojoj dolazi do prijelaza gela u otopinu.

3.3.3. Ispitivanje učinka vrijednosti pH na formiranje gela

U epruvetu promjera 10 mm izvaže se oko 5 mg gelatora te se u njega postupno dodaje alikvot pufera ovisno o njegovoj CGC. Korišteni su puferi: fosforna kiselina/natrijev dihidrogenfosfat ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), 10 mM, pH = 2; limunska kiselina/dinatrijev hidrogenfosfat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ i Na_2HPO_4), 10 mM, pH = 5; fosfatni pufer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 20 mM, pH = 7,4; Tris(hidroksimetil)aminometan, (TRIS), 10 mM, pH = 7,4. Određene su CGC vrijednost gelatora u puferu te je izmjerena temperatura gel-sol prijelaza.

3.3.4. Ispitivanje kinetike otpuštanja DOX iz gela

Kako bismo mogli pratiti otpuštanje DOX iz gela, bilo je potrebno konstruirati baždarni pravac DOX u fosfatnom puferu i provjeriti je li ovisnost apsorbancije o koncentraciji DOX u ispitivanom području koncentracija linearna. Priređene su otopine DOX u fosfatnom puferu u koncentracijskom rasponu od $1,25 \times 10^{-4}$ mol/dm³ do $1,5 \times 10^{-5}$ mol/dm³.

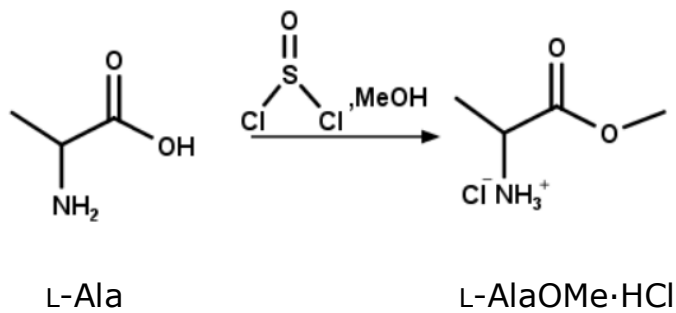
Otpuštanje DOX iz gela praćeno je na sobnoj temperaturi, u 20 mM fosfatnom puferu, pH = 7,4. U epruvetu promjera 10 mm odvagano je 15 mg gelatora te je dodan alikvot fosfatnog pufera (750 μL). Nakon formiranja gela, gel se otopi, te se u otopinu gelatora doda 250 μL DOX hidroklorida u fiziološkoj otopini. Gel se zatim ostavi na mirovanju preko noći kako bi se stabilizirao i kako bi DOX bio homogeno raspoređen. Gel se nadsloji s 3 mL fosfatnog pufera te se određenim vremenskim razmacima ili kontinuirano sa optičkom sondom, spektrofotometrijski pri $\lambda = 480$ nm, mjeri apsorbancija DOX u otopini. Koncentracija DOX u otopini odredi se iz baždarnog pravca. Otpuštanje DOX iz gela izraženo u postotku se izračuna iz poznate početne koncentracije DOX ugrađene u gel.

4. REZULTATI

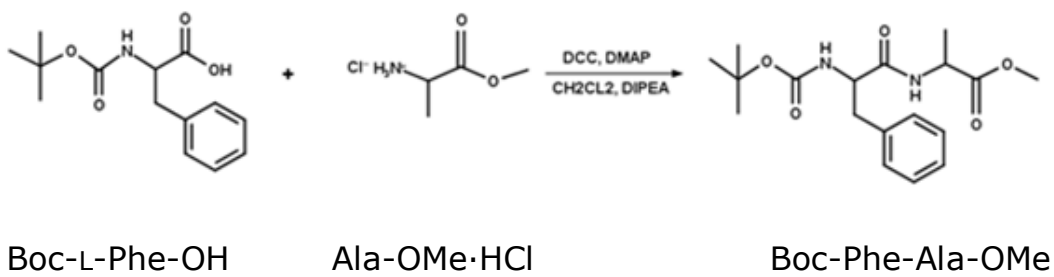
4.1. Sinteza tripeptidnih gelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (**G1**) i Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (**G2**)

Sinteza tripeptidnih gelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (**G1**) i Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (**G2**) odvija se u 6, odnosno 7 koraka počevši od komercijalno dostupnih L-Alanina i Boc-L-Phe-OH. Prvi korak sinteze je stvaranje hidroklorida (Ala-OMe·HCl) iz komercijalno dostupnog L-alanina pomoću tionil-klorida (SOCl₂) i apsolutnog metanola (CH₃OH). U drugom koraku, iz reakcije prethodnog sintetiziranog Ala-OMe·HCl i Boc-Phe-OH uz pomoć kondenzacijskog reagensa *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC), diklormetana (CH₂Cl₂), katalizatora 4-dimetilaminopiridina (DMAP) i organske baze *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA) dobiva se produkt dipeptida, zaštićen tert-butiloksikarbonilnom (Boc) skupinom na početku i metilnom skupinom na kraju lanca (Boc-Phe-Ala-OMe). Treći korak reakcije sinteze je aminiranje produkta iz drugog koraka, odnosno skidanje Boc- zaštitne grupe kako bi se dobio H₂N-Phe-Ala-OMe uz pomoć trifluoroctene kiseline (TFA). U četvrtom koraku, produkt reagira s Boc-Phe-OH uz pomoć DCC, DMAP i diklormetana kako bi se dobio tripeptid – Boc-Phe-Phe-Ala-OMe. U sljedećem koraku produkt četvrtog koraka aminira se uz pomoć TFA u H₂N-Phe-Phe-Ala-OMe. U šestom koraku dolazi do acetilacije uz pomoć acetil-klorida (Ac-Phe-Phe-Ala-OMe), dok u zadnjem koraku dolazi do prevođenja metilnog estera u amid uz pomoć amonijaka. Klasičnim kemijskim reakcijama sinteze peptida u otopini sintetizirani su tripeptidni hidrogelatori koji su korišteni u daljnjem eksperimentalnom radu.

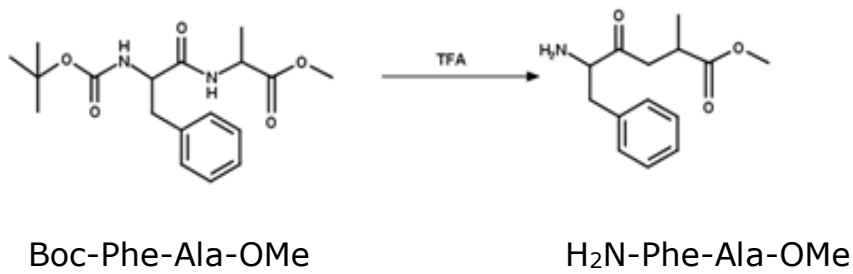
1)



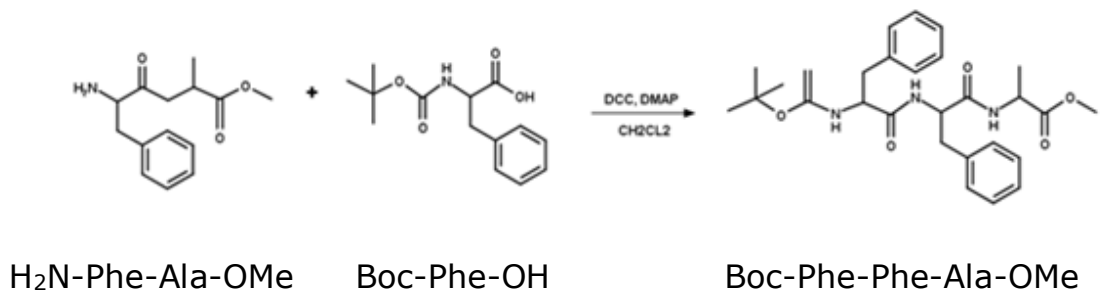
2)



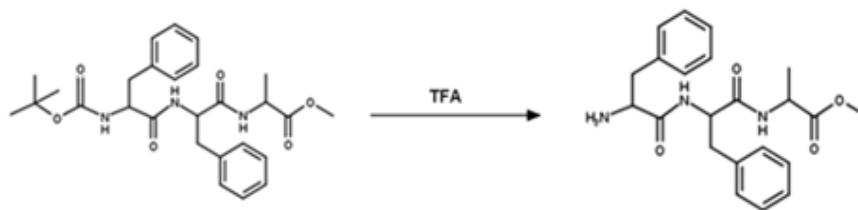
3)



4)



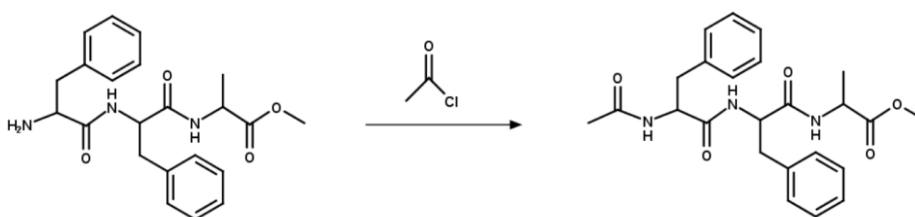
5)



Boc-Phe-Phe-Ala-OMe

H₂N-Phe-Phe-Ala-OMe

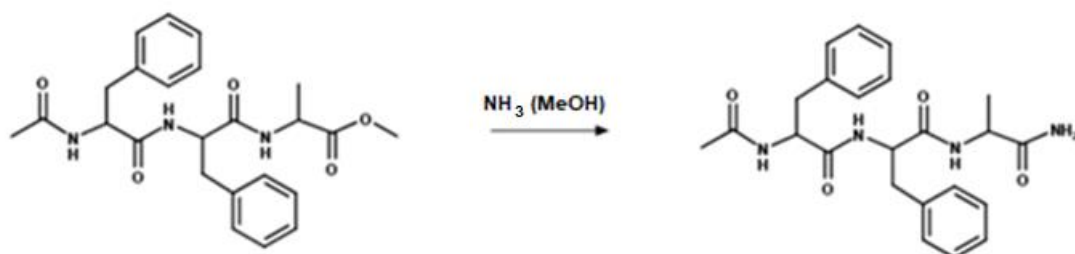
6)



H₂N-Phe-Phe-Ala-OMe

Ac-Phe-Phe-Ala-OMe

7)



Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (**G2**)

Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (**G1**)

Slika 11. Shematski prikaz sinteze hidrogelatora **G1** i **G2**

4.1.1. Učinak polimera na gelirajuća svojstva hidrogelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (G1)

U epruvetu je stavljeno 5 mg hidrogelatora **G1** koji je otopljen u 0,61 mL Milli-Q vodi, što predstavlja polovinu CMC. U otopinu je postupno dodavana otopina PVA (80 mg/mL) u alikvotima 100 µL. Prilikom otapanja uzorka, uzorak se zagrijava kako bi se lakše otopio. Nakon zagrijavanja otopine, otopina je sonificirana kako bi se homogenizirala. Rezultati ovog ispitivanja prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Učinak PVA na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G1**, u Milli-Q vodi

HIDROGELATOR G1 (poč. konc: 8,33 mg/mL)	PVA (80 mg/mL)		OPAŽANJA
	PVA/mg	PVA/%w/V	
5,08 mg / 610 µL	0	0	Gel
5,08 mg / 710 µL	8 mg	1,18	Ne dolazi do geliranja
5,08 mg / 810 µL	16 mg	1,98	Ne dolazi do geliranja

Nakon dodatka PVA uočeno je slabljenje čvrstoće gela te njegovo raspadanje. Također je ispitan utjecaj PEG-400 i PEG-4000 na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G1**. Rezultati ispitivanja prikazani su u tablici 3 i 4.

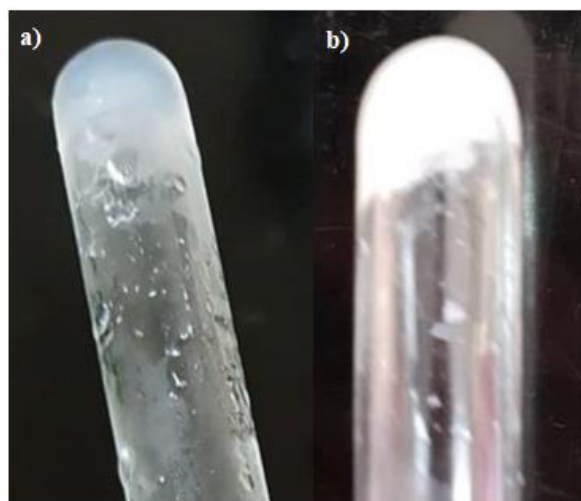
Tablica 3. Učinak polimera PEG-400 na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G1**, u Milli-Q vodi

HIDROGELATOR G1 (poč. konc: 10,84 mg/mL)	PEG-400 (80 mg/mL)		OPAŽANJA
	PEG-400/mg	PEG-400/%w/V	
5,42 mg / 500 μ L	0	0	Gel
5,42 mg / 600 μ L	8	1,33	Brzo gelira
5,42 mg / 700 μ L	16	2,29	Brzo gelira
5,42 mg / 800 μ L	24	3,0	Brzo gelira
5,42 mg / 900 μ L	32	3,56	Brzo gelira
5,42 mg / 1000 μ L	40	4,0	Brzo gelira

Tablica 4. Učinak polimera PEG-4000 na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G1**, u Milli-Q vodi

HIDROGELATOR G1 (poč. koc: 10,12 mg/mL)	PEG-4000 (80 mg/mL)		OPAŽANJA
	PEG-4000/mg	PEG-4000/%w/V	
5,06 mg / 500 μ L	0	0	Gel
5,06 mg / 600 μ L	8	1,33	Slabije gelira
5,06 mg / 700 μ L	16	2,29	Slabije gelira
5,06 mg / 800 μ L	24	3,0	Slabije gelira
5,06 mg / 900 μ L	32	3,56	Nema gela
5,06 mg / 1000 μ L	40	4,0	Nema gela

Nakon dodatka PEG-400, uočeno je da gel postaje sve mutniji te sve čvršći (slika 12.). Nakon dodatka PEG-4000 dolazi do slabljenja čvrstoće gela koji postaje prozirniji.



Slika 12. Prikaz gela a) hidrogelator **G1** u Milli-Q vodi (5,06 mg / 500 μ L)
b) hidrogelator **G1** u Milli-Q vodi (5,06 mg / 500 μ L)+ 4 %w/V PEG-400

4.1.2. Učinak polimera na gelirajuća svojstva hidrogelatora Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (**G2**)

Postupak ispitivanja učinka polimera na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G2** je identičan kao prethodno opisani. U epruvete istih dimenzija odvagano je 5 mg hidrogelatora **G2**, dodavani su alikvoti polimera PVA i rezultati su prikazani u tablici 5. Rezultati su pokazali da i u slučaju hidrogelatora **G2**, dodatak PVA onemogućava proces geliranja te gel ne nastaje. Tijekom dodavanja polimera testirano je nastajanje gela okretanjem epruvete i opažanja su prikazana u tablici 5.

Tablica 5. Učinak PVA na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G2** u Milli-Q vodi

HIDROGELATOR G2 (poč.konc: 8,54 mg/mL)	PVA (80 mg/mL)		OPAŽANJA
	PVA/mg	PVA/%w/V	
5,21 mg / 610 μ L	0	0	Gel
5,21 mg / 710 μ L	8	1,13	Ne dolazi do geliranja
5,21 mg / 810 μ L	16	1,98	Ne dolazi do geliranja

Nakon dodanog prvog alikvota PVA uočeno je slabljenje gela te već pri dodatku od 1%w/V PVA u gelator, gel se raspao. Ispitivanja su nastavljena s drugim polimerom, poli(etilen-glikolom) (PEG). Ispitan je učinak PEG-a različite molekulske mase na geliranje, korišteni su PEG-400 i PEG-4000. Rezultati su prikazani u tablici 6 i tablici 7.

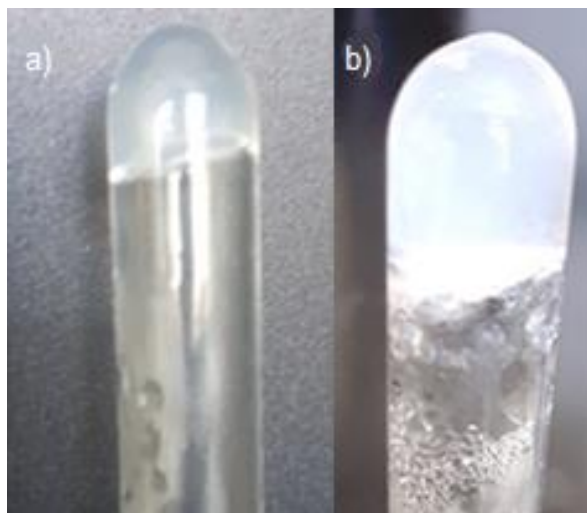
Tablica 6. Učinak PEG-400 na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G2** u Milli-Q vodi

HIDROGELATOR G2 (poč.konc: 10,84 mg/mL)	PEG-400 (80 mg/mL)		OPAŽANJA
	PEG-400/mg	PEG-400/%w/V	
5,42 mg / 500 µL	0	0	Gel
5,42 mg / 600 µL	8	1,33	Gel postaje prozirniji
5,42 mg / 700 µL	16	2,29	Ne dolazi do geliranja

Tablica 7. Učinak PEG-4000 na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G2** u Milli-Q vodi

HIDROGELATOR G2 (poč.konc: 10,24 mg/mL)	PEG-4000 (80 mg/mL)		OPAŽANJA
	PEG-400/mg	PEG-400/%w/V	
5,12 mg / 500 µL	0	0	Gel
5,12 mg / 600 µL	8	1,33	Brzo geliranje
5,12 mg / 700 µL	16	2,29	Brzo geliranje
5,12 mg / 800 µL	24	3,0	Brzo geliranje
5,12 mg / 900 µL	32	3,56	Brzo geliranje
5,12 mg / 1000 µL	40	4,0	Brzo geliranje

Opaženo je da dodavanjem PEG-4000 dolazi do bržeg geliranja hidrogelatora **G2**, i gel se mijenja morfološki, postaje mutniji kako se vidi na slici 13.



Slika 13. Prikaz gela a) hidrogelator **G2** u Milli-Q vodi (5,21 mg / 610 μ L) b) hidrogelator **G2** u Milli-Q vodi (5,21 mg / 610 μ L) + 4 %w/V PEG-4000

4.2. Gelirajuća svojstva hidrogelatora 4-pikolilamidnog derivata L-fenilalanina·HCl (G3**) i 4-pikolilamidnog derivata D-fenilglicina·HCl (**G4**)**

4.2.1. Gelirajuća svojstva hidrogelatora 4-pikolilamidnog derivata L-fenilalanina·HCl (G3**)**

Učinkovitost geliranja, CGC izražena je masenom koncentracijom hidrogelatora **G3** u otapalu, Milli-Q vodi, u kojoj je provedeno ispitivanje. Nakon svakog dodavanja alikvota (100–200 μ L) otapala, zagrijavanja otopine te hlađenja na sobnoj temperaturi, provjeravao se nastanak gela okretanjem epruvete te su se bilježila opažanja. CGC za hidrogelator **G3** iznosi 2,08 % w/V (5 mg u 2400 μ L).

Rezultati ispitivanja gelirajućih svojstava hidrogelatora **G3** uz dodatak PVA prikazani su u tablici 8. Također, ispitivan je učinak razrjeđivanja Milli-Q vodom hidrogelatora **G3** kako bi se utvrdilo dolazi li do smanjenja

temperature prijelaza gel-sol zbog dodatka PVA ili zbog smanjenja same koncentracije hidrogelatora **G3**, tablica 9.

Ispitivan je i učinak puferskih sustava različitih pH na proces geliranja, rezultati tih ispitivanja prikazani su u tablici 10.

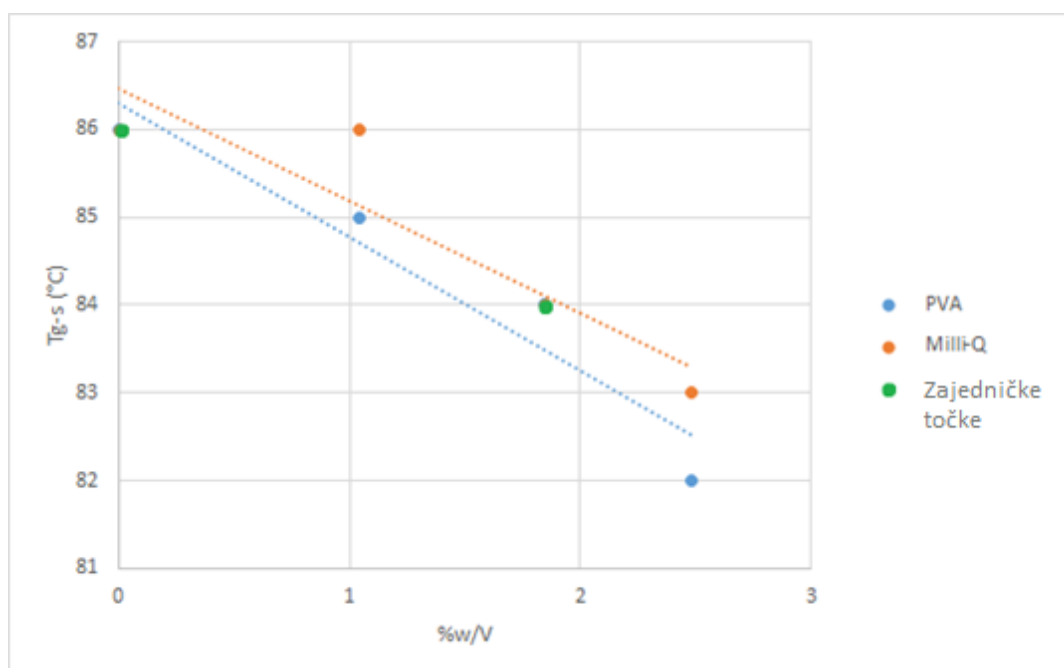
Korišteni su slijedeći puferi: fosforna kiselina/natrijev dihidrogenfosfat ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), 10 mM, pH = 2; limunska kiselina/dinatrijev hidrogenfosfat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ i Na_2HPO_4), 10 mM, pH = 5; fosfatni pufer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 20 mM, pH = 7,4; Tris(hidroksimetil)aminometan, (TRIS), 10 mM, pH = 7,4.

Tablica 8. Učinak PVA na gelirajuća svojstva hidrogelatora **G3** u Milli-Q vodi i temperaturu gel-sol prijelaza

	HIDROGELATOR G3 (poč. konc: 5,35 mg / 500 μL)	PVA (80 mg/mL)		Temperatura t_{g-s} ($^{\circ}\text{C}$)
		m/g	%w/V	
0 μL PVA	1,070	0	0	86
75 μL PVA	0,930	0,006	1,044	85
150 μL PVA	0,823	0,012	1,846	84
225 μL PVA	0,738	0,018	2,483	82
300 μL PVA	0,669	0,024	3,000	/

Tablica 9. Ovisnost temperature prijelaza gel-sol o koncentraciji hidrogelatora **G3** u Milli-Q vodi

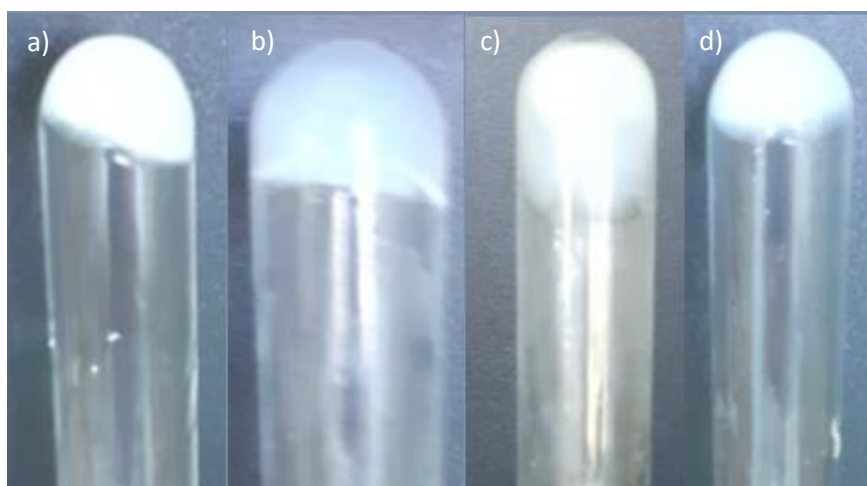
HIDROGELATOR G3 (poč. konc: 5, 09mg / 500 μ L)	Temperatura t_{g-s} ($^{\circ}$C)
% w/V	
1,018	86
0,885	86
0,783	84
0,702	83
0,636	/



Slika 14. Ovisnost temperature prijelaza gel-sol hidrogelatora **G3** o koncentraciji dodanog PVA ili dodane Milli-Q

Tablica 10. Opažanja, pripadajuće vrijednosti CGC i temperatura gel-sol prijelaza hidrogelatora **G3** u različitim puferima pri različitom pH

Otapalo	Opažanja	CGC (% w/V)	Temperatura prijelaza gel-sol $t_{g-s}/^{\circ}\text{C}$
Pufer $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (10 mM, pH = 2)	mutan gel	0,385	74
Pufer $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (10 mM, pH = 5)	nestabilan gel	/	/
dest. H_2O , pH = 5,52	proziran gel	0,208	85
Milli-Q H_2O pH = 6,46	proziran gel	0,208	86
Fosfatni pufer (20 mM, pH = 7,4)	proziran gel	0,208	59
TRIS pufer (10 mM, pH = 7,4)	proziran gel	0,208	58



Slika 15. Gel hidrogelatora **G3** u a) destiliranoj vodi; b) Milli-Q vodi; c) $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (10 mM, pH = 2) d) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (10 mM, pH = 5)

4.2.2. Gelirajuća svojstva hidrogelatora 4-pikolilamidnog derivata D-fenilglicina·HCl (G4)

Za hidrogelator **G4**, učinkovitost geliranja ispitana je na prethodno opisani način i CGC je izražena kao masena koncentracija hidrogelatora **G4** u otapalu, u kojem je provedeno ispitivanje. Nakon svakog dodavanja alikvota otapala, zagrijavanja otopine te hlađenja na sobnoj temperaturi, provjeravao se nastanak gela okretanjem epruvete te su se bilježila opažanja. CGC za hidrogelator **G4** iznosi 1 % w/V (5 mg u 500 µL).

Rezultati ispitivanja gelirajućih svojstava hidrogelatora **G4** uz dodatak PVA prikazani su u tablici 11. Također, ispitivan je učinak razrjeđivanja Milli-Q vodom hidrogelatora **G4** kako bi se utvrdilo dolazi li do smanjenja temperature prijelaza gel-sol zbog dodatka PVA ili zbog smanjenja same koncentracije hidrogelatora **G4**, tablica 12.

Ispitivan je i učinak puferskih sustava na proces geliranja, tablica 13. Korišteni su isti puferški sustavi kao i kod hidrogelatora **G3**.

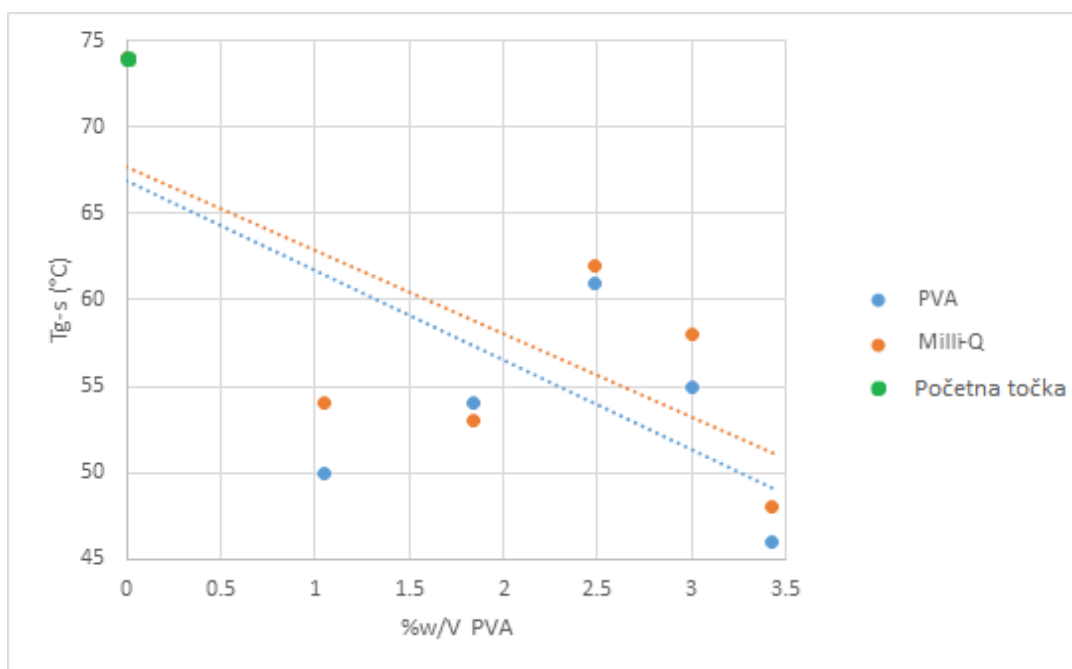
Tablica 11. Utjecaj PVA na promjenu temperature geliranja hidrogelatora **G4**

	HIDROGELATOR G4 (poč. konc: 5.06 mg / 500 µL)	PVA (80mg/mL)		Temperatura t_{g-s}/°C
	% w/V	m/g	%w/V	
0 µL PVA	1,012	0	0	74
75 µL PVA	0,880	0,006	1,044	50
150 µL PVA	0,779	0,012	1,846	54
225 µL PVA	0,698	0,018	2,483	61
300 µL PVA	0,633	0,024	3,000	55

375 μ L PVA	0,578	0,030	3,429	46
450 μ L PVA	0,533	0,036	3,790	/

Tablica 12. Ovisnost temperature gel-sol prijelaza o koncentraciji hidrogelatora **G4** u Milli-Q vodi

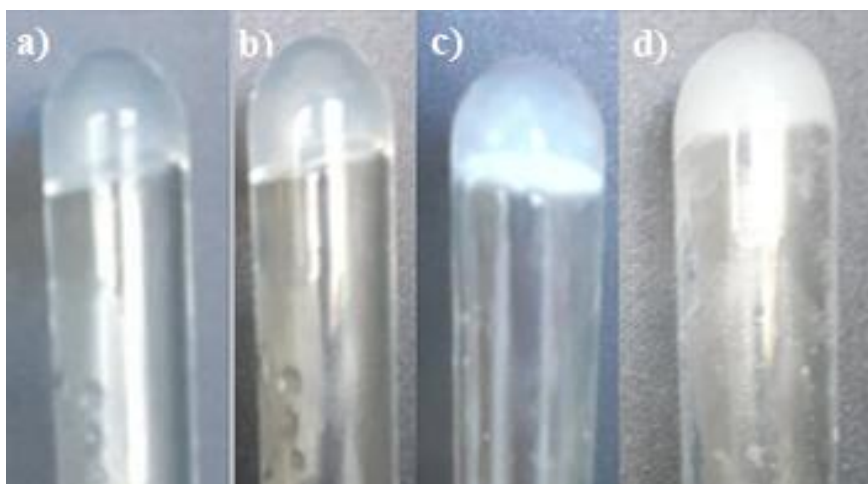
HIDROGELATOR G4 (poč. konc: 5, 12mg / 500 μ L)	Temperatura t_{g-s}/°C
% w/V	
1,024	74
0,890	54
0,788	53
0,706	62
0,640	58
0,585	48
0,539	/



Slika 16. Ovisnost temperature prijelaza gel-sol hidrogelatora **G4** o koncentraciji dodanog PVA ili dodane Milli-Q

Tablica 13. Opažanja, pripadajuće vrijednosti CGC i temperatura gel-sol prijelaza hidrogelatora **G4** u različitim puferima pri različitom pH

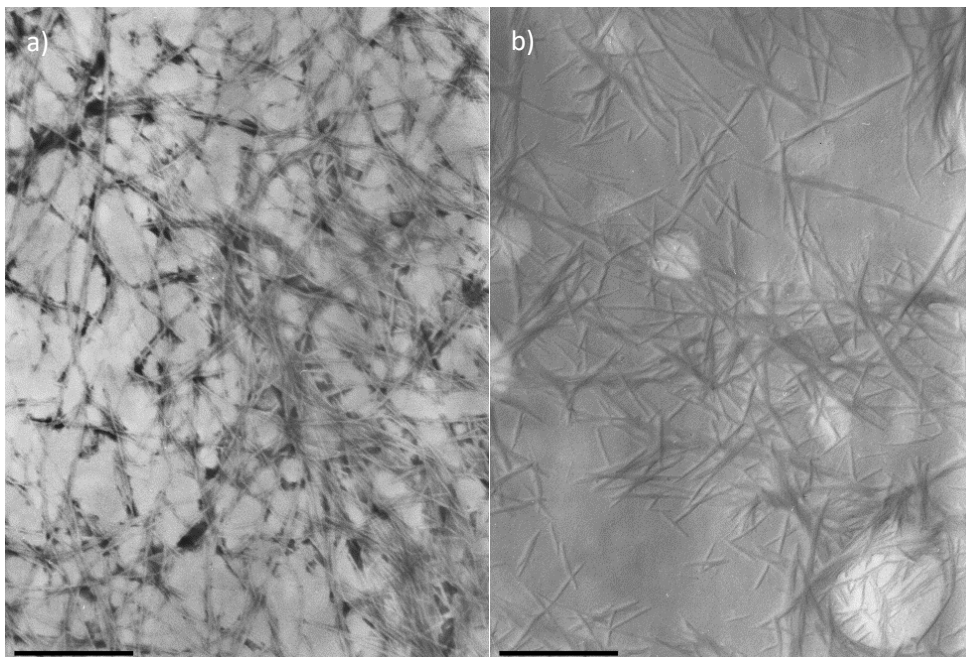
Otapalo	Opažanja	CGC (% w/V)	Temperatura prijelaza gel-sol $t_{g-s}/^{\circ}\text{C}$
Pufer H_3PO_4 i NaH_2PO_4 (10 mM, pH = 2)	mutan gel	1,250	61
Pufer $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ i Na_2HPO_4 (10 mM, pH = 5)	mutan gel	1,111	79
dest. H_2O , pH 5.52	proziran gel	1,0	71
Milli-Q H_2O , pH = 6,46	proziran gel	1,0	69
Fosfatni pufer (20 mM, pH = 7,4)	proziran gel	1,0	55
TRIS-pufer (10 mM, pH = 7,4)	proziran gel	1,0	55



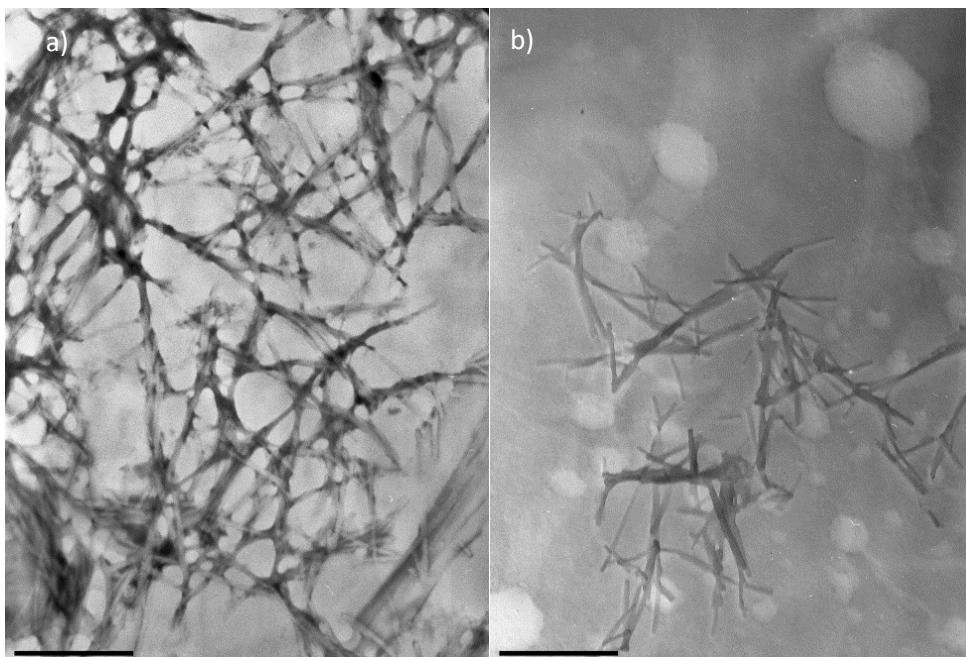
Slika 17. Gel hidrogelatora, **G4** u a) destiliranoj vodi; b) Milli-Q vodi; c) $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (10 mM, pH = 2); d) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (10 mM, pH = 5)

4.2.3. Morfološka analiza hidrogelova transmisijskom elektronskom mikroskopijom

Morfološke karakteristike navedenih hidrogelova analizirane su transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). Rezultati analiza hidrogelova **G1** i **G2** su prikazani na slikama 18 i 19, dok slike 20-24 prikazuju gelove hidrogelatora **G3** i **G4**.



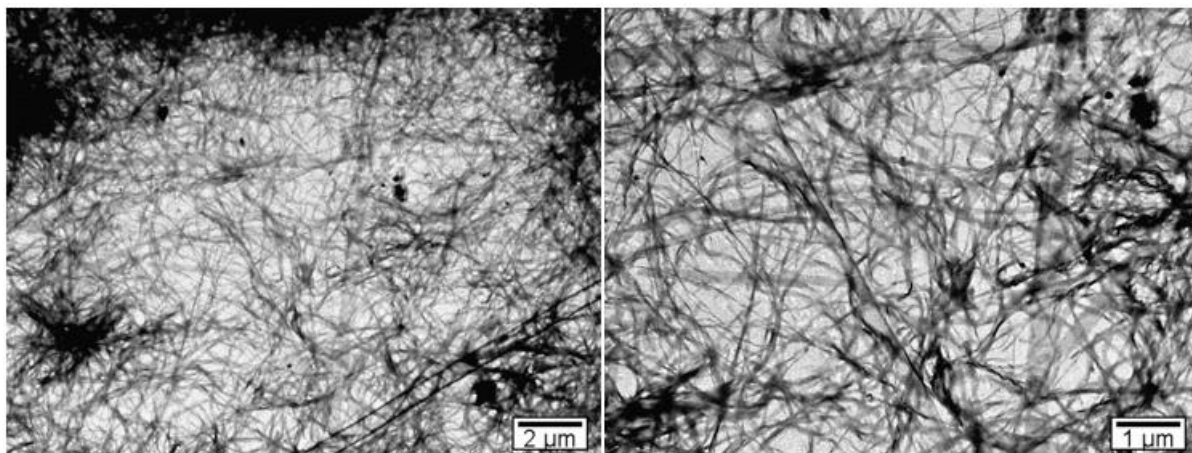
Slika 18. TEM mikrografija gela Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂, **G1** u Milli-Q vodi s dodatkom **PEG-400**, kontrastirano s PWK a) sjenčano paladijem b), mjerna oznaka = 1 μ m



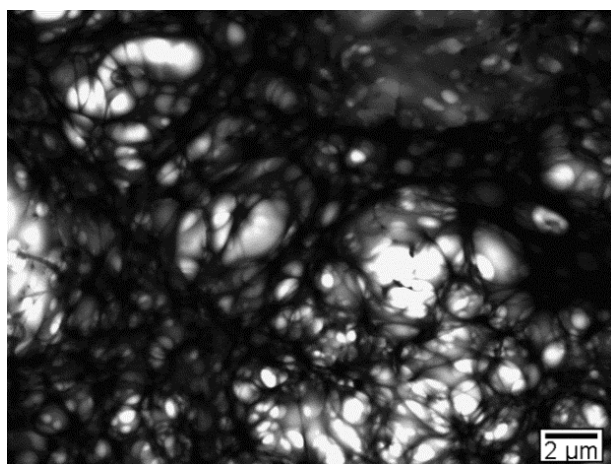
Slika 19. TEM mikrografija gela Ac-Phe-Phe-Ala-OMe, **G2** u Milli-Q vodi s dodatkom **PEG-4000**, kontrastirano s PWK a) sjenčano paladijem b), mjerna oznaka = 1 μ m.

TEM je metoda velike rezolucije koja daje pravu sliku strukture hidrogela, debljinu i raspored peptidnih vlakana. Na slikama 18 i 19 vidi se kako je gelska mreža hidrogelatora **G1** s dodatkom PEG-400, odnosno **G2** i PEG-4000, građena od gustih zapetljanih peptidnih vlakana, gelskih niti u usporedbi s nešto tanjim i ravnim, isprepletenim gelskim nitima u gelu samog hidrogelatora **G1**, kao i **G2** bez polimera (44).

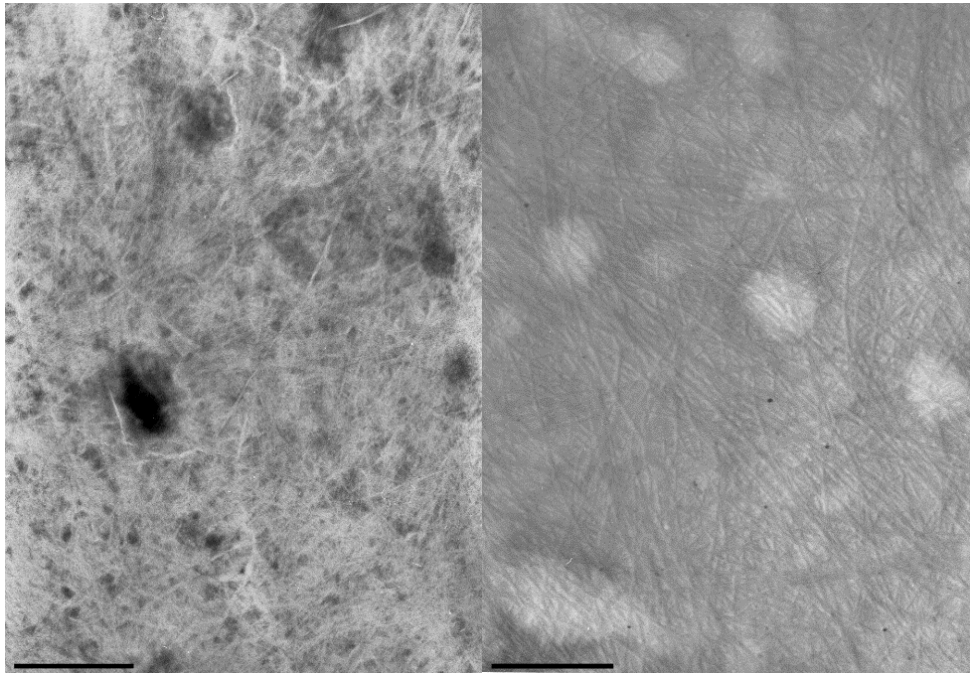
Gelska mreža hidrogelatora **G3** prikazana je na slici 20, a gelska mreža hidrogelatora **G3** s dodatkom PVA na slici 21.



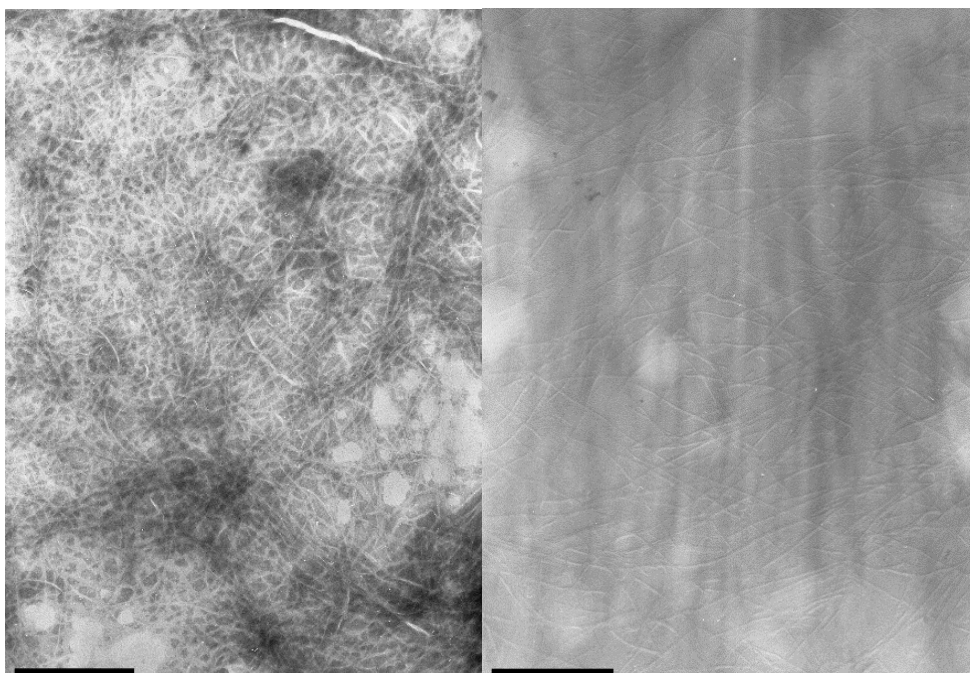
Slika 20. TEM-mikrografija gela hidrogelatora **G3** u Milli-Q vodi, kontrastirano s PWK, mjerne oznake na slici.



Slika 21. TEM-mikrografija gela hidrogelatora **G3** u Milli-Q vodi + **0,64% w/V PVA**, kontrastirano s PWK, mjerna oznaka na slici.



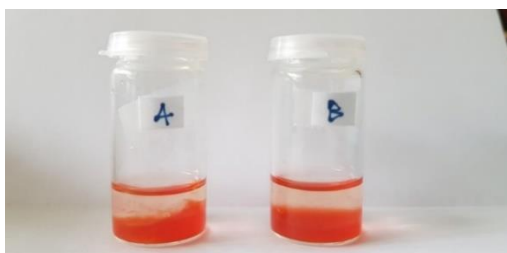
Slika 22. TEM-mikrografija hidrogela hidrogelatora **G4**, u Milli-Q vodi, kontrastirano s PWK a), sjenčano paladijem b) mjerna oznaka = 1 μm .



Slika 23. TEM-mikrografija gela hidrogelatora **G4**, u Milli-Q vodi + **0,64 % w/V PVA** kontrastirano s PWK a) sjenčano paladijem b), mjerna oznaka = 1 μm .

4.2.4. Kinetika otpuštanja doksorubicina iz gela

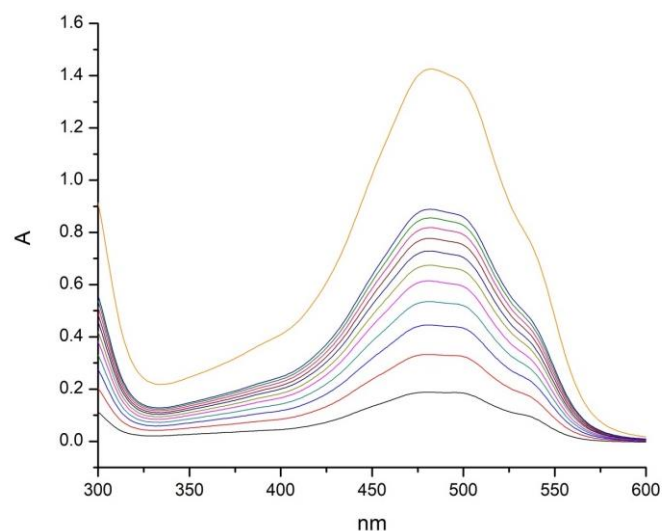
Kinetika otpuštanja DOX ispitana je u gelu hidrogelatora **G4** u Milli-Q vodi sa i bez dodatka PVA. U 1 mL Milli-Q vode otopljeno je 15 mg gelatora u bočici A i 15 mg gelatora uz dodatak 10 mg PVA u drugoj bočici, bočica B, slika 24. U vodenu otopinu hidrogelatora kada je bio u tekućoj fazi dodano je 40 µg DOX (20 µL otopine 2 mg/mL). Gelovi su ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se stabilizirali. Gelovi su nadslojeni fosfatnim puferom u kojem je u točno definiranim vremenskim intervalima spektrofotometrijski mjerena koncentracija DOX.



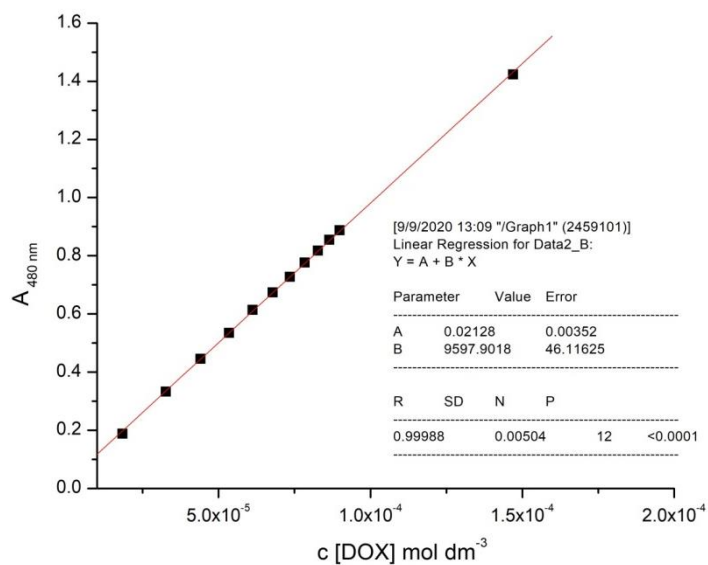
Slika 24. Gelovi hidrogelatora **G4** u Milli-Q vodi bez PVA A) i s dodatkom PVA B) u koje je ugrađen DOX.



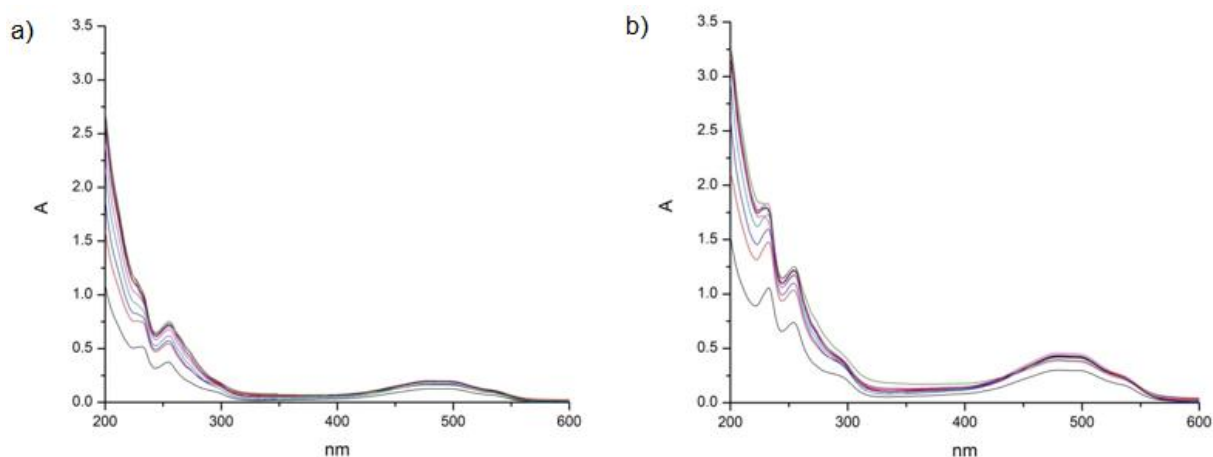
Slika 25. Aparatura za mjerenje kinetike otpuštanja farmaceutski aktivne tvari iz gela



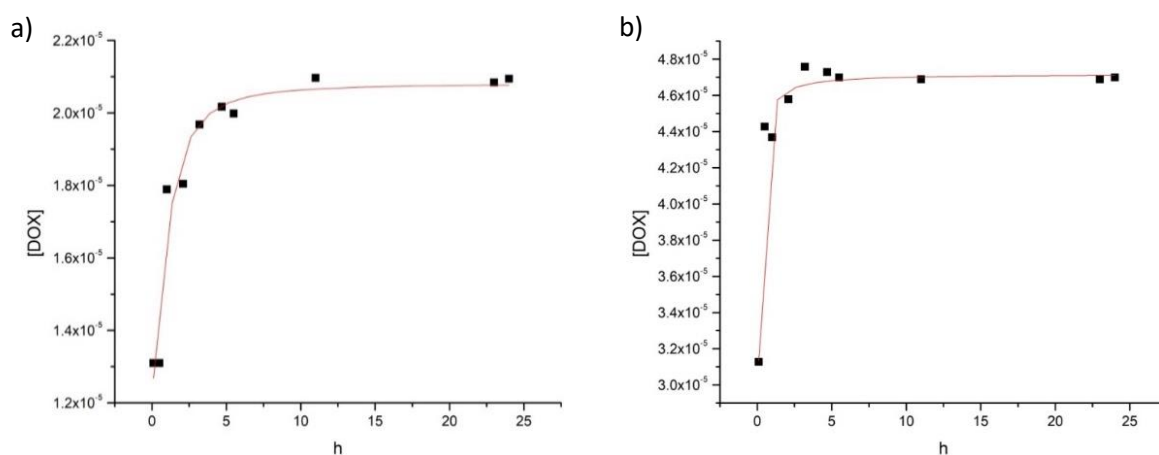
Slika 26. Apsorpcijski spektri otopina DOX različitih koncentracija pripremljenih razrjeđivanjem početne otopine u 20 mM fosfatnom puferu, pH = 7,4.



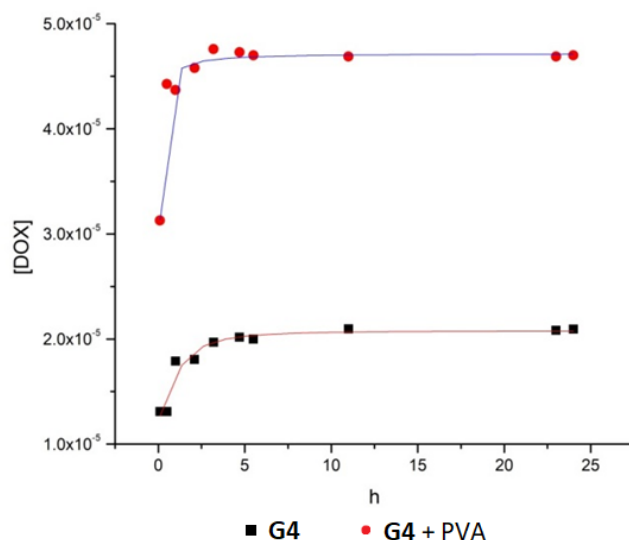
Slika 27. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji DOX u 20 mM fosfatnom puferu, pH = 7,4. (na 480 nm).



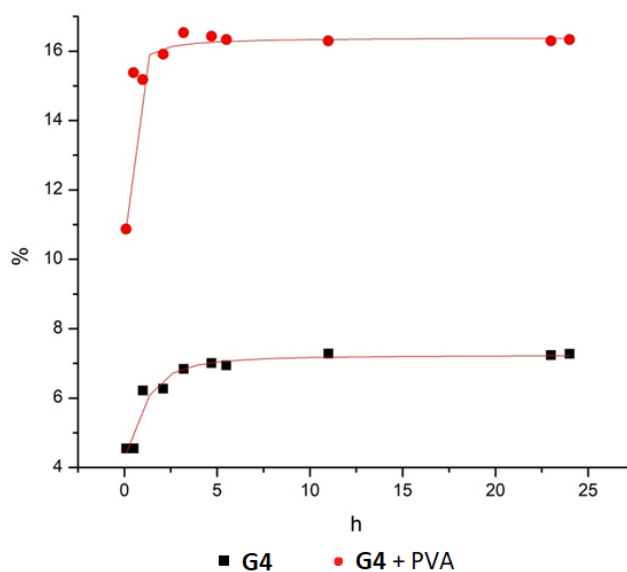
Slika 28. Apsorpcijski spektri otpuštanja DOX tijekom 24 sata u fosfatnom puferu nadslojenom nad gelom hidrogelatora **G4** a). Apsorpcijski spektri otpuštanja DOX tijekom 24 sata u fosfatnom puferu nadslojenom nad nanokompozitnim gelom hidrogelatora **G4** s PVA b), u koje je ugrađen DOX (početna masena konc. DOX 500 $\mu\text{g/mL}$).



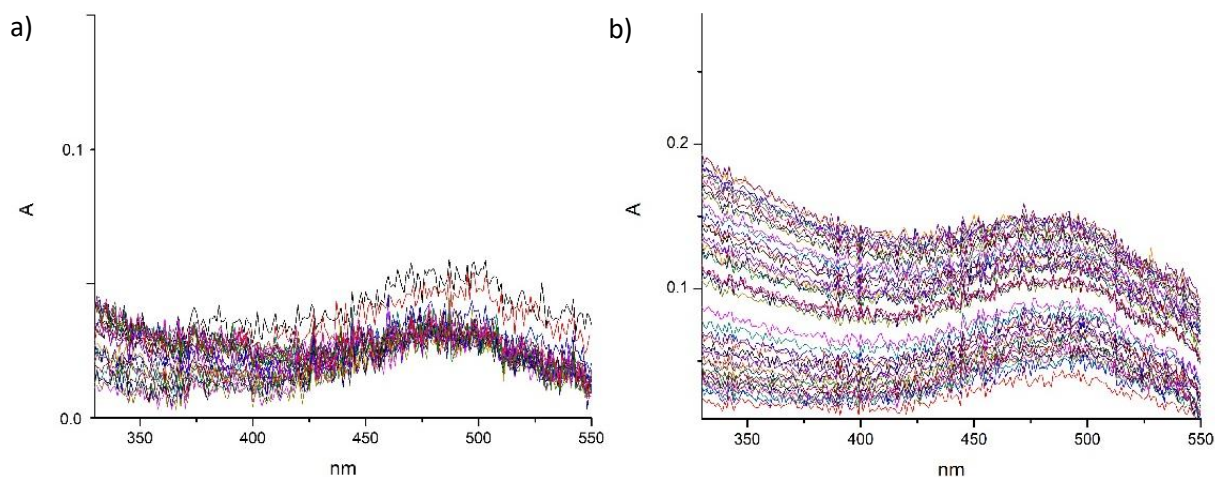
Slika 29. Ovisnost koncentracije DOX o vremenu u fosfatnom puferu nadslojenom nad supramolekulski gel hidrogelatora **G4**, s ugrađenim DOX a); ovisnost koncentracije DOX o vremenu u fosfatnom puferu nadslojenom nad supramolekulski nanokompozitni gel hidrogelatora **G4** i PVA s ugrađenim DOX b).



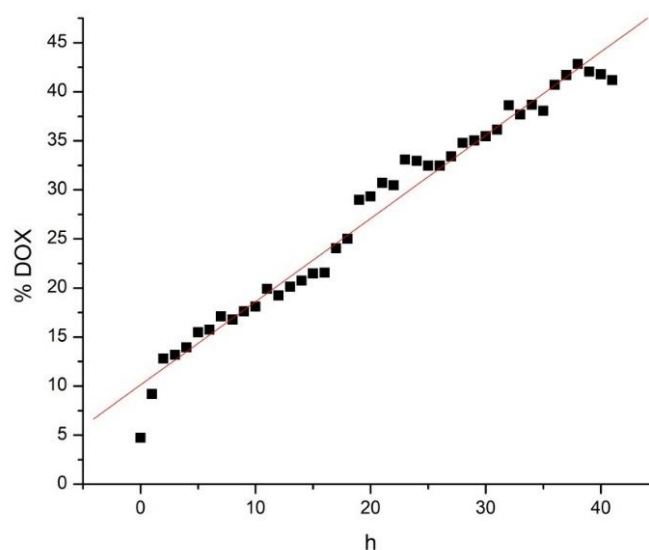
Slika 30. Usporedba ovisnosti koncentracije DOX o vremenu u fosfatnom puferu nadslojenom nad supramolekulske gelove hidrogelatora **G4**, sa i bez dodatka PVA, s ugrađenim DOX.



Slika 31. Ovisnost otpuštenog DOX izraženog u postocima o vremenu u fosfatnom puferu nadslojenom nad supramolekulski gel hidrogelatora **G4** sa i bez PVA, u koje je ugrađen DOX. Mjereno spektrofotometrijski (početna masena konc. DOX u gelu 500 µg/mL).



Slika 32. Apsorpcijski spektri otpuštanja DOX tijekom 48 sati mjereni UV-Vis optičkom sondom, u fosfatnom puferu nadslojenom nad gelom hidrogelatora **G4** a) i apsorpcijski spektri otpuštanja DOX tijekom 48 sati u fosfatnom puferu nadslojenom nad nanokompozitnim gelom hidrogelatora **G4** s PVA b), u koje je ugrađen DOX (početna masena konc. DOX 40 $\mu\text{g/mL}$).



Slika 33. Kinetika otpuštanja DOX iz supramolekulskog nanokompozitnog gela hidrogelatora **G4** s PVA i s ugrađenim DOX, na sobnoj temperaturi (početna masena konc. u gelu DOX 40 $\mu\text{g/mL}$).

5. RASPRAVA

5.1. Analiza i usporedba gelirajućih svojstva tripeptidnih hidrogelatora Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂, **G1** i Ac-Phe-Phe-Ala-OMe, **G2**

Tripeptidni hidrogelatori Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂, **G1** i Ac-Phe-Phe-Ala-OMe, **G2** učinkovito geliraju i njihova svojstva geliranja u vodi već su prethodno detaljno opisana (43, 44). Molekule gelatori sadržavaju kiralne centre te je moguće da će tijekom višekratnog zagrijavanja iznad 60 °C djelomično racemizirati, te će nastati smjesa izomera koja će imati drugačija gelatorska svojstva, zbog čega je potrebna provjera čistoće spoja. Oba nastala hidrogela osjetljiva su na mehaničku silu, trešnju ali i pokazuju tiksotropna svojstva te su samopopravljivi. Do sada nisu ispitana njihova svojstva u smjesi s polimerima, kao što su PEG-400, PEG-4000 i PVA. Dodatkom PVA u gel, oba gela slabije geliraju te postaju prozirniji. Pri dodatku većih količina PVA (> 1 % w/V), gelovi se raspadaju te nastaje pahuljasti talog. Rezultati su pokazali kako PVA ne pospješuje geliranje, već upravo suprotno, onemogućava nastajanje gela, tablice 2 i 5.

S druge strane, učinak PEG-a različit je na navedene gelove, s obzirom na njegovu molekulsku masu. PEG-400 pospješuje stvaranje gela hidrogelatora **G1**, tablica 3, dok PEG-4000 dodatno učvršćuje gel hidrogelatora **G2**, tablica 7. Nanokompozitni gelovi hidrogelatora **G1** i **G2** koji sadrže PEG imaju promijenjena i morfološka svojstva te nastaju mutni, mliječno bijeli gelovi uslijed debljih gelskih niti, slike 12 i 13. TEM mikroskopija je dala precizan uvid u raspored i veličinu peptidnih vlakana te strukturu gelske mreže hidrogelatora **G1** i **G2** s dodatkom PEG-400, odnosno PEG-4000, prikazano na slikama 18 i 19. U skladu s literaturom, gelska mreža je gušća i niti su deblje u usporedbi s gelom bez dodatka polimera koji je opisan u prethodnim istraživanjima Laboratorija za supramolekulsku kemiju, IRB (44). Različit učinak PEG s obzirom na

molekulsku masu nije moguće objasniti bez dodatnih analiza gelske mreže komplementarnim spektroskopskim metodama. Interakcije između samih molekula hidrogelatora u gelskoj mreži kao i između polimera i hidrogelatora ovise o kemijskoj strukturi molekula i o otapalu, a njihova priroda i jačina određuju mehanička svojstva samog gela stoga su predmet brojnih istraživanja (46). Peptidi i proteini s aromatskim aminokiselinama pokazali su veliku sklonost samoudruživanju te je pokazano kako aromatske aminokiseline direktno sudjeluju u aromatskim π - π interakcijama. Takva sklonost proizlazi iz njihove hidrofobnosti te sklonosti stvaranju β -nabranih ploča. Upravo se difenilalaninski peptid (L-Phe-L-Phe) smatra najmanjom građevnom jedinicom u procesu samoudruživanja peptida u različite strukture nanodimenzija kombinacijom vodikovih veza i aromatskih π - π interakcija u vodi (47) (48). Navedeni primjeri potvrđuju specifičnu ulogu aromatskih interakcija u procesu molekulskog samoudruživanja kratkih peptida u nanostrukture visoke stabilnosti. Možemo zaključiti kako se polimer PEG-400 i PEG-4000 u našem slučaju uspješno ugradio u gelsku mrežu hidrogelatora **G1** i **G2** bez ometanja supramolekulskih veznih interakcija.

U literaturi je opisan i nanokompozitni hidrogel građen od *N*-Fmoc-L-triptofana i PEG-4000 gdje je pokazano kako ovisno o količini dodanog PEG-4000 ovisi hoće li vlakna gela biti tanja i gušća ili deblja (23). Također je pokazano kako gel raste i u longitudinalnom, uzdužnom smjeru i lateralno, bočno. Interakcije s PEG-4000 opažene su na bočnoj strani te se stoga zaključuje kako gel raste uzdužno te nastaju tanja vlakna gušće mreže. Pokazano je kako osim što se molekule hidrogelatora povezuju međusobno, one vrlo lako ostvaruju veze i s molekulama PEG-4000. Za pretpostaviti je da strukturne razlike između hidrogelatora **G1** i **G2**, odnosno slobodna amino ili metilna skupina igraju važnu ulogu upravo u tim interakcijama. Za potvrdu ovih opažanja potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdila

priroda interakcija i veza između molekula hidrogelatora **G1** i **G2** te molekula PEG-400 i PEG-4000. Treba naglasiti kako su konačna mehanička svojstva gelova definirana ne samo svojstvima samih niti odnosno vlakana (širina, duljina, itd.) nego i otapalom u kojem dolazi do samoudruživanja. Važno je napomenuti da određen postotak molekula gelatora ostaje slobodan u otopini što gelu daje karakteristično dinamičko ponašanje zbog izmjene gelatora između stanja gela i otopine (49).

5.2. Ispitivanje utjecaja PVA na gelirajuća svojstva hidrogelatora 4-pikolilamidnog derivata L-fenilalanina·HCl (G3) i 4-pikolilamidnog derivata D-fenilglicina·HCl (G4)

Preliminarni rezultati ispitivanja gelirajućih svojstava hidrogelatora **G3** i **G4** u ovom diplomskom radu pokazali su kako čvrsti i stabilni hidrogelovi nastaju pri kiselom pH te sve do neutralnog pH. Pikolilamidna podjedinica uključuje piridinski prsten koji je u kiselim uvjetima protoniran ($pK_a = 2,8$). Protonirane su molekule, za razliku od neprotoniranih, sklone samoudruživanju i stoga takvi spojevi pokazuju dobra gelirajuća svojstva. Gelatori stvaraju gel u kiselom pH te na taj način mogu prenijeti lijek bez otpuštanja kroz želudac ($pH = 1,5-2,5$) do tankog crijeva gdje se gel razgrađuje i otpušta lijek. Pri fiziološkom pH u krvi ($7,35 - 7,45$) ne stvara se gel (50). Pokazano je da temperatura prijelaza gel-sol opada padom koncentracije hidrogelatora, tablica 9 za hidrogelator **G3**, tablica 12 za hidrogelator **G4**. Učinak PVA na temperaturu geliranja hidrogelatora **G3** i **G4** nije bio značajan, promjene nisu mogle biti kvantitativno izražene, bile su u rasponu eksperimentalne pogreške, tablica 8 i tablica 11. Snižavanjem pH, povećava se CGC oba hidrogelatora **G3** i **G4**. Najveća stabilnost hidrogelatora **G3** pokazana je u otapalu Milli-Q, dok je **G4** nešto stabilniji pri $pH = 5$, tablica 10 i tablica 13.

Dodatak PVA hidrogelatorima **G3** i **G4** dodatno učvršćuje gel. U kiselom, pri nižem pH gelovi su sve mutniji, što ukazuje na morfološke promjene, slika

15 i slika 17. Dodatkom PVA učvršćuju se gelovi **G3** i **G4**, oni su stabilniji, mutniji te otporniji na vanjsku mehaničku silu, trešnju. Pri dodatku PVA u hidrogel, PVA se natječe s vodom za stvaranje vodikovih veza s gelatorom. Opažanja su vrlo slična kao kod interakcije PEG s hidrogelatorima **G1** i **G2**, s obzirom na to da se hidrogelatori **G3** i **G4** razlikuju u samo jednoj metilnoj skupini u kemijskoj strukturi. Za razliku od PVA, ovisno o svojoj molekulskoj masi, PEG ometa geliranje oba hidrogelatora, **G3** i **G4**. Dodatak PVA jače učvršćuje gel hidrogelatora **G4** nego gel hidrogelatora **G3**. CGC za hidrogelator **G3** iznosi 2,08 % w/V dok CGC za hidrogelator **G4** iznosi 1 % w/V. Dodatak PVA ne utječe značajno na promjenu temperature gel-sol prijelaza hidrogelatora **G3**, tablica 8. Dodatak PVA dodatno mijenja morfologiju gela te on pri većim dodacima PVA od transparentnog gela postaje mutni, mliječno bijeli gel. Na slici 20 prikazana je TEM mikrografija strukture gela hidrogelatora **G3** na kojoj se vidi gusta mreža tankih gelskih niti, dok je slici 21 prikazan gel hidrogelatora **G3** s dodatkom PVA. Vidljivo je kako gel s dodatkom PVA ima značajno deblje gelske niti koje su snažno umrežene. Dodatak PEG-400 i PEG-4000 onemogućava geliranje hidrogelatora **G3** i **G4**. Potvrđeno je da hidrogelatori lakše i brže geliraju na nižem pH.

U tablici 11 prikazani su rezultati ispitivanja učinka PVA na promjenu temperature prijelaza gel-sol hidrogelatora **G4**, a u tablici 12 ovisnost temperature prijelaza gel-sol o koncentraciji **G4** hidrogelatora. Temperatura prijelaza gel-sol opada sa smanjenjem koncentracije hidrogelatora **G4**, također opada i s povećanjem dodatka PVA no ta promjena nije značajna nego je u rasponu eksperimentalne pogreške te je ne možemo pripisati učinku PVA nego smanjenju masene koncentracije hidrogelatora u konačnom nanokompozitnom gelu. Dodatak PVA mijenja također morfološka svojstva gela, dodatno zamućuje gel te on pri većim dodacima postaje neprozirno bijeli, odnosno, gel tvori sve deblja vlakna, što

je moguće vidjeti na slici 23. Dodatkom PVA hidrogelatoru **G4** nastaje gusta mreža nanokompozitnog gela. Opisano je da u prisustvu PVA, vlakna imaju tendenciju u velikoj mjeri jače se zapletati i dolazi do povećanja promjera vlakana koji ovisi o koncentraciji PVA. Također, kristali PVA, koji djeluju kao čvorišta za rast vlakna, također utječu na pojačano geliranje. Kristali nastaju fizičkim umrežavanjem dugih amorfnih lanaca PVA (23).

Provedena su preliminarna mjerenja kinetike otpuštanja doksorubicina iz hidrogela hidrogelatora **G4**, sa i bez dodatka PVA, na sobnoj temperaturi. Otpuštanje doksorubicina nešto je brže iz hidrogela s dodatkom polimera PVA što je u skladu s literaturnim podacima. Smatra se kako iako PVA učvršćuje gelsku mrežu, to na neki način smanjuje interakcije doksorubicina s molekulama hidrogelatora i otapala te se iz takve učvršćene mreže doksorubicin lakše oslobađa. Također je u preliminarnim pokusima uočena razlika u kinetici otpuštanja DOX u dva uzorka hidrogela **G4** sa i bez PVA, koji je sadržavao različite koncentracije DOX. Kada je koncentracija DOX bila veća (0,5 mg/mL) kinetika izlučivanja lijeka, prikazana ovisnost koncentracije izlučenog DOX i vremena mogla se opisati krivuljom koja ima sigmoidni oblik, slike 29 i 30. Pri manjoj koncentraciji DOX (0,04 mg/mL) ovisnost izlučenog DOX iz nanokompozitnog gel hidrogelatora **G4** s PVA o vremenu je linearna, slika 32. Poznato je kako na kinetiku otpuštanja aktivne tvari iz nosača utječu različiti fizikalni procesi (bubrenje matrice), fizikalno-kemijski procesi (erozija matrice, otapanje i rekristalizacija aktivne tvari, prijenos aktivne tvari (difuzija i konvekcija) i interakcija aktivne tvari s okosnicom matrice) i parametri sustava (početna raspodjela i koncentracija aktivne tvari unutar matrice, oblik matrice i njezine dimenzije) (49).

Prema literaturnim podacima proces oslobađanja lijeka u početku započinje s površine hidrogela otapanjem lijeka topljivog u vodi, odnosno puferu. Nakon toga u sljedećoj fazi se oslobađaju ostale molekule lijeka kroz proces

difuzije koji održava prodiranje molekula vode u mrežu gela. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se precizno utvrdila kinetika otpuštanja DOX iz opisanih nanokompozitnih hidrogelova ovisno o koncentraciji DOX ali i o pH otopine, te utvrdili mehanizmi koji utječu na kinetiku otpuštanja.

6. ZAKLJUČAK

Priređeni su nanokompozitni supramolekulski sustavi temeljeni na tripeptidnim hidrogelatorima Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ (**G1**), Ac-Phe-Phe-Ala-OMe (**G2**), 4-pikolilamidnom derivatu L-fenilalanina·HCl (**G3**) i 4-pikolilamidnom derivatu D-fenilglicina·HCl (**G4**). Ispitane su CGC hidrogelatora te njihove karakteristike u različitim puferima i pri različitom pH. Hidrogelatori **G1** i **G2** tvore gelove koji nisu osjetljivi na promjenu pH, dok **G3** i **G4** formiraju gelove pri neutralnom pH, bolje geliraju u kiselom pH te ne formiraju gelove u lužnatim uvjetima. Ispitan je i utjecaj dodatka polimera PVA i PEG na gelirajuća svojstva opisanih hidrogelatora. Pokazano je da polimer PVA utječe na mehanička i morfološka svojstva gelova hidrogelatora **G3** i **G4**. Gelovi nastaju brže i stabilniji su. Pokazano je također kako polimer PEG-400 i PEG-4000 utječu povoljno na nastajanje gelova hidrogelatora **G1** i **G2**. PEG-400 jače utječe na hidrogelator **G1**, na način da ga učvršćuje i stabilizira. PEG-4000 pokazao je jači utjecaj na hidrogelator **G2**. Provedena su preliminarna istraživanja kinetike otpuštanja doksorubicina iz gela hidrogelatora **G4**, kao i iz nanokompozitnog gela hidrogelatora **G4** s dodatkom PVA. Otpuštanje je nešto brže iz nanokompozitnog hidrogela s dodatkom polimera PVA. Također je pokazana razlika u načinu otpuštanja i koncentracije doksorubicina ugrađenog u hidrogel.

7. LITERATURA

1. Zukerman-Schpector J, Haiduc I, Tiekink ERT. Supramolecular Self-assembly of Transition Metal Carbonyl Molecules Through M-CO(Lone Pair)... π (Arene) Interactions. *Chem Commun.* 2011;47:12682-12684.
2. Huang F, Anslyn E V. Introduction: Supramolecular Chemistry. *Chem Rev.* 2015;115(15):6999.
3. Mann JL, Yu AC, Agmon G, Appel EA. Supramolecular polymeric biomaterials. *Biomater Sci.* 2018;6(1):10–37.
4. Zhou J, Li J, Du X, Xu B. Supramolecular biofunctional materials. *Biomaterials* [Internet]. 2017;129:1–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.014>
5. Sangeetha NM, Maitra U. Supramolecular gels : Functions and uses. *Chem Soc Rev.* 2005;34(10):821–36.
6. Darge HF, Andrgie AT, Tsai HC, Lai JY. Polysaccharide and polypeptide based injectable thermo-sensitive hydrogels for local biomedical applications. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;133:545–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.131>
7. Marchesan S, Waddington L, Easton CD, Kushkaki F, Mclean KM, Forsythe JS, et al. Tripeptide Self-Assembled Hydrogels : Soft Nanomaterials for Biological Applications. *Bionanoscience.* 2013;3:21–9.
8. Cairul M, Mohd I, Ahmad N, Pandey M. Recent advances in the role of supramolecular hydrogels in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(7):1149-1161.
9. Saunders L, Ma PX. Self-Healing Supramolecular Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Macromol Biosci.* 2018;19(1):1–11.
10. Liu K, Steed JW. Triggered formation of thixotropic hydrogels by balancing competitive supramolecular synthons. *Soft Matter.* 2013;9(48):11699–705.
11. Ma Y, Lyu L, Guo Y, Fu Y, Shao Q, Wu T, et al. Porous lignin based poly (acrylic acid)/organo-montmorillonite nanocomposites: Swelling behaviors and rapid removal of Pb (II) ions. *Polymer (Guildf)* [Internet]. 2017;128:12–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2017.09.009>
12. Hua R, Li Z. Sulfhydryl functionalized hydrogel with magnetism : Synthesis , characterization , and adsorption behavior study for heavy metal removal. *Chem Eng J* [Internet]. 2014;249:189–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.097>

13. Wu N, Li Z. Synthesis and characterization of poly (HEA / MALA) hydrogel and its application in removal of heavy metal ions from water. Chem Eng J [Internet]. 2013;215–216:894–902. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.084>
14. Zhu Q, Li Z. Hydrogel-supported nanosized hydrous manganese dioxide : Synthesis , characterization , and adsorption behavior study for Pb 2 + , Cu 2 + , Cd 2 + and Ni 2 + removal from water. Chem Eng J [Internet]. 2015;281:69–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.06.068>
15. Zheng Y, Zheng Y, Yang S, Guo Z, Zhang T. Green Chemistry Letters and Reviews Esterification synthesis of ethyl oleate catalyzed by Brønsted acid – surfactant-combined ionic liquid. Green Chem Lett Rev. 2017;10(4):202–9.
16. Zhang L, Yu W, Han C, Guo J, Zhang Q, Xie H. Large Scaled Synthesis of Heterostructured Electrospun TiO 2 / SnO 2 Nanofibers with an Enhanced Photocatalytic Activity. J Electrochem Soc. 2017;164(9):651–6.
17. Qi C, Liu J, Jin Y, Xu L, Wang G, Wang Z, et al. Photo-crosslinkable, injectable sericin hydrogel as 3D biomimetic extracellular matrix for minimally invasive repairing cartilage. Biomaterials. 2018 May;163:89–104.
18. Li Y, Wu X, Song J, Li J, Shao Q, Cao N, et al. Reparation of recycled acrylonitrile-butadiene-styrene by pyromellitic dianhydride: Reparation performance evaluation and property analysis. Polymer (Guildf). 2017;124:41–7.
19. Akinoki AK, Aneo YK, Keda YI, Anaka TT, Ujita KF. Synthesis of Poly (vinyl alcohol)– Doxorubicin Conjugates Containing cis -Aconityl Acid-Cleavable Bond and Its Isomer Dependent Doxorubicin Release. Biol Pharm Bull. 2008;31(January):103–10.
20. Aneo YK, Ashihama SH, Akinoki AK, Anaka TT. Regular Article Pharmacokinetics and Biodisposition of Poly (vinyl alcohol) in Rats and Mice. Drug Metab Pharmacokinet. 2005;20(6):435–42.
21. Adhia YJ, Schloemer TH, Perez MT, Mcneil AJ. Using polymeric additives to enhance molecular gelation : impact of poly(acrylic acid) on pyridine-based gelators. Soft Matter. 2012;8:430–4.
22. Chakraborty P, Mondal S, Khara S, Bairi P, Nandi AK. Integration of Poly(ethylene glycol) in N - Fluorenylmethoxycarbonyl - L- tryptophan Hydrogel Influencing Mechanical, Thixotropic, and Release Properties. J Phys Chem. 2015;119(18):5933–44.

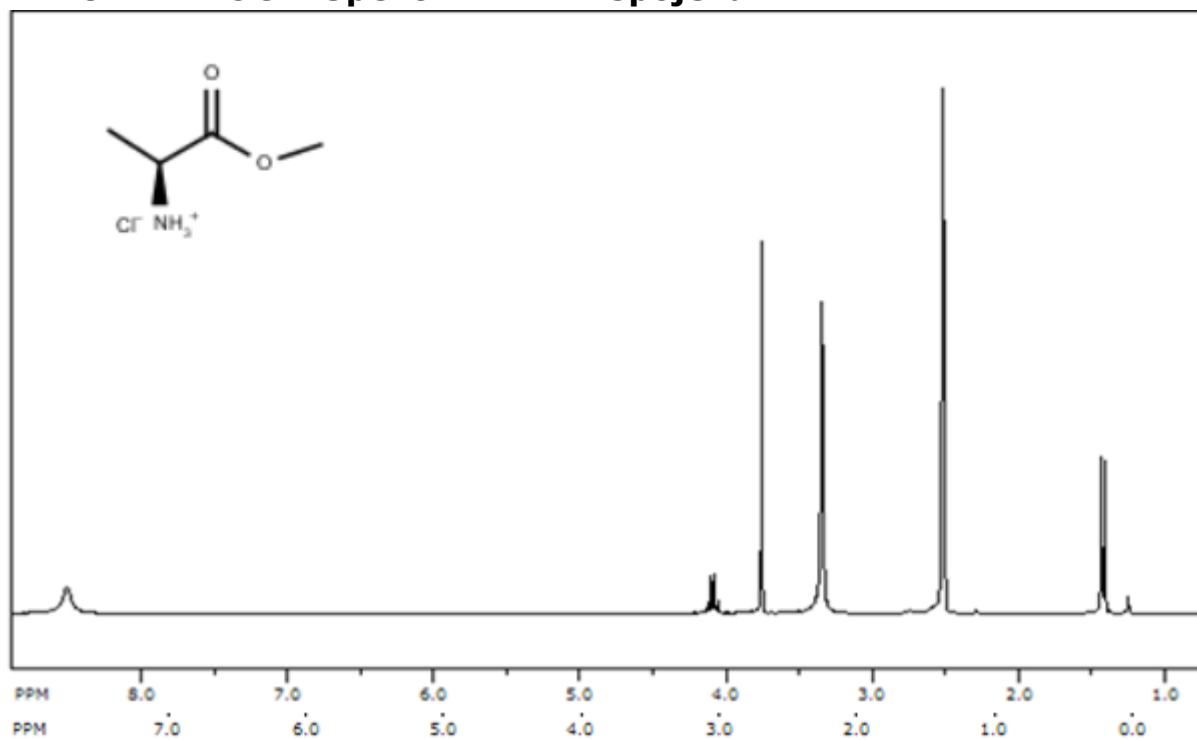
23. Das Mahapatra R, Dey J, Weiss RG. Poly(vinyl alcohol)-induced thixotropy of an l-carnosine-based cytocompatible, tripeptidic hydrogel. *Soft Matter*. 2019 Jan;15(3):433–41.
24. Terech P, Allegraud JJ, Garner CM. Thermoreversible Gelation of Organic Liquids by Arylcyclohexanol Derivatives : a Structural Study. *Langmuir*. 1998;14(15):3991–8.
25. Chakraborty P, Bairia BR, Nandi P, Arun K. Improved mechanical and photophysical properties of chitosan incorporated folic acid gel possessing the characteristics of dye and metal ion absorption. *Journals Mater Chem*. 2012;22(38):20291–8.
26. Liu D, Chang X, Dong C. Reduction- and thermo-sensitive star polypeptide micelles and hydrogels for on-demand drug delivery. *Chem Commun*. 2013;49(12):1229–31.
27. Chen L, Revel S, Morris K, Spiller DG, Serpell C, Adams DJ. Low molecular weight gelator – dextran composites. *Chem Commun*. 2010;46(36):6738–40.
28. Hanabusa K, Itoh A, Kimura M, Shirai H. Terephthaloyl Derivatives as New Gelators; Excellent Gelation Ability and Remarkable Increase of Gel Strength by Adding Polymers. *Chem Lett*. 28(8):767–8.
29. Mahapatra R Das, Dey J, Weiss RG. L-Carnosine-Derived Fmoc-Tripeptides Forming pH- Sensitive and Proteolytically Stable Supramolecular Hydrogels. *Langmuir*. 2017;33(45):12989–99.
30. Chivers PRA, Smith DK. Shaping and structuring supramolecular gels. *Nat Rev Mater* [Internet]. 2019;4:463–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-019-0111-6>
31. Dong R, Pang Y, Su Y, Zhu X. Supramolecular hydrogels: synthesis, properties and their biomedical applications. *Biomater Sci*. 2015;3(7):937–54.
32. Stephanopoulos N, Ortony JH, Stupp SI. Self-assembly for the synthesis of functional biomaterials. *Acta Mater* [Internet]. 2013;61(3):912–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actamat.2012.10.046>
33. Webber MJ, Langer R. Drug delivery by supramolecular design. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2017;46(21):6600–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7CS00391A>
34. Lim JYC, Lin Q, Xue K, Loh XJ. Recent advances in supramolecular hydrogels for biomedical applications. *Mater Today Adv* [Internet]. 2019;3:100021. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100021>
35. Pham SH, Choi Y, Choi J. Stimuli-Responsive Nanomaterials for Application in Antitumor Therapy and Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2020;12(7):630.

36. Caccavo D, Cascone S, Lamberti G, Barba AA, Larsson A. Drug Delivery From Hydrogels: A General Framework for the Release Modeling. *Curr Drug Deliv*. 2017;14(2):179–89.
37. Chen J, Xu X, Yang S, Yang J, Zhuo R, Zhang X. Self-assembled B α A-like amphiphilic peptides as viral-mimetic gene vectors for cancer cell targeted gene delivery. *Macromol Biosci* . 2013;13(1):84–92.
38. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Design and engineering of nanogels for cancer treatment. *Drug Discov Today* [Internet]. 2011;16(9–10):457–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2011.03.004>
39. Gayatri P, Dalwadi C. Recent Patents on Stimuli Responsive Hydrogel Drug Delivery System. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2013 Nov 18;7(3):206–15.
40. Vyas M, Simbo DA, Mursalin M, Mishra V, Bashary R, Khatik L. Drug Delivery Approaches for Doxorubicin in the Management of Cancers. *Curr Cancer Ther Rev*. 2020;16:1–13.
41. Hu C-MJ, Zhang L. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2017;83:1104–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.008>
42. Pospišil T. Sinteza, karakterizacija i samoudruživanje malih peptidnih gelatora temeljenih na proteinu amiloid- β . Sveučilište u Rijeci; 2017.
43. Zhao N, Woodle MC, Mixson AJ. Advances in Delivery Systems for Doxorubicin. *J Nanomed Nanotechnol*. 2018;9(5):1–9.
44. Pospišil T, Hamzić Ferhatović L, Ahmed Brkić L, Lovrić M, Gajović S, Frkanec L. Synthesis, characterization and in vitro biocompatibility assessment of a novel tripeptide hydrogelator, as a promising scaffold for tissue engineering applications. *Biomater Sci*. 2016;4(10):1412–6.
45. Radvar E, Azevedo HS. Supramolecular Peptide/Polymer Hybrid Hydrogels for Biomedical Applications. *Macromol Biosci*. 2018;19(1):1–16.
46. Reches M, Gazit E. Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Science* (80-). 2003;300(5619):625–7.
47. Gazit E. A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J*. 2002;16(1):77–83.
48. Singh V, Rai RK, Arora A, Sinha N, Thakur AK. Therapeutic implication of L-phenylalanine aggregation mechanism and its modulation by D-phenylalanine in phenylketonuria. *Sci Rep*. 2014;4:1–8.
49. Heller J, Baker RW. Theory and Practice of Controlled Drug Delivery From Bioerodible Polymers [Internet]. *Controlled Release of Bioactive Materials*.

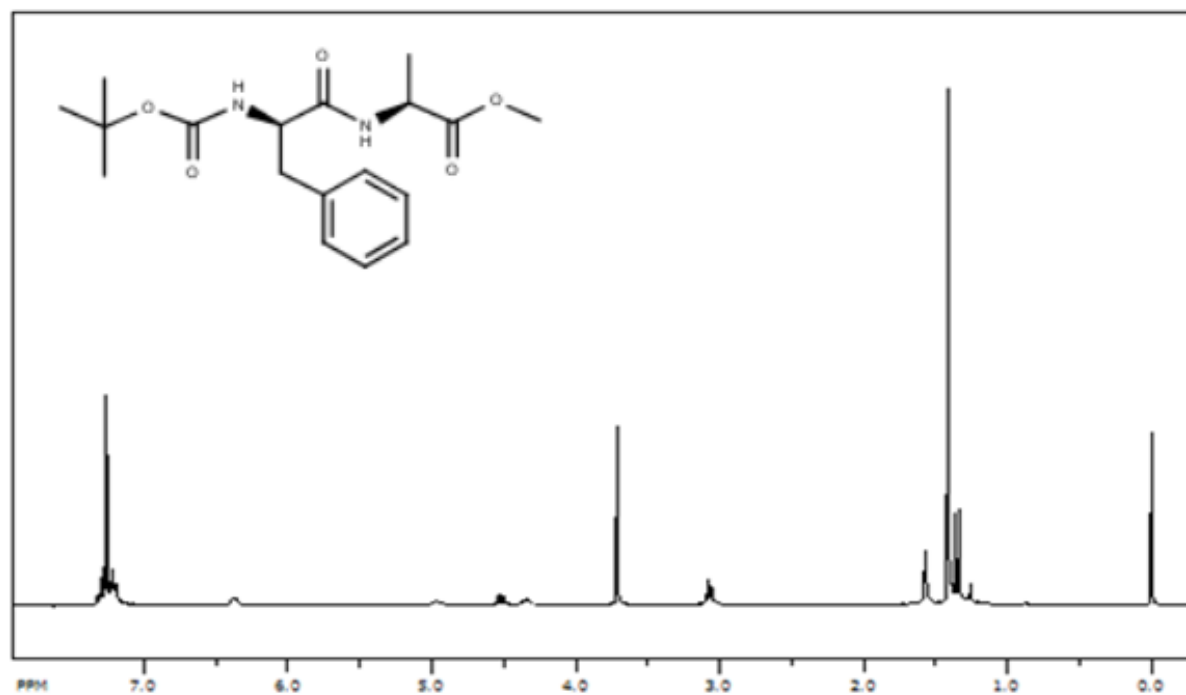
ACADEMIC PRESS, INC.; 1980. 1–17 p. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-074450-3.50005-X>

50. Škorjanc V. Kinetika otpuštanja hidroklorida 4-aminosalicilne kiseline iz biološki prihvatljivih pH-ovisnih 4-pikolilamidnih hidrogelatora male molekulske mase. Zagreb; 2019.

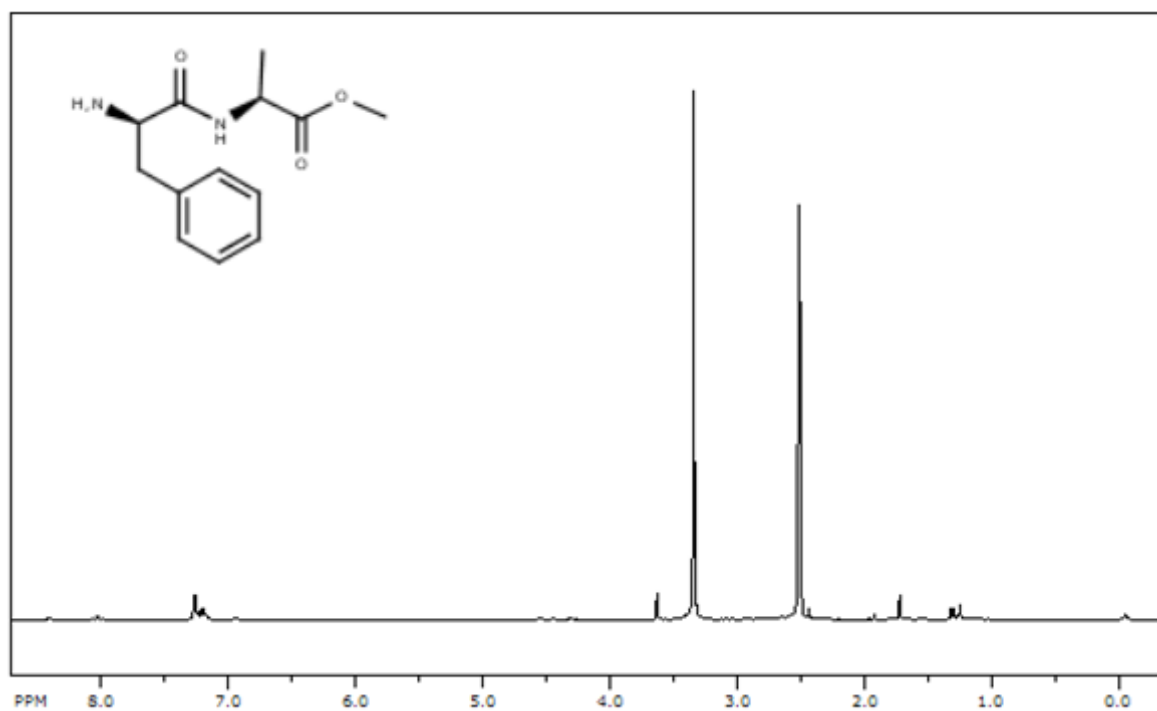
8. PRILOG – Spektri ^1H NMR spojeva



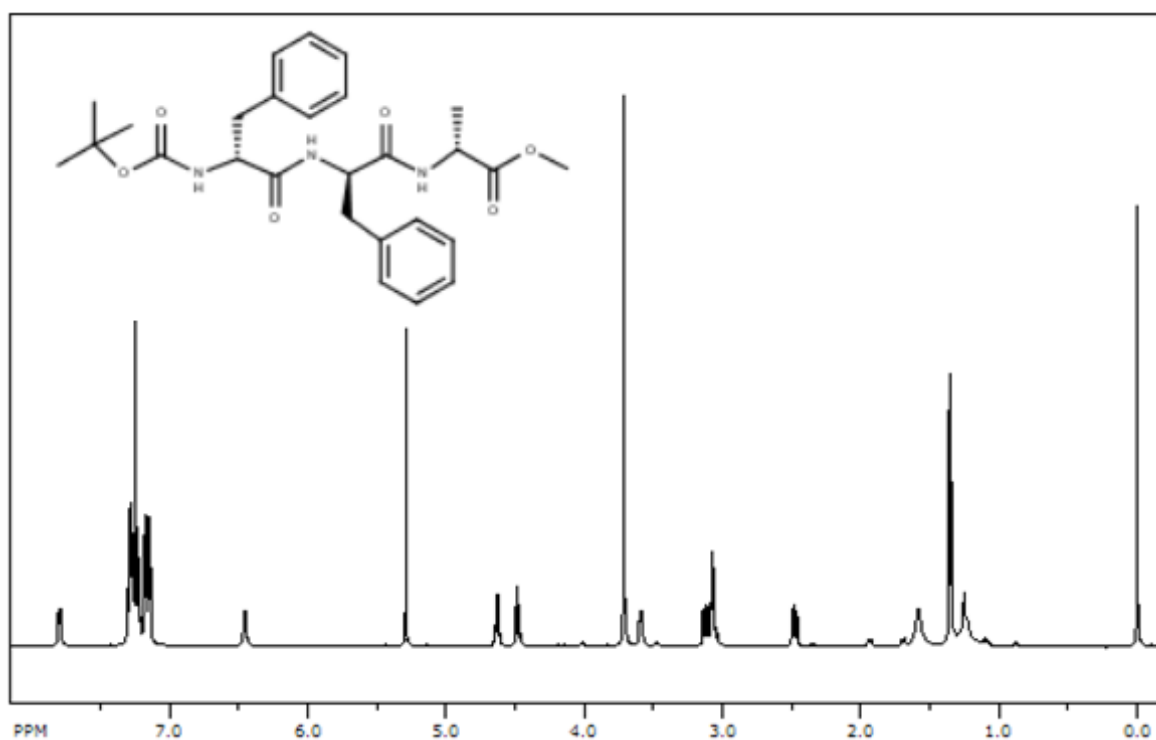
Slika 34. Spektar ^1H -NMR spoja L-AlaOMe·HCl u d_6 -DMSO na 300 MHz



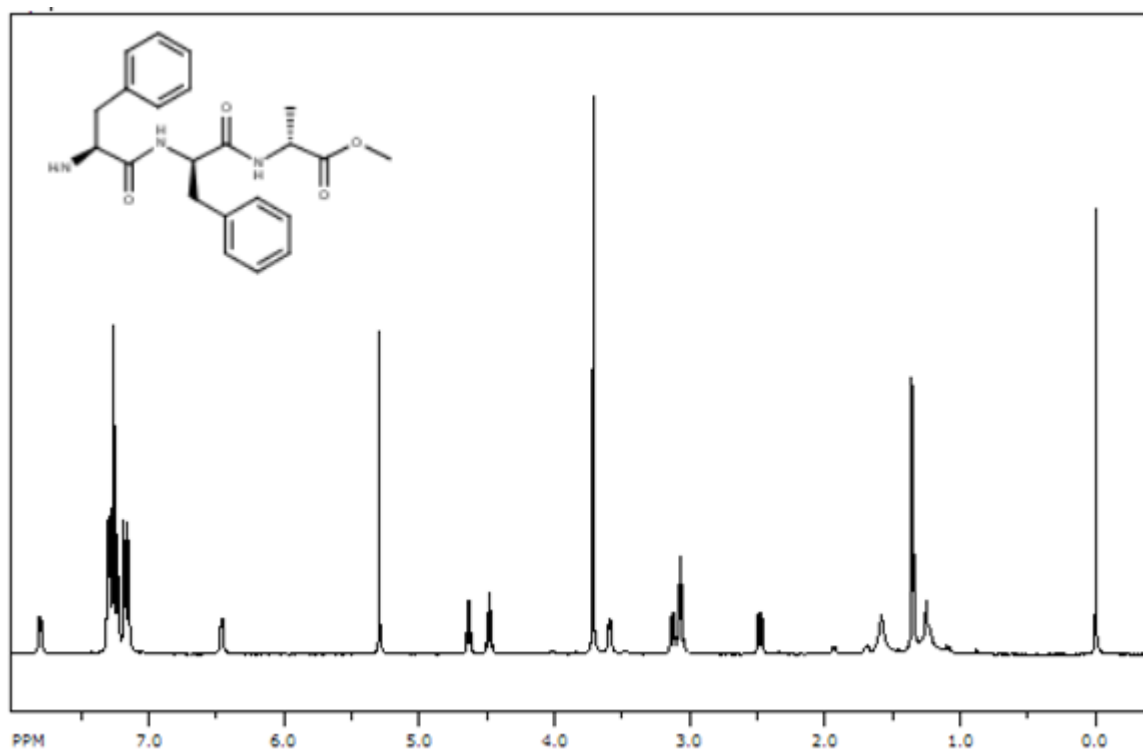
Slika 35. Spektar ^1H -NMR spoja Boc-Phe-Ala-OMe u CDCl_3 na 300 MHz



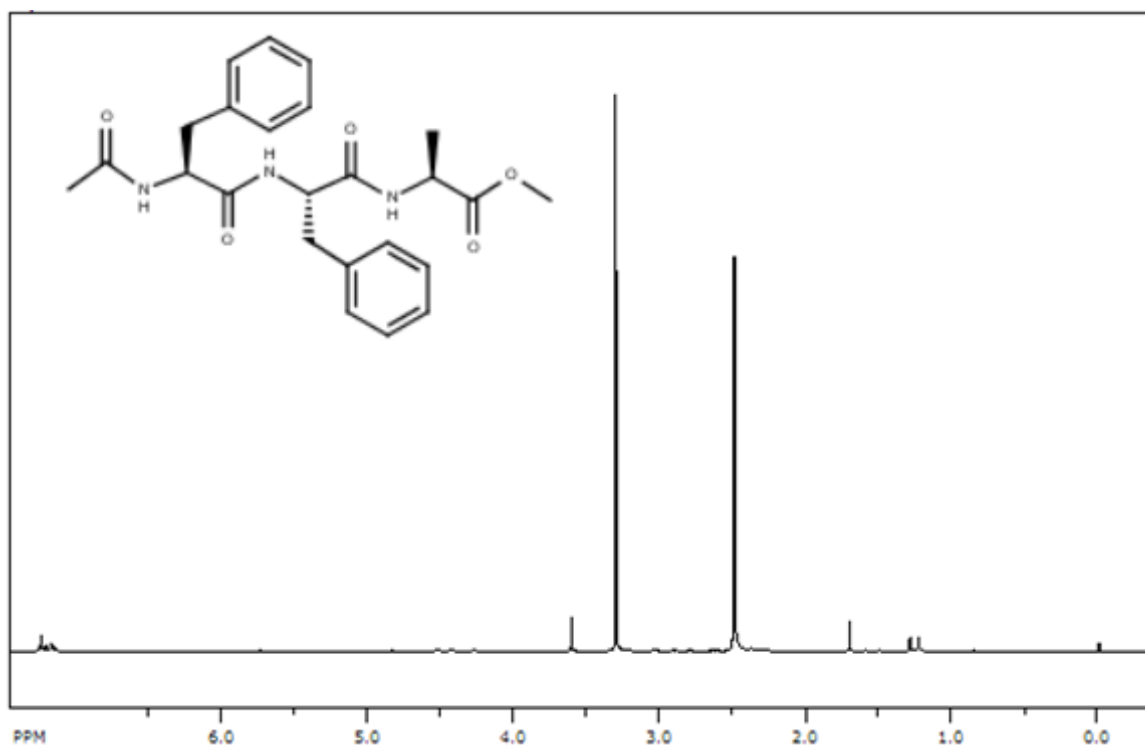
Slika 36. Spektar ^1H -NMR spoja $\text{H}_2\text{N-Phe-Ala-OMe}$ u CDCl_3 na 300 MHz



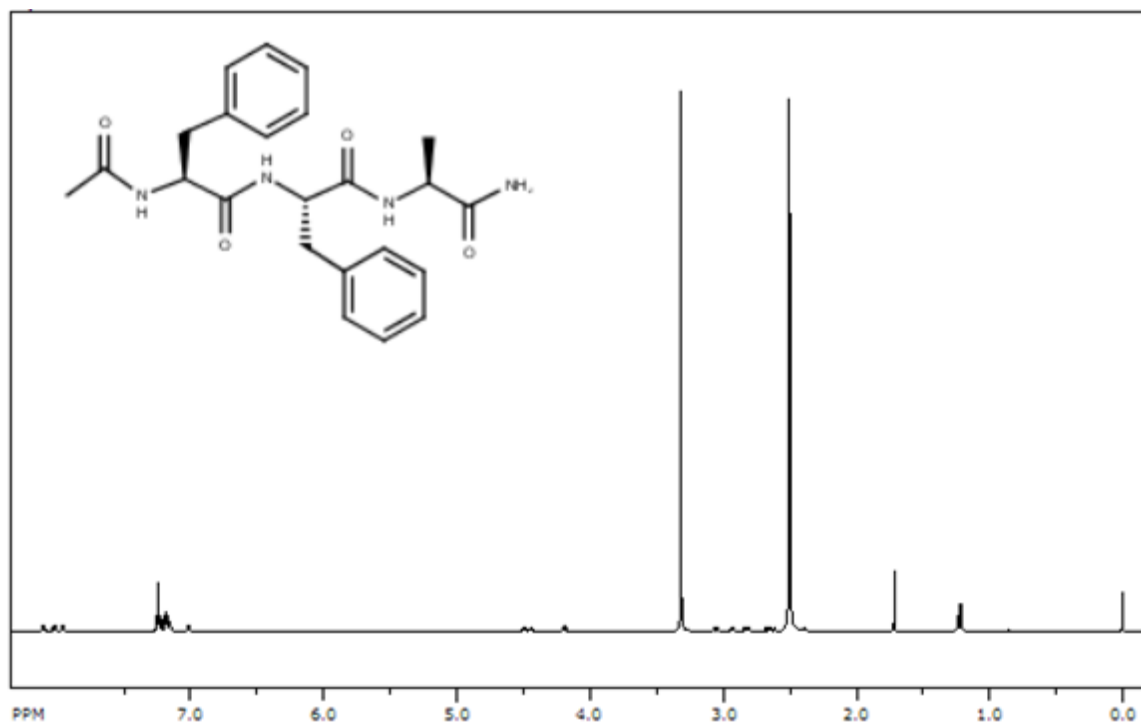
Slika 37. Spektar ^1H -NMR spoja $\text{Boc-Phe-Phe-Ala-OMe}$ u CDCl_3 na 300 MHz



Slika 38. Spektar $^1\text{H-NMR}$ spoja $\text{H}_2\text{N-Phe-Phe-Ala-OMe}$ u $\text{d}_6\text{-DMSO}$ na 300 MHz



Slika 39. Spektar $^1\text{H-NMR}$ spoja $\text{Ac-Phe-Phe-Ala-OMe}$ u $\text{d}_6\text{-DMSO}$ na 300 MHz



Slika 40. Spektar ¹H-NMR spoja Ac-Phe-Phe-Ala-NH₂ u d₆-DMSO na 300 MHz

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE Moharić Josip

📍 Nova ulica 1A, 40305 Nedelišće (Hrvatska)

☎ (+385) 99 293 0761

✉ josip.moharic@gmail.com

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2019. – danas **Diplomski studij Poslovne ekonomije - Menadžment**
Ekonomski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

2018. – danas **Diplomski studij Istraživanje i razvoj lijekova**
Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)
prosjeak ocjena 4,636

2018. – 2019. **Razlikovni program**
Ekonomski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
Završni rad: Konkurentnost na primjeru poduzeća Jadran -
galenski laboratorij d.d.

2015. – 2018. **Preddiplomski studij Biotehnologije i istraživanja
lijekova**
Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)
Prvostupnik biotehnologije i istraživanja lijekova
univ. bacc. biotechn. et pharm. inv
cum laude, prosjeak ocjena 4,480

2011. – 2015. **Srednja škola**
Graditeljska, prirodoslovna i rudarska škola, Varaždin
(Hrvatska)
Prirodoslovna gimnazija

10/2019. – 07/2020. Izrada diplomskog rada

Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju,
Laboratorij za supramolekularnu kemiju

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji
Zagreb (Hrvatska)

Tema diplomskog rada: Priprava i karakterizacija
nanokompozitnog hidrogela temeljenog na samoorganizaciji
peptida i poli(vinil-alkohola) za biomedicinsku primjenu.

Mentor: prof. dr. sc. Leo Frkanec;

Komentor: izv. prof. dr. sc. Ruža Frkanec

07/2018. – 09/2018. Erasmus praksa

Department of Materials and Production, Aalborg University,
Aalborg (Danska)

Projekt: Proizvodnja nanonosača koji prodiru u stanice
Proizvodnja polimernih nanosustava za isporuku lijekova,
njihovo liječenje stanica raka te poboljšanje njihove propusnosti
kroz krvno-moždanu barijeru.

Mentor: prof. Leonid Gurevich

06/2018. – 07/2018. Praksa

Jadran galenski laboratorij d.d., Rijeka (Hrvatska)

Odjel razvojne analitike i stabilnosti

Mentor: v. pred. dr. sc. Danijela Štanfel

2016. – 2018. Demonstrator analitičke kemije

Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

Poslovi demonstratora: priprema i provjera standardnih otopina
i reagensa, nadzor rada studenata, ispravljanje studentskih
izvještaja i koordinacija istih, priprema i izvođenje pokaznih
vježbi, kontrola i analiza rezultata.

dr. sc. Jasminka Giacometti

11/2016. – 05/2017. Instruktor kemije

Lumen poduke Rijeka, Rijeka (Hrvatska)

STIPENDIJE

2016. – 2020. Stipendija za izvrsnost Zaklade Mikec

07/2018. – 09/2018. Erasmus stipendija za stručnu praksu - Department of Materials and Production, Aalborg University, Aalborg (Danska)

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

05/2017. Kongres o kliničkoj prehrani i dijetoterapiji, Rijeka (Hrvatska)
Tema: Korisni učinci polifenola na crijevnu mikrobnu floru i njihov utjecaj na zdravlje ljudi

10/2017. International Biomedical Student Congress Rijeka, Rijeka (Hrvatska)
Tema: Caffeine and pregnancy: How much coffee is too much?

STRUČNA USAVRŠAVANJA

Tečajevi/Konferencije Osnove znanstvenog pisanja, Rijeka (2018.)
FORUM + Akademija za liderstvo i društvene projekte mladih (2017./2018.)
Konferencija budućnost i perspektiva studija, Odjel za biotehnologiju (2015., 2016., 2017.)
Konferencija Inspire me, Ekonomski fakultet u Rijeci (2016.)
Tečaj francuskog jezika, AISEC, Rijeka (2016.)

Erasmus razmjene mladih A Healthy project, 2 Mai, Rumunjska (02/09/2016 - 10/09/2016)
ADAPT Teen Healthy Relationship Programme Youth Exchange, Kilfinane i Limerick, Irska (29/08/2017 - 05/09/2017)

Članstvo u udrugama

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (2015. – danas)

OSOBNJE VJEŠTINE

Organizacijske / rukovoditeljske vještine Organiziranje nacionalne Erasmus Student Network platforme, Rijeka (2016.)

Strani jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
njemački	C2	C2	C2	C2	C2
francuski	A2	A2	A2	A2	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

Komunikacijske vještine U komunikaciji nastojim biti pristupačan, jasan i precizan. Vjerujem kako sam sudjelovanjima na „case study“ natjecanjima, projektima te kongresima i praksi razvio primjerenu znanstvenu i poslovnu komunikaciju na hrvatskom i engleskom jeziku.

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik	Samostalni i korisnik	Samostalni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

Poznavanje rada u programima Microsoft Office.

Poznavanje rada u programima računalne kemije: Chimera, PyMOL, Avogadro, MarvinSketch, VMD, Gamess, SciDAVis.

Poznavanje rada u statističkim programima: Statistica, MedCalc.

- Volontiranje** Student Day Festival, Rijeka (2018.)
Voditelj karitativnog sektora franjevačke mladeži Trsat (2017./2018.)
Demonstriranje rada u laboratoriju, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci (2017.)
Organiziranje case study natjecanja - pomoć pri provedbi (2017.)
Biljeterski poslovi za udrugu KRILA - Kreativni laboratorij suvremenog kazališta (2016./2017.)
Erasmus Student Network Rijeka (2016./2017.)
Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci - projekt Studenti mentori, Dani otvorenih vrata (2016./2017., 2017./2018., 2018./2019.)