

# Adjuvantna svojstva hidrogelova temeljenih na samoorganizaciji Phe-Phe-Ala peptida

---

**Ninković, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:004832>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj, 2023.

Marija Ninković

ADJUVANTNA SVOJSTVA  
HIDROGELOVA TEMELJENIH NA  
SAMOORGANIZACIJI  
Phe-Phe-Ala PEPTIDA

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Lidija Šver s Prehrambeno biotehnološkog fakulteta, u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji pod komentorstvom dr. sc. Ruža Frkanec, znan. sav. u tr. zvanju.

Rad je napravljen u sklopu projekta „Sinteza supramolekulskih samo-udruženih nanostruktura za izgradnju naprednih funkcionalnih materijala“ (SUPeRNANO, IP2018-01-6910) kojega financira Hrvatska zaklada za znanost. Voditelj projekta je prof. dr. sc. Leo Frkanec, Institut Ruđer Bošković.

## *Zahvala*

*Svojoj voditeljici i komentorici dr.sc. Ruži Frkanec od srca zahvaljujem na stručnom vodstvu, nesebičnoj pomoći i savjetima tijekom izvođenja i pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem na strpljenju, podršci koju sam imala u svakom trenutku te na ugodnom radnom okruženju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem i Marceli Šišić, mag. chem. na pomoći prilikom izvođenja diplomskog rada te na pomoći prilikom izrade istoga. Hvala za svaki savjet vezano za studiranje i budućnost.*

*Veliko hvala i mentorici prof. dr. sc. Lidiji Šver na znanju koje mi je prenijela na kolegijima prilikom studiranja te na preporuci za diplomski rad. Bilo je zadovoljstvo imati Vas za profesoricu.*

*Zahvaljujem i svojoj obitelji, roditeljima i braći, na bezuvjetnoj ljubavi i podršci u svakom smislu. Hvala što ste me podržavali u svakoj mojoj odluci i imali strpljenja, pogotovo prilikom studiranja.*

*Zahvaljujem i prijateljima koji su ostali uz mene i imali strpljenja za nedostatak vremena prilikom studiranja. Pružili ste utjehu kad god je trebalo i bili uz mene u lijepim i manje lijepim trenucima.*

*Hvala i Davidu na ljubavi, podršci, strpljenju i ohrabrenjima tijekom studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

## ADJUVANTNA SVOJSTVA HIDROGELOVA TEMELJENIH NA SAMOORGANIZACIJI Phe-Phe-Ala PEPTIDA

*Marija Ninković, univ. bacc. nutr. 0108079478*

### Sažetak:

Adjuvantni su komponente koje se dodaju u cjepiva s ciljem razvoja snažnog i dugotrajnog imunskog odgovora na cjepni antigen. Nastojanja za pronalaženjem učinkovitog i sigurnog adjuvanta važna su i zbog pojedinih cjepiva slabije imunogeničnosti. Razvoj nove generacije adjuvanata često uključuje različite nanomaterijale za produženo otpuštanje antigena, a koji istovremeno mogu i sami posjedovati imunostimulirajuća svojstva. Supramolekulski samoorganizirani peptidni hidrogelovi imaju veliki potencijal za primjenu u isporuci lijekova i cjepiva zbog svoje biokompatibilnosti. U okviru ovoga diplomskog rada istražena su adjuvantna svojstva supramolekulskih sustava temeljenih na samoorganiziranim hidrogelovima tripeptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>; Ac-L-Phe-L-Phe-β-Ala-OMe i Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH. Također istraženi su i nanokompoziti hidrogelatora Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> i polimera, polietilen glikola (PEG) i polivinil alkohola (PVA). U hidrogelove je ugrađen modelni antigen, ovalbumin (OVA) i ELISA testom je određena količina nastalih specifičnih imunoglobulina IgG. Izmjerene su količine nastalih imunoglobulina anti-ovalbumin IgG/IgG1/IgG2a i pokazano je da Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> značajno pojačava imunoreakciju, dok Ac-L-Phe-L-Phe-β-Ala-OMe i Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH utječu na smjer imunoreakcije.

**Ključne riječi:** adjuvant, cjepivo, imunomodulacija, supramolekulski peptidni hidrogelovi, sustav za dostavu

**Rad sadrži:** 50 stranica, 17 slika, 0 tablica, 81 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Lidija Šver

**Komentor:** dr. sc. Ruža Frkanec, znan. sav. u tr. zvanju, Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu

**Pomoć pri izradi:** Marcela Šišić, mag. chem.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Tomislav Vladušić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Lidija Šver (mentor)
3. dr. sc. Ruža Frkanec, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju (član)
4. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

**Datum obrane:** 08. veljače 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biology and Microbial Genetics**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

ADJUVANT PROPERTIES OF HYDROGELS BASED ON THE SELF-ASSEMBLY OF  
Phe-Phe-Ala PEPTIDE

*Marija Ninković, univ. bacc. nutr. 010807948*

### **Abstract:**

Adjuvants are components added to vaccines in order to develop a strong and long-lasting immune response to the vaccine antigen. Efforts to find an effective and safe adjuvant are important because of the lower immunogenicity of subunit vaccines. Development of new generation of adjuvants often includes different nanomaterials for sustained release of antigen and at the same time they may possess immunostimulating properties on their own. Supramolecular self-assembled peptide hydrogels have a great potential for applications in drug and vaccine delivery, and it has been shown that certain peptide hydrogelators can enhance and modulate the immune response. In the frame of this graduate thesis the adjuvant properties of supramolecular hydrogel based on tripeptide Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, Ac-L-Phe-L-Phe-β-Ala-OMe and Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH were tested. Nanocomposite hydrogels of Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> with poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) were also tested. A model antigen, ovalbumin, was incorporated into the hydrogels, and the amount of specific anti-ovalbumin IgG/IgG1/IgG2a immunoglobulins was determined. It was shown that Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> significantly enhances the immunoreaction, while Ac-L-Phe-L-Phe-β-Ala-OMe and Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH shift the immune response towards the Th-1 type of immune reaction.

**Keywords:** adjuvant, vaccine, immunomodulation, supramolecular self-assembled peptide hydrogels, delivery system

**Thesis contains:** 50 pages, 17 figures, 0 tables, 81 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Lidija, Šver, *PhD*

**Co-mentor:** Ruža, Frkanec, *PhD*, scientific adviser tenure, Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology, University of Zagreb

**Technical support and assistance:** *Marcela, Šišić, mag. chem.*

### **Reviewers:**

1. Tomislav Vladušić, *PhD*, Assistant (president)
2. Lidija Šver, *PhD*, Associate professor (mentor)
3. Ruža Frkanec, *PhD*, Scientific adviser tenure (member)
4. Igor Slivac, *PhD*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** February 08<sup>th</sup>, 2023



## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. Imunosni sustav.....	2
2.1.1. Tipovi imunosti.....	3
2.1.2. Imunizacija.....	4
2.1.3. Protutijela.....	4
2.2. Adjuvanti.....	7
2.2.1. Adjuvanti bakterijskog podrijetla.....	10
2.2.2. Imikvimod.....	11
2.2.3. Liposomi.....	11
2.2.4. Peptidni hidrogelovi.....	13
2.2.5. Supramolekulski peptidni hidrogelovi.....	14
2.3. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi.....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>18</b>
3.1. Materijali.....	18
3.1.1. Kemikalije.....	18
3.1.2. Enzimi i protutijela za ELISA-testove.....	19
3.1.3. Pokusne životinje.....	19
3.1.4. Puferi i otopine.....	19
3.1.5. Oprema.....	20
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Imunizacije pokusnih životinja.....	20
3.2.2. Određivanje IgG specifičnih za ovalbumin u mišjim serumima ELISA-testom.....	21

3.2.3. Određivanje IgG1 i IgG2a podrazreda IgG specifičnih za ovalbumin u mišjim serumima ELISA testom.....	22
3.2.4. Statistička obrada podataka.....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>23</b>
4.1. Učinak adjuvantskih formulacija na stvaranje anti-OVA IgG/IgG1/IgG2a.....	24
4.2. Učinak adjuvantskih formulacija na tip imunoreakcije.....	33
4.3. Hidrogelatori s dodatkom polimera.....	35
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>43</b>

# 1. UVOD

Cijepljenje je jedno od najvećih dostignuća u medicini zahvaljujući kojem su uspješno iskorijenjene ili svedene na minimum određene zarazne bolesti. Razlikujemo živa atenuirana cjepiva, inaktivirana cjepiva, podjedinčna i konjugirana cjepiva, mRNA cjepiva te cjepiva na osnovi virusnog vektora. Živi i inaktivirani cijeli organizmi strukturno su kompleksni i sadrže više epitopa, čime se može izbjeći ograničena imunogeničnost pojedinačnih antigena. S druge strane, podjedinčni i visoko pročišćeni antigeni, iako sigurniji za primjenu, mogu biti manje uspješni zbog podložnosti brzom razgradnji i nemogućnosti poticanja snažne imunoreakcije. Međutim, ovi nedostaci nastoje se nadoknaditi korištenjem adjuvanata koji pojačavaju imunogeničnost antigena i poboljšavaju humoralni i stanični imunski odgovor. Nekolicina adjuvanata odobrena je za upotrebu u cjepivima za humanu upotrebu, primjerice alum, AS03, AS04, virosomi, MF59, dok je veliki broj potencijalnih kandidata u različitim fazama eksperimentalnih i kliničkih istraživanja (Pulendran i sur., 2021).

Razvoj nove generacije adjuvanata uključuje različite biokompatibilne nanomaterijale koji omogućavaju produljeno oslobađanje antigena, a istovremeno sami mogu imati imunostimulirajuća i imunomodulacijska svojstva. Supramolekulski samoorganizirani peptidni hidrogelovi zanimljivi su zbog biokompatibilnosti, biorazgradivosti, mogućnosti ugradnje i predočavanja antigena te sposobnosti aktivacije specifičnog humoralnog i staničnog imunskog odgovora (Mondal i sur., 2020; Zichao i sur., 2016).

Cilj ovoga diplomskog rada je istražiti adjuvantnu aktivnost supramolekulskih sustava temeljenih na samoorganiziranim hidrogelovima tripeptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>; Ac-Phe-Phe-β-Ala-OMe i Ac-Phe-Phe-Ala-OH (Pospišil i sur., 2016). Također, istraženi su i nanokompoziti hidrogelatora Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> i polimera polietilen glikola (PEG) i polivinil alkohola (PVA). U hidrogelove je ugrađen modelni antigen, ovalbumin (OVA) i ELISA testom je određena količina nastalih specifičnih imunoglobulina IgG. Imunomodulacijska sposobnost priređenih adjuvantnih formulacija testirana je određivanjem količine nastalih imunoglobulina podrazreda IgG1 i IgG2a koji ukazuju na dva citokinska profila imunoreakcije, a rezultiraju kasnijim jačim razvojem stanične imunosti (Th1 citokinski profil) ili jačim razvojem humoralne imunosti (Th2 citokinski profil).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. IMUNOSNI SUSTAV

Imunosni sustav nije lokaliziran organski sustav, već ga čine limfni organi i tkiva difuzno raspršeni u tijelu. Uključuje kožu, limfu, limfne žile, limfne čvorove, tonzile, Peyerove ploče, krv, koštanu srž, slezenu, crvuljak, izolirane limfne čvoriće, timus i difuzno raspršene stanice. Neke od uloga imunskog sustava jesu: zaštita od stranih molekula (antigena), patogena i parazita, uklanjanje oštećenih i mrtvih stanica, razlikovanje vlastitih antigena od stranih antigena, integriranje i koordiniranje funkcioniranja višestaničnog organizma, prepoznavanje i uklanjanje abnormalnih stanica nastalih mutacijama ili promijenjenih uslijed izloženosti virusnim infekcijama (Abbas i sur., 2016).

Sve stanice imunskog sustava potječu iz multipotentne krvotvorne matične stanice iz koštane srži, a razlikuju se dvije grupe stanica: mijeloidne stanice i limfatičke stanice. U mijeloidne stanice ubrajaju se: dendritičke stanice, monociti i makrofagi, neutrofili, eozinofili, bazofili i trombociti, dok skupina limfatičkih stanica uključuje: limfocite T i B, prirodno ubilačke ili NK stanice (engl. *Natural Killer, NK*), urođene limfoidne stanice (engl. *Innate Lymphoid Cells, ILCs*), plazma stanice, limfoblast i dendritičke C.

Dendritičke stanice su antigen-predočne stanice (engl. *antigen-presenting cell, APC*) s obzirom da na svojoj površini predočavaju egzogene i endogene antigene, čime pomažu limfocitima u prepoznavanju antigena te potiču njihovu aktivaciju. Makrofagi su također predočne stanice koje predočavaju antigene limfocitima T, a značajni su i po tome što luče razne tvari, primjerice proupalni citokin čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$* ), interleukine IL-1, IL-6, IL-8 i IL-12, kemokine, prostaglandine, koagulacijske čimbenike, komponente komplementa (Varol i sur., 2015).

Limfociti B nastaju i sazrijevaju u koštanoj srži, a osnovna im je zadaća sinteza protutijela. Kada receptori na limfocitima B prepoznaju komplementarne antigene, započinje njihova dioba i diferencijacija, pri čemu nastanu plazma stanice i memorijske stanice. Plazma stanice sintetiziraju protutijela koja luče u krv i limfu, a memorijske stanice sudjeluju u imunskom odgovoru na sekundarnu infekciju antigenom lučeci protutijela (Margolick i sur., 2006).

Limfociti T nastaju u koštanoj srži, a sazrijevaju u timusu. Nakon sazrijevanja postaju imunokompetentni, odnosno mogu prepoznati specifični antigen te potaknuti imunski odgovor. Kada receptori na limfocitu T prepoznaju određeni antigen, započinje njegova proliferacija i

stvaranje klonova limfocita T koji mogu prepoznati taj antigen i reagirati protiv njega (Goldsby i sur., 2003). Razlikuju se pomoćnički, regulacijski i citotoksični limfociti T. Pomoćnički limfociti T (engl. *helper T lymphocyte*, Th) diferenciraju u Th1 ili Th2-tip. Usmjeravanje aktiviranog limfocita Th0 prema Th1 ili Th2 ovisi o vrsti antigena, predočnim stanicama i citokinima koje one luče. Za Th1-tip imunoreakcije svojstveno je uništavanje stanica na čijoj se površini nalaze peptidi patogena predočeni MHC molekulama skupine I, a djelovanjem T-stanica. Za navedeni tip imunoreakcije karakteristična je proizvodnja citokina interleukina IL-12, interferona IFN- $\gamma$  te protutijela IgG2a, IgG2b i IgG3 u miša. S druge strane, Th2-tipu imunoreakcije svojstvena je aktivacija B-stanica koje luče protutijela. Za navedeni tip imunoreakcije karakteristična je proizvodnja interleukina IL-4, IL-5, IL-6 te protutijela IgG1 u miša. Nadalje, citotoksični limfociti T ubijaju ciljne stanice, a regulacijski limfociti T bitni su za održavanje imunosne tolerancije te u tu svrhu izlučuju citokine koji imaju snažno imunoregulacijsko djelovanje, kao što je interleukin IL-10 koji djeluje kao imunosupresijski (inhibicijski) citokin tako što koči funkcije makrofaga i sintezu Th1-citokina, čime usmjerava imunoreakciju prema Th2-tipu.

Prirodnoubilačke, odnosno NK stanice imaju sličan mehanizam ubijanja poput citotoksičnih T-limfocita. Stanice koje su im prioritetne mete jesu one koje slabo ili uopće ne ekspimiraju molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) skupine I. Nadalje, glavni su izvor IFN- $\gamma$  te njegovim izlučivanjem mogu utjecati na stečeni imunosni sustav promičući diferencijaciju Th1 odgovora, a inhibirajući Th2 odgovor.

### 2.1.1. Tipovi imunosti

Imunitet, odnosno imunost podrazumijeva sposobnost organizma da se odupre djelovanju stranih antigena i štetnih stanica, čime se osigurava zaštita od zaraznih bolesti, ali i štiti organizam primjerice od neoplastičnih stanica koje stvaraju antigene otkrivene u većine malignih tumora ljudi. Stanice te tkiva i organi koji su odgovorni za imunost čine imunosni sustav, dok njihov usklađeni odgovor na unos stranih tvari predstavlja imunosni odgovor. Međutim, imunost se može očitovati i pojavama koje su štetne za organizam, kao što su reakcije preosjetljivosti, autoimune bolesti te odbacivanje presađenih tkiva i organa.

Razlikujemo urođenu i stečenu (adaptivnu) imunost. Filogenetski najstariji mehanizmi obrane jesu oni urođene imunosti koji se nalaze u biljkama, gljivama i životinjama, dok se specijaliziraniji obrambeni mehanizmi koji čine stečenu imunost nalaze samo u životinja i to tek u kralježnjaka. Urođena imunost, odnosno prirodna ili nativna imunost, pruža ranu liniju obrane protiv mikroorganizama, a sastoji se od staničnih i biokemijskih obrambenih mehanizama koji

postoje i prije infekcije i spremni su brzo odgovoriti na zarazu. Stečena imunost, odnosno specifična ili adaptivna imunost, razvija se kao odgovor na zarazu, a karakteriziraju je specifičnost, odnosno sposobnost razlikovanja stranih tvari te memorija, odnosno sposobnost da odgovori još snažnije na ponovljenu izloženost istom stranom antigenu. Jedinstvene sastavnice stečene imunosti jesu limfociti i njihovi izlučeni proizvodi, kao što su protutijela (Abbas i sur., 2016).

Kod adaptivnih imunskih odgovora razlikujemo humoralnu imunost te staničnu (celularnu) imunost. Humoralna imunost posredovana je protutijelima, odnosno molekulama u krvi i sekretima sluznice, a koja stvaraju limfociti B. Predstavlja glavni obrambeni mehanizam protiv izvanstaničnih mikroorganizama i njihovih toksina jer se protutijela mogu vezati za mikroorganizme i toksine te pomoći u njihovu uklanjanju, recimo procesom fagocitoze. Stanična imunost je imunost posredovana stanicama, limfocitima T, NKT i NK stanicama, a potiče uništavanje mikroorganizama koji su smješteni i razmnožavaju se unutar stanica, gdje su nedostupni cirkulirajućim protutijelima. U staničnu imunost uključeni su i makrofagi te ostale stanice koje imaju sposobnost lize stanice. Još jedno važno obilježje stečene imunosti jest imunosna memorija koja dovodi do sposobnosti boljeg i bržeg odgovora na ponovno izlaganje istim antigenima. Naime, memorijske stanice specifične za antigen učinkovitije su u reagiranju i uklanjanju antigena u odnosu na naivne stanice.

### 2.1.2. Imunizacija

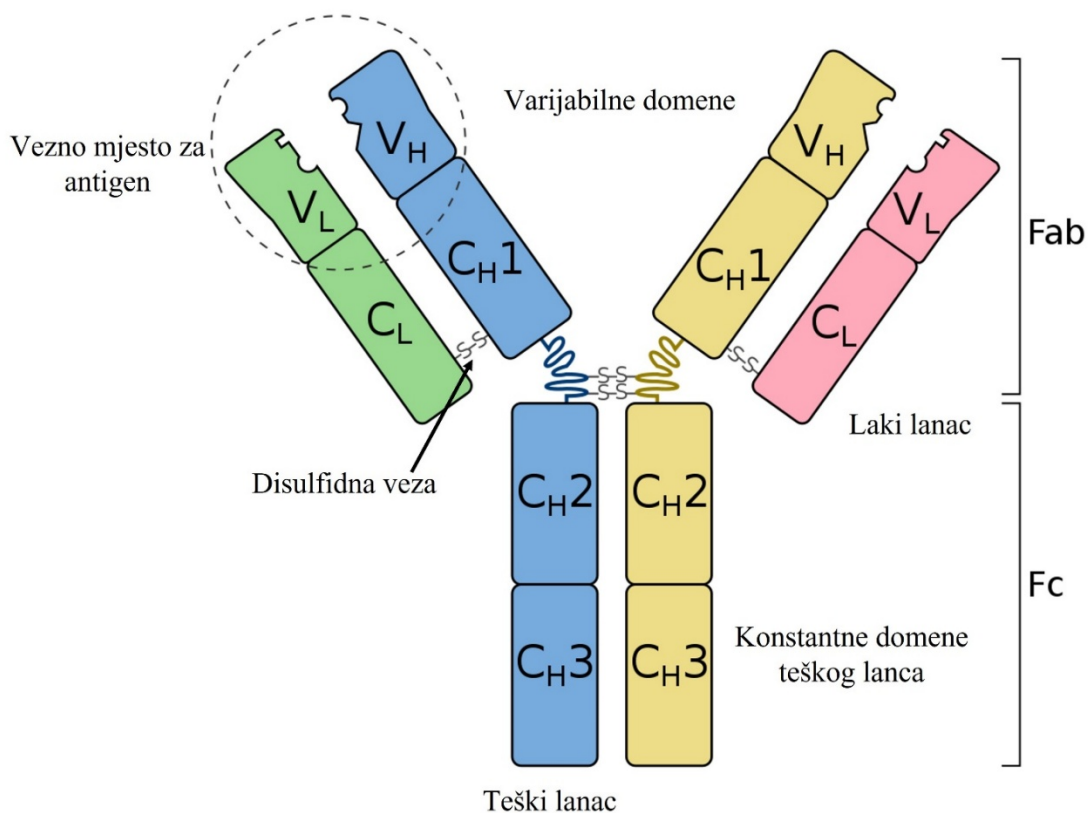
Imunitet, odnosno imunost može se postići aktivno, primjenom antigena, u obliku cjepiva ili pasivno, primjenom protutijela. Cjepiva mogu biti živa atenuirana koja uključuju virusna (primjerice rubeola i oralni polio) te bakterijska (primjerice BCG), zatim inaktivirana cjepiva koja uključuju virusna (primjerice influenza i hepatitis A), bakterijska (primjerice tifus i kuga) te toksoidne (primjerice difterija i tetanus), nadalje pojedinih cjepiva u koja ubrajamo proteinska, peptidna, polisaharidna te konjugirana cjepiva te *messenger* RNA (mRNA) cjepiva.

Cjepiva se mogu primjenjivati peroralno ili parenteralno, i to intramuskularno, supkutano ili intradermalno.

### 2.1.3. Protutijela

Protutijela, odnosno imunoglobulini su serumske molekule što ih proizvode plazma stanice, odnosno diferencirani limfociti B. Sva protutijela imaju jednaku osnovnu građu, dva laka i dva teška lanca koji su građeni od varijabilne domene i jedne ili više konstantnih domena. Lanci su međusobno povezani disulfidnim vezama, a postoji i zglobna regija koja omogućava da se

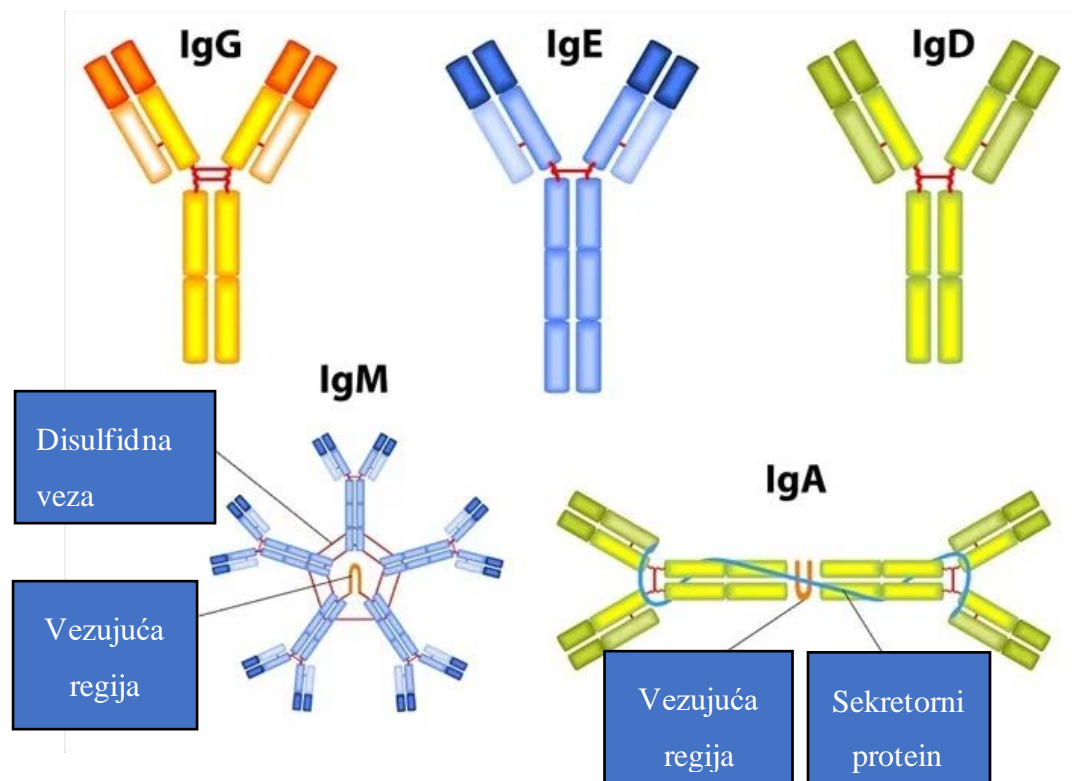
varijabilna i prva konstantna domena teškog lanca te laki lanac (ulomak za vezanje antigena, Fab prema engl. *fragment antigen binding*) pomiče neovisno o drugom Fab ulomku. Prema slijedu aminokiselina u konstantnom dijelu teškog lanca u čovjeka razlikuju se razredi protutijela (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) te lambda ( $\lambda$ ) i kapa ( $\kappa$ ) laki lanci. Bez obzira na konstantne domene lanaca protutijela se međusobno razlikuju u dijelu molekule koja se veže s antigenom (varijabilna domena lakog i teškog lanca). Općenito, protutijela su specifična za epitop, molekulski motiv, a antigeni mogu imati isti ili jako sličan epitop, zbog čega protutijela na viruse mogu uzrokovati autoimunu reakciju. Kao što je vidljivo na slici 1, molekula protutijela ima oblik slova Y. N-terminalni kraj je dio molekule kojim se protutijelo veže na antigen, a naziva se Fab ulomkom, odnosno prema engl. *fragment antigen-binding region*, a drugi dio je C-terminalni kraj putem kojeg je moguća interakcija s ostalim elementima imunskog sustava, a naziva se Fc ulomkom (engl. *fragment crystallizable region*). Osnovno svojstvo imunoglobulina je bifunkcionalnost. Dio molekule namijenjen je vezanju s antigenom, a drugi dio namijenjen je obavljanju izvršnih funkcija, odnosno interakciji s drugim stanicama imunskog sustava te topljivim komponentama, poput komplementa (Abbas i sur., 2016).



**Slika 1.** Struktura protutijela (prema Tokenzero, 2020)

Imunoglobulini su skupina glikoproteina prisutni u izvanstaničnoj tekućini, plazmi i sekretima. Na površini limfocita B funkcioniraju kao receptori za određeni antigen, a u obliku protutijela nazočni su u tjelesnim tekućinama. Osnovnu građu imunoglobulina dva istovjetna laka i dva istovjetna teška lanca koja su međusobno povezana disulfidnim vezama. Dvije su vrste lakih lanaca te je pet vrsta teških lanaca.

U većine sisavaca razlikuje se pet razreda imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD i IgE, koji se međusobno razlikuju s obzirom na veličinu molekule, električni naboj, sastav aminokiselina i sastav ugljikohidrata. Na slici 2 prikazane su strukture imunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD i IgE.



**Slika 2.** Pet razreda imunoglobulina (prema Dutta, 2018)

Od navedenih pet razreda imunoglobulina, za izradu ovoga diplomskog rada najznačajniji je IgG, najzastupljeniji imunoglobulin u ljudskome serumu, čija je koncentracija izrazito ovisna o antigenskoj stimulaciji. Čini 70 – 75% ukupnih imunoglobulina. Molekulske je mase 146 kDa. Sadrži 2 – 3 % ugljikohidrata. Humani IgG dijeli se u podrazrede: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4, dok kod miša razlikujemo IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c i IgG3 (Vidarsson i sur., 2014). Glavno je protutijelo sekundarnoga imunskog odgovora i jedino je protutijelo koje reagira s bakterijskim toksinima. Najvažnija mu je funkcija neutralizacija virusa i bakterijskih toksina, aktivacija komplementa te pospješene fagocitoze opsonizacijom.



## 2.2. ADJUVANTI

Adjuvanti su komponente koje se dodaju cjepnim antigenima za pojačavanje njihove imunogeničnosti, odnosno radi poboljšanja učinkovitosti cjepiva. Nekolicina njih odobrena je za upotrebu u cjepivima za humanu upotrebu, primjerice: aluminijske soli, MF59 (ulje u vodi emulzija, a odobren je u cjepivima protiv gripe u mnogim zemljama) i virosomi (vezikule slične liposomima koje dodatno sadrže virusne glikolipide u lipidnom dvosloju ili virusnu lipidnu ovojnica koja omogućuje fuziju sa staničnom membranom i unos DNA u stanice (Jorritsma i sur., 2016)), dok je veliki broj potencijalnih kandidata u različitim fazama eksperimentalnih i kliničkih istraživanja. Adjuvanti su značajni radi razvoja snažnog imunogenog odgovora kod pacijenata koji slabo odgovaraju na cijepljenje, kao što su imunokompromitirani pacijenti te starija i dječja populacija. Idealan adjuvant mora biti siguran i učinkovit, bez neželjenih nuspojava, lako dostupan iz jednostavih i jeftinih komponenti, biorazgradiv i kompatibilan s različitim cjepnim antigenima. Od adjuvanta se očekuje i da smanje potrebnu dozu antigena te broj iniciranja, čime bi se pojedini cijepljenje. Zasad niti jedan adjuvant ne zadovoljava sve navedene kriterije.

Postoje brojne klasifikacije adjuvanta, a jednu od njih predložio je Woodard (Woodard, 1990), prema kojoj, s obzirom na njihova fizikalna svojstva, razlikujemo:

- 1) Adjuvante koji djeluju kao surfaktanti, kao što su saponini,
- 2) Depo adjuvante, kao što su liposomi te emulzije ulja u vodi (Freund-ov adjuvant),
- 3) Adjuvante koji su topljivi u vodi, kao što su muramil dipeptid i njegovi derivati te citokini

Predloženo je pet načina na koje bi adjuvanti mogli djelovati (Awate i sur., 2013):

### 1) *Imunomodulacijsko djelovanje*

Imunomodulacija se odnosi na sve oblike manipuliranja imunim sustavom, bilo u vidu obuzdavanja prekomjerne ili neželjene imunoreakcije, bilo u vidu upostave odgovarajuće imunosne aktivnosti ako ne postoji od ranije ili poticanja nedostatne. Razlikuje se specifična i nespecifična imunostimulacija, s tim kako se specifična imunostimulacija dalje dijeli na aktivnu i pasivnu specifičnu imunostimulaciju (Abbas i sur., 2016). Primjer aktivne specifične imunostimulacije je cijepljenje, dok pasivna specifična imunostimulacija podrazumijeva unos gotovih imunosnih pripravaka, kao što su protutijela već imunizirane jedinke, u organizam druge jedinke, čime se organizmu pruža trenutna, ali prolazna zaštita. Nespecifična imunostimulacija oblik je imunosne terapije koji obuhvaća široki raspon različitih tvari koje mogu poticati razne imunosne mehanizme. Primjer takvih tvari su citokini i monoklonska protutijela.

Imunomodulacijsko djelovanje adjuvanta odnosi se na sposobnost adjuvanta da utječu na mrežu citokina i osim što pojačavaju imunosnu reakciju, mogu mijenjati njen smjer. Moderni adjuvanti moraju i pojačavati imunoreakciju, ali je i modulirati, utječući na citokine koji se luče te na diferencijaciju pomoćničkih limfocita Th0. Diferencijacija limfocita Th0 u Th1 ili Th2 zbiva se rano tijekom imunoreakcije, a utjecajem na smjer diferencijacije u Th1 ili Th2 smjer, utječe se i na izraženiju staničnu ili humoralnu imunost.

#### *2) Očuvanje konformacije antigena i poboljšanje dostave antigena*

Navedeni mehanizam odnosi se na sposobnost adjuvanta da očuva konformacijski integritet antigena i predočava ga odgovarajućim izvršnim stanicama imunosnog sustava domaćina, a nekoliko je načina kako adjuvanti postižu navedeno. Pri tome je najčešći način međudjelovanje s antigenom tako da se formiraju multimolekularni agregati koje će predočna stanica bolje fagocitirati, čime će se pojačati imunosna reakcija te će se osigurati da antigen i adjuvans stignu u istu antigen-predočnu stanicu. Adjuvanti koji posjeduju ovakvu sposobnost nazivaju se čestični adjuvanti, u koje ubrajamo aluminijske adjuvante, uljne emulzije, imunostimulirajuće komplekse, liposome, proteasome, virosome. S druge strane, postoje i nečestični adjuvanti (primjerice muramil dipeptid i njegovi derivati, saponini, lipid A) koji uglavnom djeluju kao imunomodulatori, a samo poneki postižu dobro ciljanje, odnosno imaju sposobnost dostave antigena izvršnim stanicama imunosnog sustava domaćina.

#### *3) Indukcija stanične imunosti posredovane CD8<sup>+</sup> citotoksičnim T-limfocitima*

Indukcija imunoreakcije posredovane citotoksičnim CD8<sup>+</sup> T-limfocitima zahtijeva procesiranje antigena u citosolu, u proteasomu endogenim putem te predočavanje preko molekula MHC skupine I. Za poticanje ovakve imunoreakcije adjuvant mora osigurati ugrađivanje pojedinog peptida u kompleks s MHC molekulama skupine I te njegovu postojanost u tom kompleksu.

#### *4) Stvaranje depoa antigena na mjestu iniciranja*

Adjuvanti mogu djelovati kao nosači koji zarobljavaju antigene te ih polagano otpuštaju tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Ovakav depo učinak na mjestu injekcije sprječava razgradnju antigena te produžava vrijeme za kontak s antigenom.

Aluminijske soli se najduže koriste i pokazano je da su sigurne za upotrebu i učinkovite. Koriste se u cjepivima protiv tetanusa, difterije, pertusisa, poliomijelitisa te hepatitisa A i B, a u

veterinarske svrhe koriste se u raznim cjepivima protiv bakterijskih i virusnih bolesti (Lindblad, 2004). Induciraju jak Th2-tip imunoreakcije i stvaranje IgG1 protutijela. Prednost njihove upotrebe je neškodljivost, dostupni su i nisu skupi. Međutim, nedostatak je što ne pokazuju ili pokazuju slabi adjuvantni učinak s određenim antigenima te ne aktiviraju stanični imunosni odgovor. S obzirom kako stimuliraju Th2-tip imunoreakcije, nisu adekvatan odabir u cjepivima protiv virusa i unutarstaničnih bakterija.

Lipid A predstavlja lipidnu komponentu lipopolisaharida stanične stijenke Gram-negativnih bakterija koja posjeduje adjuvantna svojstva, iznimno je toksičan te je uzrok pojave septičkog šoka, zbog čega se ne primjenjuje na ljudima (Ismaili i sur., 2002). Međutim, odstranjenjem jedne fosfatne grupe s položaja 1' nastaje 4'-monofosforil lipid A (MPL-A) koji je netoksičan, a zadržava adjuvantnu i imunostimulacijsku aktivnost, zbog čega je odobren kao adjuvant za humana cjepiva, ili sam ili u kombinaciji s emulzijom ulja u vodi, liposomima ili QS-21 (frakcija saponina u Quil-A pripravku). MPL-A je učinkoviti adjuvant koji, za razliku od aluminijevih soli, može inducirati i humoralnu i staničnu imunost te Th1- i Th2-tip imunoreakcije (Martin i sur., 2003).

Uljne emulzije pripremaju se miješanjem uljnog adjuvanta s antigen sadržavajućom vodenom fazom. Iako su se dugo koristile u raznim humanim i veterinarskim cjepivima, danas je drastično smanjena njihova uporaba zbog toksičnosti i pojava sekundarnih reakcija na mjestu injektiranja (Cox i Coulter, 1997).

CpG-motivi sadržani u bakterijskoj DNA ili sintetskim oligonukleotidima ubrajaju se u nečestične adjuvante. CpG-motivi sadrže specifične nizove od šest parova baza karakterističnog slijeda: u sredini je nemetilirani CpG-dinukleotid koji je omeđen s dva purina na 5'-kraju i dva pirimidina na 3'-kraju. Pokazano je kako CpG-oligonukleotidi stimuliraju snažan Th1-tip imunoreakcije te lučenje citokina IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-12. Potiču i stvaranje opsonizirajućih protutijela, kao što su IgG2a protutijela u miša (Weeratna i sur., 2000).

Saponini predstavljaju heterogenu grupu sterolnih i triterpenoidnih glikozida. Primjer aktivnih saponina jesu oni porijeklom iz kore drveća *Quillaja saponaria* (Dalsgaard, 1970). Djelomično pročišćena saponinska frakcija *Quillaja saponaria* sa standardnim sadržajem triterpenoidnih saponina i manjom lokalnom toksičnošću od krutih saponina je Quil A koji se često koristi kao veterinarski adjuvant, ali nije odobren za humanu primjenu jer se sastoji od nedovoljno pročišćene smjese srodnih saponina. Od 22 frakcije saponina u Quil A pripravku, njih deset posjeduje adjuvantna svojstva, a u njih spada i QS-21 odobren za humanu primjenu (Kensil i sur., 1991). QS-21 je stimulator stvaranja Th1-citokina (IL-2 i IFN- $\gamma$ ) te IgG2a podrazreda IgG u miša.

### 2.2.1. Adjuvanti bakterijskog podrijetla

#### a) *Peptidoglikan monomer*

Peptidoglikani jesu komponente stanične stijenke bakterija. Fragmenti peptidoglikana pokazuju različite biološke aktivnosti koje mogu utjecati na imunski odgovor domaćina (Seidl, 1986). Peptidoglikan monomer (PGM), porijeklom iz peptidoglikana bakterije *Brevibacterium divaricatum*, dokazan je imunomodulator i imunostimulator. Radi se o disaharid-pentapeptidu sastava: beta-D-GlcNAc-(1→4)-D-MurNAc-L-Ala-D-isoGlu-mesoA2pm-(eNH<sub>2</sub>)-D-Ala-D-Ala. Stabilna je molekula male molekulske mase, netoksična je i nepirogena komponenta (Hršak i sur., 1994).

Dosadašnja istraživanja pokazala su stimulatívno djelovanje PGM-a na proizvodnju citokina IFN- $\gamma$  i IL-4, što ukazuje kako je PGM stimulator i Th1- i Th2-immunosnog odgovora (Halassy Špoljar i sur., 2002). PGM se razgrađuje brzo djelovanjem hidrolaza te je hidroliza glavni put biotransformacija i vjerojatno jedini put biotransformacije PGM-a u sisavaca. Dokazano je i kako PGM doprinosi stvaranju dugovječne specifične memorije te ima vrlo brzo i produljeno djelovanje unatoč hidrolizi i izlučivanju odgovarajućih metabolita (Halassy i sur., 2003).

#### b) *Muramil dipeptid*

Muramil dipeptid je sintetski imunoaktivni peptid koji se sastoji od N-acetil-muraminske kiseline i dipeptida L-alanin i D-izoglutamina. Najmanja je sintetski priređena molekula peptidoglikanske strukture s adjuvantnom aktivnosti. Stimulator je nespecifične imunosti. Iako pokazuje imunostimulacijsku aktivnost, posjeduje i neželjena svojstva poput pirogenosti i somnogenosti. Kako bi se smanjili neželjeni učinci, sintetiziran je veliki broj derivata MDP koji djeluju tako što aktiviraju NF- $\kappa$ B put preko NOD2 receptora (Meshcheryakova i sur., 2007). Međutim, pokazano je kako ne stimuliraju dovoljno snažan imunski odgovor kao drugi agonisti TLR receptora pod različitim uvjetima imunizacije (Moreira i sur., 2008).

MDP djeluje kao imunomodulator tako što povećava ekspresiju površinskih markera CD11a,b,c/CD18 i CD54 neophodnih za staničnu adheziju i predočavanje antigena, čime se povećava fagocitna i antimikrobna aktivnost te se olakšava citotoksičnost posredovana protutijelima (O'Reilly i Zak, 1992). MDP inducira imunski odgovore povećanjem proizvodnje IFN- $\gamma$  i drugih citokina, stimuliranjem diferencijacije i proliferacije limfocita (Traub i sur., 2006). MDP je sam po sebi slabi imunostimulator (Yang i sur., 2001), ali multimerizacija može poboljšati vezanje receptora, a imunostimulacijsko djelovanje MDP-a može biti poboljšano ugradnjom u

liposome (Alving, 1991). Istraživanja su pokazala i kako MDP ima sinergistički učinak s lipopolisaharidima koji se nalaze u vanjskoj membrani Gram negativnih bakterija.

### 2.2.2. Imikvimod

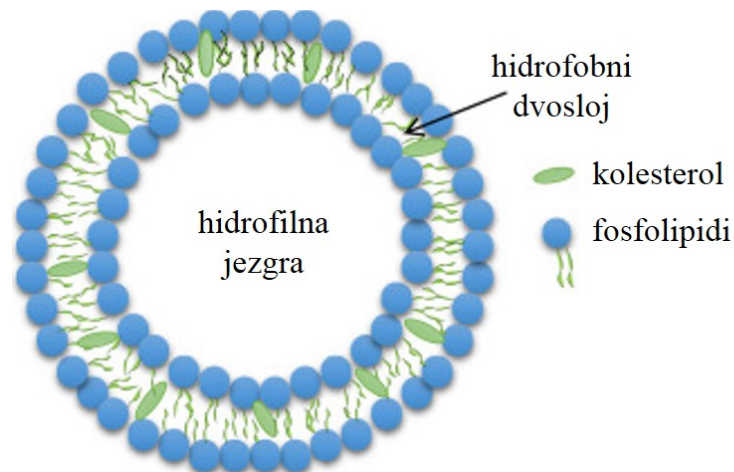
Imikvimod je nenukleozidni heterociklički amin čiji točan mehanizam djelovanja nije poznat, ali pretklinička istraživanja otkrila su kako modificira imunosni odgovor poboljšavajući i urođenu i stečenu imunost (Stanley, 2002). Najpoznatiji je predstavnik imidazokvinolina za koje je pokazano kako reguliraju imunosne odgovore kroz interakcije s *Toll-like* receptorima koji prepoznaju specifične komponente antigena (Tomai i sur., 2000). Potiče imunosne reakcije i lučenje mnogih citokina koji zauzvrat stimuliraju T-stanice (Dahl, 2002). Imikvimod ispoljava svoje djelovanje kroz TLR-7 i TLR-8 (Garland, 2003), što vodi do aktivacije signalne kaskade koja potiče translokaciju jezgrinog čimbenika NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B se potom veže za DNA te inducira ekspresiju kemokina (CCL4 i CCL2) te mnogih proupalnih citokina iz mononuklearnih stanica periferne krvi (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12) (Vidal, 2006). Nadalje, imikvimod aktivira antigen-predočne stanice, kao što su dendritičke stanice, zatim makrofage i B limfocite, čime se aktivira sustav stečene imunosti (Gupta i sur., 2002). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako imikvimod može osigurati jednostavan, siguran i efikasan način za povećanje imunogeničnosti cjepiva izazivanjem odgovarajućeg CD8<sup>+</sup> T-staničnog odgovora (Johnston i Bystry, 2006).

### 2.2.3. Liposomi

Liposomi se definiraju kao sferične vezikule sastavljene od prirodnih ili sintetskih fosfolipida organiziranih u obliku jednog ili više fosfolipidnih dvosloja koji okružuju unutarnju vodenu fazu. Na početku su se koristili kao modelne stanične membrane, a onda su se 70-ih godina 20. stoljeća počeli istraživati kao nosači lijekova.

Kao što je vidljivo na slici 3, unutar liposoma hidrofobni repovi orijentiraju se jedni prema drugima, dok se hidrofilne glave orijentiraju prema okolnom vodenom mediju. Zahvaljujući ovakvoj građi, mogu služiti kao nosači hidrofilnih lijekova koji se uklapaju u unutarnju vodenu fazu, hidrofobnih lijekova koji se ugrađuju u fosfolipidni dvosloj te amfipatskih koji će biti smješteni između lipidne i vodene faze. Zbog svoga fosfolipidnog sastava biorazgradivi su i biokompatibilni, mogu smanjiti toksičnost tvari koju prenose te joj povećati stabilnost (Kour i sur., 2018). Upravo zbog karakteristika kao što su: sličnost s biološkim membranama, netoksičnost,

biorazgradljivost, nalaze primjene u raznim terapijskim područjima, primjerice u: hormonskoj terapiji, cjepivima, tumorskoj imunologiji, imunostimulaciji (Torchilin, 2005).



**Slika 3.** Shematski prikaz liposoma (prema Nsairat i sur., 2022)

Primjenom cjepiva s liposomima poboljšavaju se farmakokinetička i farmakodinamička svojstva antigena: veća stabilnost, smanjenje potrebne doze, ciljana dostava do stanica imunskog sustava te ciljana unutarstanična dostava. Kako bi se postigla učinkovita dostava biološke tvari liposomima ili ciljana terapija pomoću liposoma, potrebno je kvantitativno zadržati biološku tvar unutar liposoma u cirkulaciji. Problem preuranjene destabilizacije liposoma može se riješiti primjerice mijenjanjem sastava lipida. Nadalje, vrijeme u cirkulaciji može se produžiti vezanjem polimera na liposome, kao što je PEG (pegilirani liposomi). Pojedine primjene bioloških tvari mogu zahtijevati aktivan sustav dostave koji specifično cilja određeni tip stanice ili pojedino tkivo te većina aktivnih sustava dostave liposomima koristi ligande kemijski vezane na površinu liposoma. Lipidni sastav liposoma te način pripreme određuju bitne fizikalno-kemijske karakteristike vezikula, kao što su: veličina čestica, fluidnost membrane, hidrofobnost te površinski naboj. Nadalje, liposomi mogu utjecati na jačinu i smjer imunskog odgovora na cjepni antigen (Schwendener, 2014). Zahvaljujući svestranosti liposoma moguće je ugraditi sve vrste imunostimulatora u istu disperziju liposoma. Lipidi i hidrofobne molekule mogu se ugraditi u lipidni dvosloj dodavanjem otopljenih lipida prije formiranja suhog filma. Peptidi, proteini i nukleotidi mogu se elektrostatski adsorbirati na suprotno nabijene lipide na površini liposoma. Peptidi i proteini mogu se i inkapsulirati u vodenu unutrašnjost liposoma. Nukleotidi se mogu kompleksirati s kationskim lipidima ugrađenima između više lipidnih dvosloja. Nadalje, vezanje proteina i peptida na formirane liposome može se postići kovalentnom konjugacijom.

U posljednjih 20-ak godina od cjepiva odobrenih za primjenu na ljudima u kojima su sadržani adjuvanti na bazi liposoma, odobren je primjerice Epaxal kojim se prevenira hepatitis A.

Nadalje, u liposomima je često korišten imunostimulator monofosforil lipid A, odnosno MPL-A, odobren za upotrebu na ljudima.

#### 2.2.4. Peptidni hidrogelovi

Peptidni hidrogelovi zbog visokog sadržaja vode, podesive mehaničke stabilnosti i velike biokompatibilnosti pružaju razne mogućnosti primjene u biomedicini, kao što su dostava lijekova, zarastanje rana i tkivno inženjerstvo. Obično imaju trodimenzionalne vlaknaste mreže koje su umrežene fizikalnim ili kemijskim vezama. Velika je prednost što je moguće modificirati bočni lanac ili ugraditi okosnicu radi realizacije specifičnih aplikacija (Du i sur., 2015).

Hidrogelovi se mogu podijeliti na dvije grupe peptidnih materijala: kationske lizinske ili argininske materijale te anionske aspartatne i glutamatne materijale. Negativno nabijeni hidrogelovi ne čine se imunogenima te ne izazivaju upalu nakon implantacije, što je i prije uočeno u peptidima koji sadržavaju glutamat (Wen i sur., 2016).

Za izradu robusnih peptidnih hidrogelova najčešće se primjenjuju metode spontane hidrogelacije, enzimski kontrolirane hidrogelacije te umrežavanjem poboljšano hidrogeliranje.

Peptidi, sastavljeni od različitih aminokiselina, mogu se samosastaviti u vlaknaste hidrogelove djelovanjem hidrofobnih interakcija, elektrostatskih interakcija, vodikovih veza i  $\pi$ - $\pi$ -slaganja. Vlakna unutar hidrogelova često imaju nekoliko karakteristika sekundarne strukture, uključujući  $\beta$ -ploču i  $\alpha$ -zavoju, na koje utječu kinetički čimbenici, kao što su naboj, ioni i otapalo. Difenilalanin primjer je jednostavnog peptida koji se može samostalno organizirati u hidrogel, a čvrstoća takvog hidrogela može se podesiti promjenom koncentracije peptida (Reches i Gazit, 2006). Peptidni hidrogelovi proučavaju se radi mogućnosti različitih biomedicinskih primjena (Moore i Hartgerink, 2017), kao što su:

##### 1) Dostava lijekova i proteina

Mnoge antikancerogene lijekove, kao što su taksol ili doksorubicin, karakteriziraju određeni nedostaci, kao što su sistemsko, neselektivno djelovanje, slaba topljivost, niska bioraspodivnost te laka razgradljivost u fiziološkim uvjetima. S druge strane, korištenjem biokompatibilnih nosača lijekova mogle bi se dostaviti bitne komponente u svrhu liječenja tumora. Pored korištenja nanočestica, polimernih micela i polimernih hidrogelova, samoorganizirajući peptidni nanomaterijali od velikog su interesa zbog manjih troškova, mogućnosti masovne proizvodnje te relativno visoke stabilnosti i aktivnosti.

##### 2) Zaccjeljivanje rana

Određeni hidrogelovi pokazuju antibakterijsko djelovanje, a sastavljeni su od peptida s inherentnim antibakterijskim djelovanjem, a veliku primjenu imaju u previjanju rana. Međutim, većina antimikrobnih peptida nije stabilna u vodenoj otopini te se nisu u stanju samostalno sastaviti u dobro definirane nanostrukture radi formiranja hidrogela. Enzimatski kontrolirano hidrogeliranje poboljšava umrežavanje malih peptidnih agregata, čime je onda omogućena adekvatna proizvodnja antibakterijskih hidrogelova.

### 3) Tkivno inženjerstvo

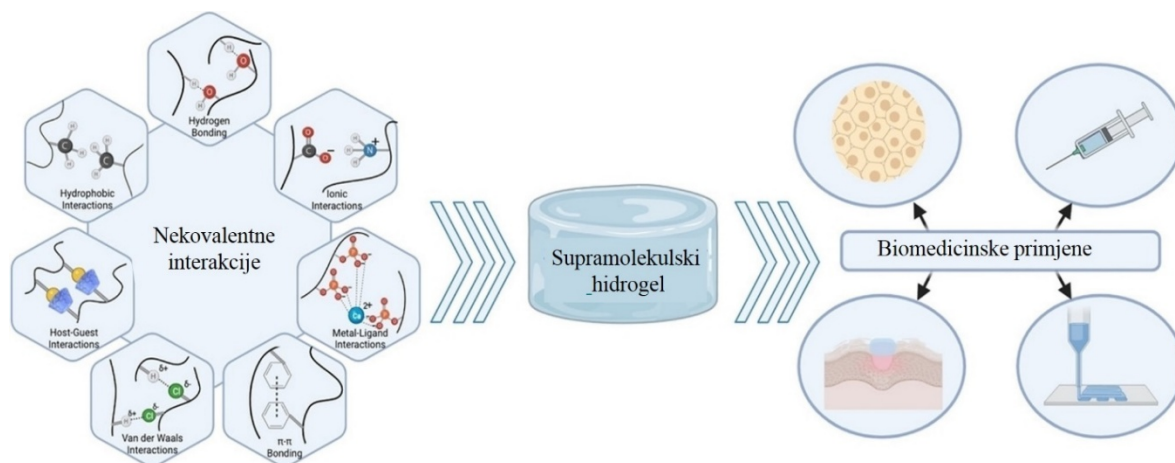
Uzimajući u obzir biokompatibilnost peptidnih hidrogelova i njihovu strukturnu sličnost ljudskom tkivu u pogledu značajnog postotka vode, tkivno inženjerstvo nametnulo se je kao jedno od najatraktivnijih primjena hidrogelova na bazi peptida. Peptidni hidrogelovi prikladni su za brojne kulture staničnih linija te su sposobni promovirati adheziju stanica, podjelu stanica, migraciju i vaskularizaciju.

#### 2.2.5. Supramolekulski peptidni hidrogelovi

Supramolekulski peptidni hidrogelovi nastaju nekovalentnim umrežavanjem u vodenim otapalima djelovanjem slabih nekovalentnih veza: hidrofobnim interakcijama, vodikovim vezama, i van der Waalsovima interakcijama (Hartgerink i sur., 2002).

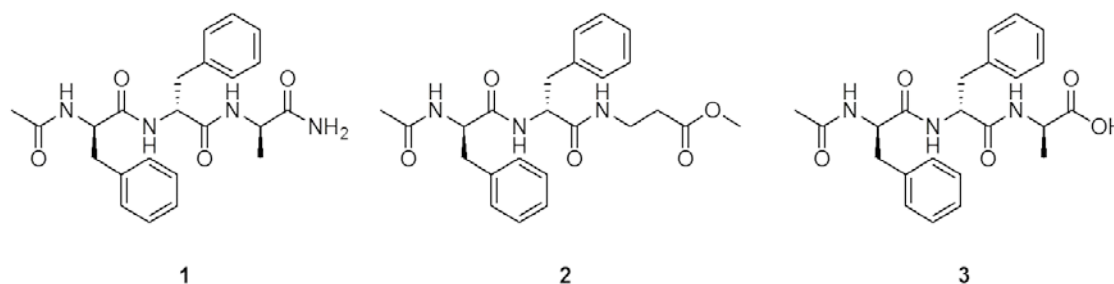
Bilo koja kemijska modifikacija može utjecati na kemijska i fizikalna svojstva hidrogelova, a isto tako mogu utjecati i različiti vanjski podražaji, primjerice promjena pH ili temperature te izloženost UV-zračenju (Branco i sur., 2009). Tako je primjerice topljivost temeljena na polarnim bočnim lancima kiselih i bazičnih aminokiselina određena stupnjem disocijacije, svojstvom koje je ovisno o pH i ionskoj jakosti (Fletcher i sur., 2011). Zbog toga se proces samoorganizacije nabijenih peptida može olakšati prilagodbom pH ili dodavanjem soli za smanjenje elektrostatskih odbijanja i poticanje agregacije. Shema nastajanja supramolekulskog peptidnog hidrogela, kao i moguće biomedicinske primjene, primjerice tkivno inženjerstvo, dostava bioloških tvari, uključujući antigene, potom zacjeljivanje rana i *bioprinting* prikazane su na slici 4 (Omar i sur., 2022).





**Slika 4.** Shema nastajanja hidrogela i moguće biomedicinske primjene (prema Omar i sur., 2022)

U ovome radu testirani su supramolekulski sustavi temeljeni na samoorganiziranim hidrogelovima tripeptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>; Ac-Phe-Phe-β-Ala-OMe i Ac-Phe-Phe-Ala-COOH, a strukture navedena tri tripeptida prikazane su na slici 5. Opisani tripeptidi pripremlju se jednostavno iz jeftinih polaznih aminokiselina u velikim količinama, bilo sintezom u otopini ili sintezom peptida na čvrstoj fazi, dok se hidrogel može jednostavno pripremiti postupkom grijanja-hlađenja. Nastali hidrogel je tiksotropan, što znači kako se mehaničkim potresanjem struktura gela narušava, a stajanjem se gel ponovo formira. Tiksotropna svojstva omogućavaju ugradnju različitih vrsta antigena putem miješanja vorteksom ili laganim miješanjem.



**Slika 5.** Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> (1); Ac-L-Phe-L-Phe-β-Ala-OMe (2); Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH (3)

### 2.3. ENZIMSKI IMUNOTEST NA ČVRSTOJ FAZI

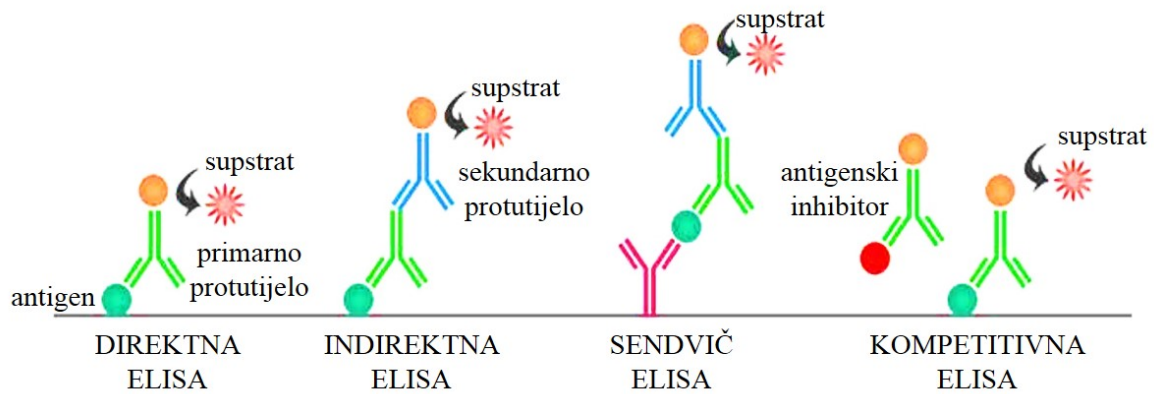
ELISA test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), odnosno enzimski imunotest jedna je od metoda za kvalitativno i semikvantitativno određivanje protutijela ili antigena (Tijssen,

1985). Metoda je razvijena sredinom 60-tih godina 20. stoljeća u svrhu identifikacije antigena u histološkim preparatima, analogno imunofluorescencijskim metodama te za identifikaciju precipitacijskih linija dobivenih imunodifuzijom i imunoelektroforezom. Provodi se u svrhu detekcije i kvantifikacije ciljnih molekula u različitim uzorcima, uključujući serum, plazmu, urin, slinu, ekstrakte stanica ili tkiva. Glavne prednosti ELISA testa jesu: visoka specifičnost metode, osjetljivost, reproducibilnost, jednostavnost, nepostojanje radijacije kao kod radioimunotestova, mogućnost usporedbe s poznatim standardom, prisutnost sve većeg broja gotovih kompleta na tržištu. Međutim, obzirom kako se kvantifikacija temelji na reakciji enzim-supstrat, vremenski okvir za detekciju je vrlo kratak. Nadalje, ELISA testom moguće je samo dobiti informaciju o prisutnosti ili količini ciljne molekule, dok se primjerice informacije o aktivnosti određene molekule ne mogu dobiti ovom metodom. ELISA test temelji se na tvorbi kompleksa antigen-protutijelo, pri čemu su protutijela ili antigeni, ovisno o tipu ELISA-testa, obilježeni enzimima. Nazočnost imunokompleksa dokazuje se biokemijski dodavanjem supstrata koji u prisutnosti enzima mijenja boju. Za ELISA-test važni su raznolikost protutijela te visoka katalitička moć i specifičnost enzima čija se aktivnost lako detektira. Metoda se izvodi na čvrstoj fazi, kao što su podloga od stakla, plastike ili nitrocelulozna membrana.

Enzimi koji se koriste u testu trebali bi imati nisku  $K_m$  vrijednost, odnosno Michaelis-Menten konstantu za supstrat, a visoku za produkt i visoku  $K_i$ . Nadalje, moraju biti stabilni, bilo u slobodnom, bilo u konjugiranom obliku. Morali bi zadovoljiti kriterije čistoće i lakoće preparacije. Trebali bi biti jeftini te bi im se lako trebala detektirati aktivnost. Trebali bi biti kompatibilni uvjetima pri kojima se izvodi test, kao što su pH-vrijednost, ionska jakost te sadržaj pufera. Navedene poželjne karakteristike utječu na česti izbor peroksidaze iz hrena, *Armoracia rusticana*. Peroksidaza je oksidoreduktaza koja katalizira redukciju vodikova peroksida, pri čemu nastaju dvije molekule vode, a oksidira se supstrat, pri čemu dolazi do promjene boje. Peroksidaza je vrlo osjetljiva na onečišćenja, prisutnost bakterija, bakteriostatskih agenasa. Može se inaktivirati kisikom, hipokloritnom kiselinom te aromatskim ugljikovodicima. Pored peroksidaze, upotrebljavaju se i  $\beta$ -galaktozidaza te alkalna fosfataza.

Od supstrata koji se oksidiraju, mogu se koristiti se *o*-dianisidin, *o*-tolidin ili *o*-fenilendiamin. *o*-fenilendiamin (OPD) pogodan je donor elektrona čija je oksidirana forma, 2,3-diaminofenazin, narančaste boje te se može mjeriti pri 445 nm ili 492 nm, ovisno o pH-vrijednosti. Sam OPD je bezbojan, a mora se čuvati na hladnom u tami jer je fotosenzitivan. Kod rukovanja njime treba obratiti pozornost na mutagenost OPD-a.

Svaki tip enzim-imunotesta može se koristiti za detekciju i kvantifikaciju protutijela ili antigena pomoću standardne krivulje načinjene s poznatim koncentracijama protutijela ili antigena, a izbor metode ovisi o prirodi početnog materijala te o tipu rezultata. Postoji više protokola za izvođenje ELISA-testa na čvrstoj podlozi, ovisno o tome što se želi detektirati i o dostupnim reagensima. Na slici 6 prikazana je shema četiri tipa ELISA-testa.



**Slika 6.** Tipovi ELISA testa (prema PraxiLabs, 2021)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

- ovalbumin iz bjelanjka jajeta (Serva, Heidelberg, DE)
- 
- kalijev klorid (KCl)
  - kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
  - limunska kiselina monohidrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{XH}_2\text{O}$ )
  - natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
  - natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Kemika, Zagreb, HR)
  - natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
  - natrijev klorid (NaCl)
  - sulfatna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
  - 30 %-tni vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- 
- *orto*-fenilendiamin dihidroklorid (OPD)
  - Tween 20, muramil dipeptid (MDP)
  - kolesterol iz svinjske jetre
  - albumin iz goveđeg seruma (BSA) (Sigma, St. Louis, Mo, SAD)
  - polietilen glikol (PEG,  $M_r=4000$  g/mol)
  - polivinil alkohol (PVA,  $M_r=89000-98000$  g/mol)
- 
- timerosal (Fluka AG, Buch, Švicarska)
  - imikvimod (InvivoGen, Inc., San Diego, CA, SAD)
  - jajčani L- $\alpha$ -fosfatidilkolin (Avanti Polar Lipids, SAD)
  - peptidoglikan monomer (PGM) je pripravljen u Plivi prema prethodno opisanom postupku (Keglević i sur., 1979)
  - Peptidni hidrogelatori su sintetizirani prema ranije opisanom postupku (Pospišil i sur., 2016).

### 3.1.2. Enzimi i protutijela za ELISA-testove

- kozja protutijela razreda IgG konjugirana peroksidazom iz hrena specifična za cijelu molekulu mišjeg IgG (anti<sub>m</sub>-IgG-HRP, Sigma, St. Louis, Mo, SAD)
- monoklonsko protutijelo specifično za mišji imunoglobulin IgG1 iz štakora konjugirano s biotinom (biotin-<sub>m</sub>anti-IgG1, BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD)
- streptavidin konjugiran peroksidazom iz hrena (streptavidin-HRP, Sigma, St. Louis, Mo, SAD)
- monoklonsko protutijelo specifično za mišji imunoglobulin IgG2a iz štakora konjugirano s biotinom (biotin-<sub>m</sub>anti IgG2a, BD Pharmingen; San Diego, CA, SAD).

### 3.1.3. Pokusne životinje

Biološki pokusi su provedeni u Odsjeku za uzgoj pokusnih životinja Imunološkog zavoda, na miševima koji se i inače primarno koriste u istraživanjima iz područja imunologije, s obzirom kako je dostupan veliki broj različitih srodnih sojeva, a na tržištu postoje reagensi za analizu specifične imunoreakcije. Korišteni su miševi soja NIH/OlaHsd, ženke stare 2 – 2,5 mjeseca iz vlastitog uzgoja. Hrana i voda im je bila ponuđena na volju. Testiranja su provedena u skladu s hrvatskim Zakonom o dobrobiti životinja (NN 102/2017), koji je u skladu s EC Direktivom (2010/63/EU).

### 3.1.4. Pufferi i otopine

- PBST (pufer za ispiranje), pH= 7,4:
  - 16,0 g NaCl
  - 2,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 0,4 g KCl
  - 0,2 g timerosala
  - 1,0 mL Tween 20
  - Nadopuniti destiliranom vodom do 2 L.
- inkubacijski pufer (0,5 % BSA u PBST-u), pH= 9,77:
  - 2,5 g BSA u 500 mL PBST-a
- karbonatni pufer (pufer za oblaganje; pH= 9,6) u 100 mL vode:
  - 167,5 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
  - 288,3 mg NaHCO<sub>3</sub>

- citrat-fosfatni pufer (pH= 5,0) u 100 mL vode:

1,03 g limunske kiseline

1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### 3.1.5. Oprema

- mikrotitracijske pločice (Costar, Assay Plate, 96 Well Clear, Flat Bottom, High Binding, No Lid, Polystyrene)
- spektrofotometar za mikrotitracijske pločice READER 530 (Organon Teknika B.V., Boxtel, Nizozemska)
- CO<sub>2</sub> inkubator (Mettler, Njemačka)
- centrifuga 5810R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- analitička vaga AT261 (Mettler Toledo, Zürich, CH)
- analitička vaga, XSR205 (Mettler Toledo, Zürich, CH)
- pH-metar, Seven Easy (Mettler Toledo, Zürich, CH)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Imunizacije pokusnih životinja

Miševi su podijeljeni u skupine po pet životinja i imunizirani potkožno u bazu repa s 0,1 mL imunizacijske otopine. Količina injektiranog antigena iznosila je 10 µg, dok je količina adjuvanata iznosila 400 µg lipida (fosfatidilkolin i kolesterol u molarnom omjeru 7:5), 200 µg hidrogelatora, 200 µg PVA, 200 µg PEG, 200 µg PGM, 75 µg (0,15 µmol) MDP i 36 µg (0,15 µmol) imikvimoda. Imunizacijske otopine s antigenom u liposomima, uz dodatak PGM-a, MDP-a i imikvimoda su pripravljene prema ranije opisanim postupcima (Habjanec i sur., 2006.). Antigen je inkorporiran u hidrogelove i nanokompozite na način da je nakon formiranja gela prema ranije opisanom postupku (Pospišil i sur., 2016.) hidrogel razrijeđen otopinom ovalbumina u fiziološkoj otopini, odgovarajuće koncentracije kako bi svaka eksperimentalna životinja dobila točnu količinu hidrogela i antigena.

Nakon primoimunizacije dva puta su docijepljeni u razmaku od 28 dana. Miševi su krvareni 7 dana nakon drugog docjepljivanja iz potpazušnog spleta krvnih žila nakon anestezije smjesom anestetika ketamina (Ketamidol Richter Pharma, 10 %) i ksilazina (Xylased Bio, 20mg/mL, Bioveta). Prikupljene krvi ostavljene su pola sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je koagulum odvojen od seruma centrifugiranjem 45 minuta na 3200 × g na sobnoj temperaturi. Nakon toga

serumi su inkubirani pola sata na 56 °C radi inaktivacije komplementa, a do analize serumi su pohranjeni na -20 °C.

### 3.2.2. Određivanje IgG specifičnih za ovalbumin u mišjim serumima ELISA-testom

U našim istraživanjima prethodno je razvijen i opisan *in vivo* test za istraživanje adjuvantne aktivnosti u mišu uz ovalbumin (Habjanec i sur., 2006) koji je korišten kao modelni antigen u skladu s preporukama za adjuvantno testiranje (Stewart-Tull, 1989), s obzirom kako je slabo imunogeničan, dobro definiran i komercijalno dostupan. Količine antigena OVA i pojedinih adjuvanata kao i put administriranja, prethodno je istraženo te su korišteni optimalni eksperimentalni uvjeti. S obzirom kako su komercijalno dostupna primarna mišja anti-ovalbuminska protutijela, kao i sekundarna enzimom obilježena anti-mišja protutijela razvijen je ELISA test za određivanje ukupnih imunoglobulina IgG te specifičnih podrazreda imunoglobulina IgG1 i IgG2a, koji su specifični indikatori tipa imunosnog odgovora, Th1 i Th2.

Mikrotitracijske pločice ravnoga dna s 96 jažica (Flat bottom, high binding, Costar, Cambridge, SAD) obložene su otopinom ovalbumina masene koncentracije 1,5 mg/mL u puferu za oblaganje, odnosno u karbonatnom puferu pH-vrijednosti 9,6 (100 µL po jažici) te su inkubirane preko noći na sobnoj temperaturi. Sljedećeg dana nakon ispiranja pločica PBST-om (ispiranje tri puta s po 200 µL PBST-a po jažici), slobodna preostala mjesta u jažicama blokirana su 0,5 %-tnom otopinom BSA (w/v) u PBST-u (200 µL po jažici) 2 sata na 37 °C, nakon čega su pločice ponovno isprane tri puta s 200 µL PBST-a po jažici. Serumi imuniziranih miševa analizirani su u više razrjeđenja pripremljenih u inkubacijskom puferu. Naneseno je 100 µL pripremljenih razrjeđenja po jažici, svaki uzorak u duplikatu te je slijedila inkubacija preko noći na sobnoj temperaturi. Potom su pločice isprane tri puta s 200 µL PBST-a po jažici te su obložene pripremljenom otopinom protumišji IgG-HRP i inkubirane dva sata na 37 °C. Otopina konjugata, kozji-protumišji IgG-HRP, pripravi se tako da se prvo pripremi 1:2 razrjeđenje s glicerolom, a zatim se pripravi razrjeđenje 1:4000 s inkubacijskim puferom. Nakon ispiranja tri puta s 200 µL PBST-a po jažici, u mikrotitracijske pločice dodana je pripravljena otopina OPD-a (0,6 mg/mL, 100 µL po jažici) i inkubirane su u tami pola sata na sobnoj temperaturi. Neposredno prije nanošenja na pločicu, otopini OPD-a dodaje se 30 %-tni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzimska reakcija zaustavljena je dodatkom 12,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 µL/jažici i izmjerena je apsorbancija na 492 nm.

Spektrofotometrijski su analizirani serumi eksperimentalnih životinja, nakon dodatka OPD, pri A<sub>492nm</sub>. Na osnovu izmjerene apsorbancije za svaki pojedini serum, napravljeno je pet razrjeđenja seruma u duplikatu te isto toliko razrjeđenja standarda, a razrjeđenja su odabrana

specifično za svaki pojedini uzorak. Pripravljena razrjeđenja analizirana su u sljedećim ELISA testovima, a pomoću testa paralelnih pravaca analizirani su rezultati, te na osnovu poznatih jedinica pripisanih standardima, izračunate su količine prisutnih specifičnih protutijela izražene u proizvoljnim jedinicama u mililitru (PJ/mL; engl. *arbitrary unit*, AU/mL). Kao standard je korišten pripravak mišjeg monoklonskog protutijela (anti-OVA) kojemu je dogovorno pripisana vrijednost 20 000 AU/mL.

### 3.2.3. Određivanje IgG1 i IgG2a podrazreda IgG specifičnih za ovalbumin u mišjim serumima ELISA testom

ELISA testovi za određivanje IgG1 i IgG2a podrazreda IgG specifičnih za ovalbumin identični su u svim koracima kao i kod određivanja IgG, osim u koraku u kojem se nanose biotin-<sub>m</sub>anti-IgG1, odnosno biotin-<sub>m</sub>anti-IgG2a. Prva tri koraka u ELISA testu, oblaganje pločica otopinom ovalbumina, blokiranje 0,5%-tnom otopinom BSA (w/v) u PBST-u te nanošenje pripremljenih razrjeđenja seruma u inkubacijskom puferu, izvođena su prema postupku opisanom u 3.2.2. Nakon inkubacije seruma i standarda pločice se ispiru, nakon čega se za određivanje IgG1 nanosi biotinom konjugirano monoklonsko protutijelo specifično za mišji IgG1 (biotin-<sub>m</sub>anti-IgG1) u koncentraciji 0,5 µg/mL, dok se za određivanje IgG2a na pločice nanosi biotinom konjugirano monoklonsko protutijelo specifično za mišji IgG2a (biotin-<sub>m</sub>anti-IgG2a) u koncentraciji 0,5 µg/mL (100 µL/jažici). Pločice se inkubiraju dva sata na 37 °C, a nakon ispiranja tri puta s PBST-om, za određivanje IgG1 na pločice se dodaje 100 µL po jažici otopine streptavidin - peroksidaze (streptavidin-HRP za IgG1; 1:300000), a za određivanje IgG2a dodaje se 100 µL po jažici otopine streptavidin - peroksidaze (streptavidin-HRP za IgG2a; 1:100000) te se test nastavlja kako je prethodno opisano. Količina prisutnih specifičnih imunoglobulina anti-OVA IgG1 i IgG2a određena je testom paralelnih 28 pravaca kako je prethodno opisano za ukupne imunoglobuline, IgG, s tom razlikom da je standardu anti-IgG1 dogovorno pripisana vrijednost od 400000 AU/mL, a za određivanje količine IgG2a specifičnih za ovalbumin standardnom pripravku anti-IgG2a pripisana je vrijednost od 10000 AU/mL.

### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je korištenjem računalnog programa SPSS. Pokusne skupine međusobno su uspoređivane višestrukim Kruskal-Wallis neparametrijskim testom, nakon čega je provedena post-hoc analiza. Statistička razlika uz  $p < 0.05$  smatrana je značajnom.



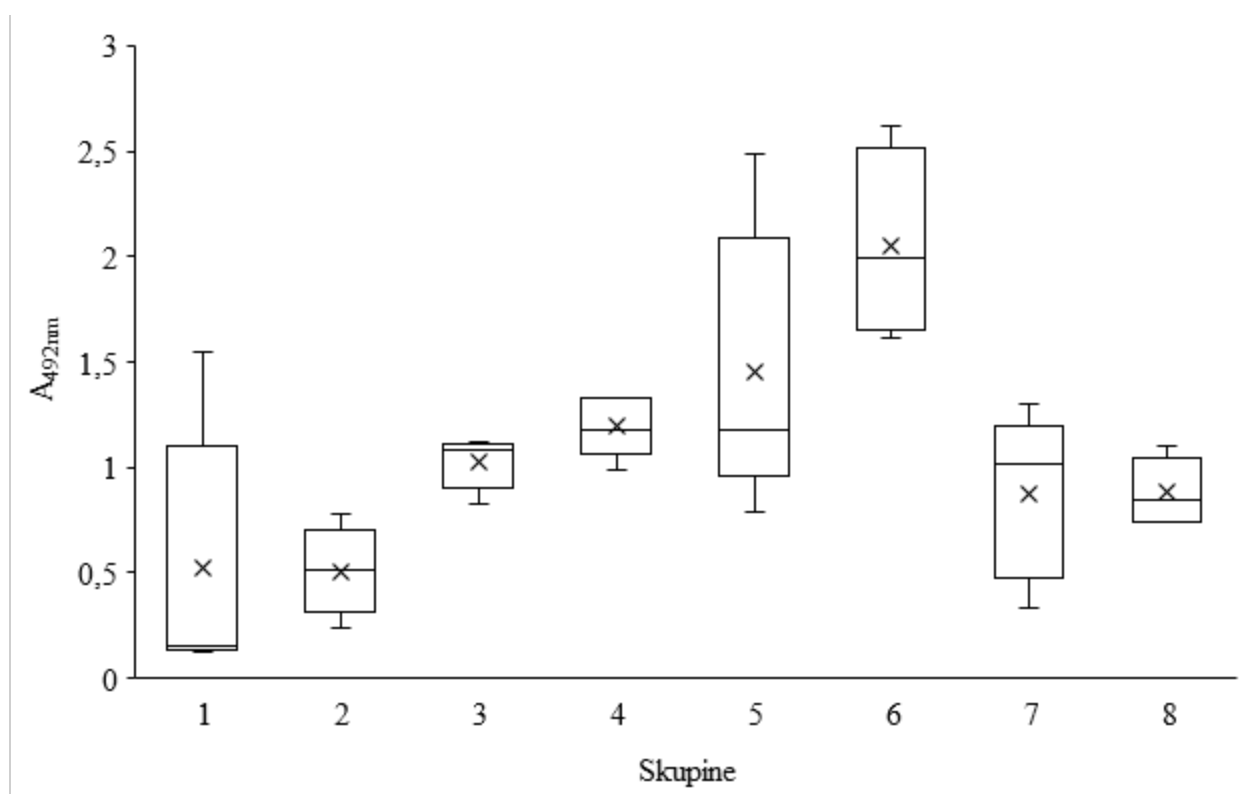
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga diplomskog rada bio je testirati peptidne hidrogelatore različite kemijske strukture te istražiti njihov utjecaj na specifičnu imunosnu reakciju i stimulaciju stvaranja protutijela razreda IgG te stvaranje IgG1 i IgG2a podrazreda kao pokazatelja tipa nastale imunoreakcije. Ispitivana je i adjuvantna aktivnost adjuvanata poznate strukture i mehanizama djelovanja: liposoma, peptidoglikan monomera, muramil dipeptida i imikvimoda kako bi se mogla usporediti njihova adjuvantna aktivnost s aktivnosti peptidnih hidrogelatora. Korišteni su hidrogelatori različite kemijske strukture kako bi se pokazalo kako će male promjene u strukturi tripeptida rezultirati u promjeni adjuvantne aktivnosti peptidnog hidrogelatora. Rezultati određivanja anti-OVA IgG/IgG1/IgG2a u serumima miševa imuniziranih formulacijama antigena OVA u hidrogelatorima ispitivanih tripeptida prikazani su od slike 10 do slike 12, a na slici 13 prikazan je učinak pripremljenih adjuvantnih formulacija na tip imunosne reakcije. Dosadašnja istraživanja pokazala su adjuvantno djelovanje već ranije spomenutih adjuvanata bakterijskog podrijetla, peptidoglikan monomera (Halassy i sur., 2003; Valinger i sur., 1987) i muramil dipeptida (Ellouz i sur., 1974), kao i liposoma (Perrie i sur., 2016), stoga su ti adjuvanti korišteni u istraživanjima opisanim u ovom diplomskom radu kako bi adjuvantnu aktivnost testiranih supramolekulskih peptidnih hidrogelova mogli usporediti s aktivnošću poznatih adjuvanata. Istraživanje adjuvantne aktivnosti novih spojeva koje propisuju regulatorne agencije kao što su FDA (engl. Food and Drug Administration) i EMEA (engl. European Medicines Agency) je zahtjevno i dugotrajno i temelji se na brojnim *in vitro* i *in vivo* predkliničkim studijama, a tek nakon što se zadovolje zahtjevi predkliničkih studija prelazi se na klinička istraživanja (EMEA/CPMP/VEG/17/03/2004v 5/). Karakterizacija imunosnog odgovora je jedan od minimalnih zahtjeva koji je potrebno provesti da bi se dobili podaci o predkliničkoj imunogenosti, podaci o ovisnosti različitih doza adjuvanata o različitim dozama korištenog cjepnog antigena te usporedba aktivnosti adjuvantiranog cjepnog antigena, samog antigena i antigena s već poznatim i dobro opisanim adjuvantom.

Nadalje, u zasebnom *in vivo* pokusu pripremljeni su i karakterizirani nanokompoziti tripeptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> s polimerima PEG i PVA te je istražen njihov adjuvantni učinak na količinu nastalih anti-OVA protutijela, u usporedbi s adjuvantima poznate strukture i mehanizma djelovanja (peptidoglikan monomer, muramil dipeptid i imikvimod) te u usporedbi s peptidnim hidrogelatorom bez dodatka polimera kako bi se pokazalo hoće li dodatak polimera PVA ili PEG povećati adjuvantnu učinkovitost peptidnog hidrogelatora. Rezultati određivanja anti-OVA IgG/IgG1/IgG2a u serumima miševa imuniziranih formulacijom OVA u hidrogelu Ac-

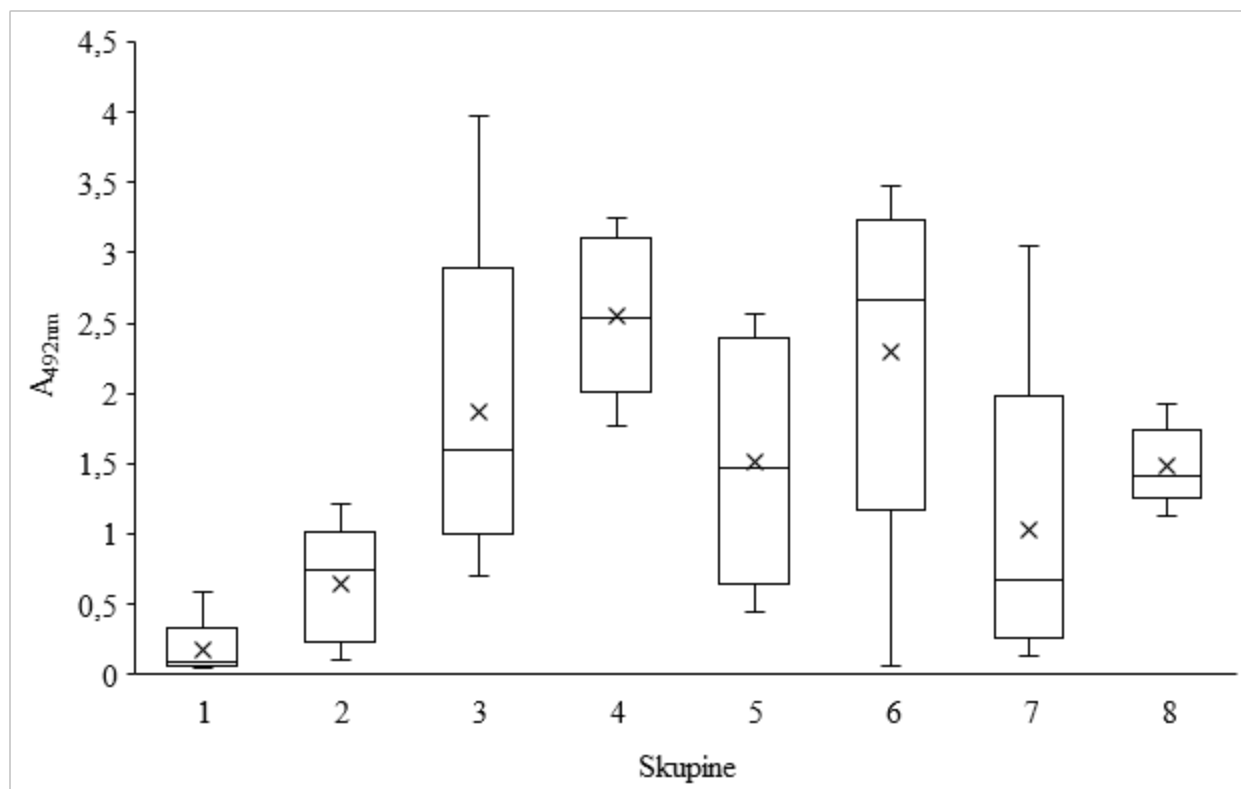
L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> bez dodatka polimera te s dodatkom polimera PVA i PEG prikazani su na slikama 14, 15 i 16, a njihov adjuvantni učinak na tip imunodne reakcije prikazan je na slici 17.

#### 4.1. UČINAK ADJUVANTSKIH FORMULACIJA NA STVARANJE ANTI-OVA IgG/IgG1/IgG2a



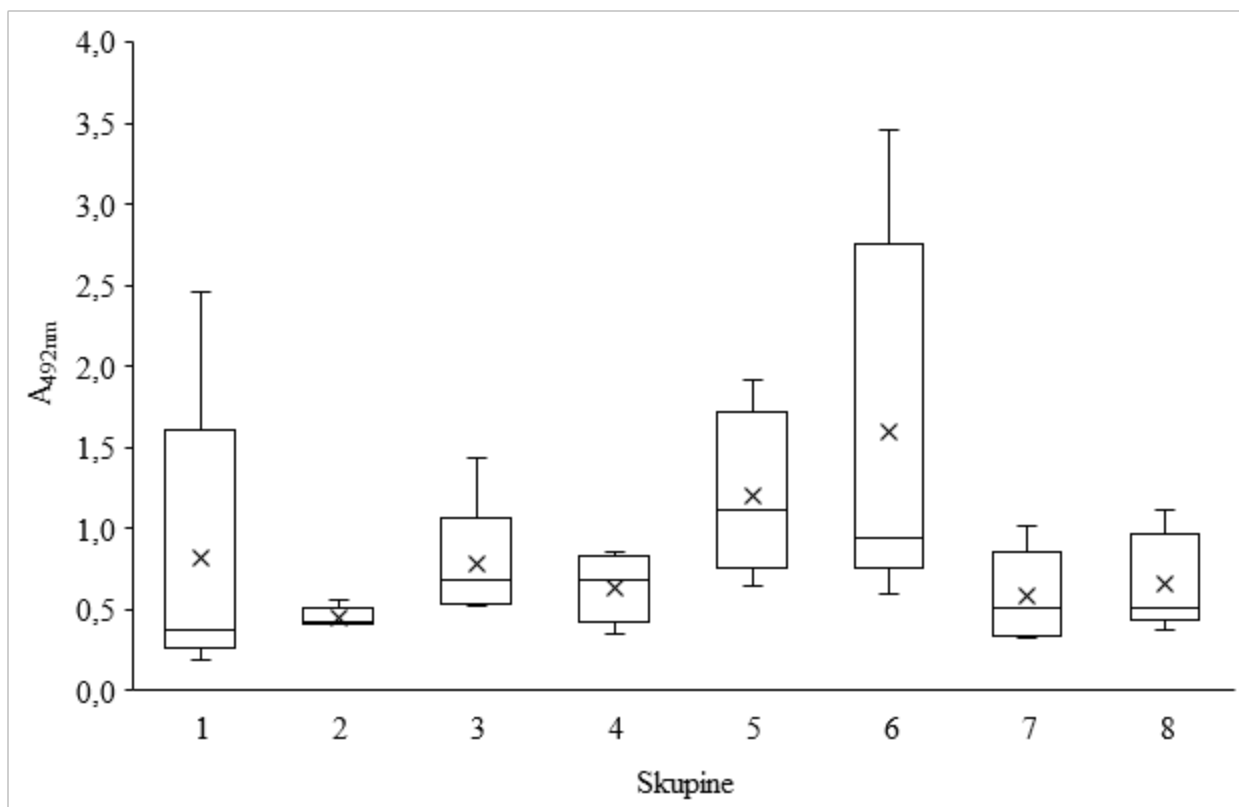
**Slika 7.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu ukupnih anti-OVA IgG protutijela određenih spektrofotometrijski pri  $A_{492\text{ nm}}$ . Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA u liposomima, 3 – OVA+PGM, 4 – OVA+MDP, 5 – OVA+IMIKVIMOD, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe- $\beta$ Ala-OMe, 8 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini.

Slika 7 prikazuje preliminarne rezultate određivanja ukupnih anti-OVA IgG protutijela u pokusnim skupinama, koji su nam dalje poslužili za pripravu razrjeđenja i analizu protutijela testom paralelnih pravaca, a izračunate količine prisutnih specifičnih protutijela izražene u proizvoljnim jedinicama u mililitru prikazane su na slici 10.



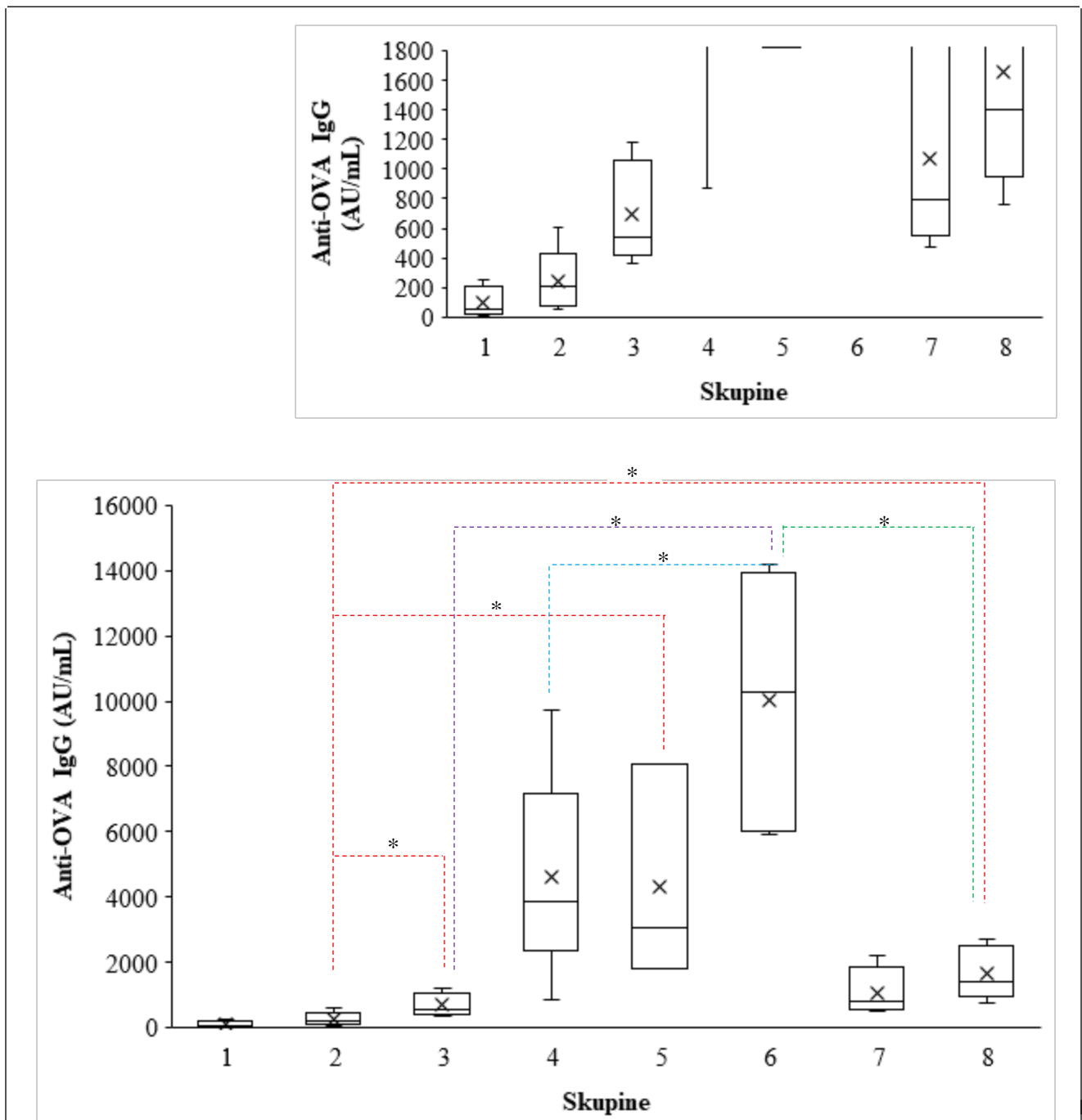
**Slika 8.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu anti-OVA IgG1 protutijela određenih spektrofotometrijski pri  $A_{492\text{ nm}}$ . Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA u liposomima, 3 – OVA+PGM, 4 – OVA+MDP, 5 – OVA+IMIKVIMOD, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-βAla-OMe, 8 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini.

Slika 8 prikazuje preliminarne rezultate određivanja anti-OVA IgG1 protutijela u pokusnim skupinama, koji su nam dalje poslužili za pripravu razrjeđenja i analizu protutijela testom paralelnih pravaca, a izračunate količine prisutnih specifičnih protutijela izražene u proizvoljnim jedinicama u mililitru prikazane su na slici 11.



**Slika 9.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu anti-OVA IgG2a protutijela određenih spektrofotometrijski pri  $A_{492\text{nm}}$ . Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA u liposomima, 3 – OVA+PGM, 4 – OVA+MDP, 5 – OVA+IMIKVIMOD, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-βAla-OMe, 8 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini.

Slika 9 prikazuje preliminarne rezultate određivanja protutijela podrazreda IgG2a u pokusnim skupinama koji su nam poslužili za pripremu razrjeđenja i analizu protutijela testom paralelnih pravaca, a izračunate količine prisutnih specifičnih protutijela izražene u proizvoljnim jedinicama u mililitru prikazane su na slici 12.

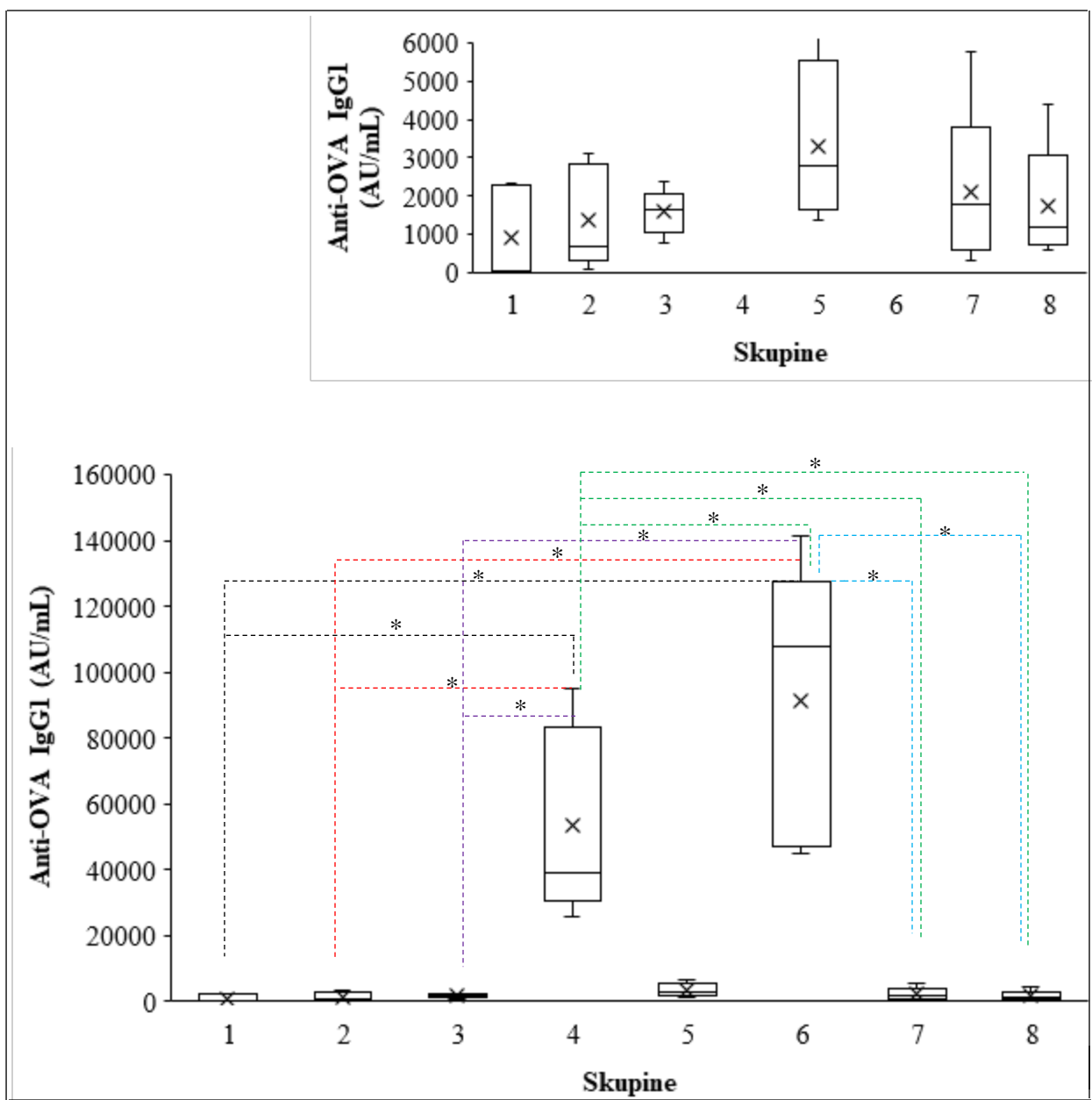


**Slika 10.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu ukupnih anti-OVA IgG protutijela. Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA u liposomima, 3 – OVA+PGM, 4 – OVA+MDP, 5 – OVA+IMIKVIMOD, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 7– OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-βAla-OMe, 8– OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini. \*Statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa ( $p < 0,05$ ).

Iz rezultata prikazanih na slici 10 vidljivo je kako je najveća količina protutijela razreda IgG razvijena u grupi koja je primila antigen ugrađen u hidrogel peptida Ac-Phe-Phe-Ala-NH<sub>2</sub> u usporedbi sa svim istraženim adjuvantima. Treća skupina (OVA+PGM) stimulirala je statistički značajno jače stvaranje anti-OVA IgG u odnosu na skupinu 2 (OVA liposomi). PGM je adjuvant koji stimulira humoralnu i staničnu imunoreakciju specifičnu za OVA. Istraživanja su pokazala njegov učinak na povećanje stvaranja ukupnih IgG-a te učinak na stimulaciju stvaranja IgG1 i IgG2a podrazreda IgG-a specifičnih za antigen. Međutim, nedostatak je ograničeno adjuvantno djelovanje PGM-a, što se može obrazložiti brzom razgradnjom u organizmu miša, odnosno PGM je podložan preranoj sekreciji iz organizma i brzoj enzimskoj razgradnji na metaboličke produkte koji sami po sebi nisu imunostimulacijski aktivni. Nadalje, peta skupina (OVA+IMIKVIMOD) stimulirala je statistički značajno jače stvaranje anti-OVA IgG u odnosu na skupinu 2 (OVA liposomi). Količina anti-OVA IgG u pokusnoj skupini 6 (OVA+Ac-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) statistički je veća u odnosu na pokusnu skupinu 3, 4 i 7, odnosno adjuvantni sustav na bazi tripeptida Ac-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> pokazuje jači imunostimulacijski potencijal proizvodnje ukupnih anti-OVA IgG u odnosu na adjuvante PGM i MDP te u odnosu na tripeptid Ac-Phe-Phe-βAla-OMe. Utvrđeno je i kako je pokusna skupina 8 (OVA+ Ac-Phe-Phe-Ala-COOH) stimulirala statistički značajno jače stvaranje anti-OVA IgG u odnosu na pokusnu skupinu 2, odnosno formulaciju antigena OVA ugrađenog u liposome. Pokazana je ovisnost strukture i adjuvantne aktivnosti jer se zamjenom slobodne N-terminalne skupine kod tripeptida iz pokusne skupine 6 s metilnom skupinom (tripeptid iz pokusne skupine 7) ili karboksilnom skupinom (tripeptid iz pokusne skupine 8) smanjila adjuvantna učinkovitost Phe-Phe-Ala tripeptida. Nadalje, navedeni tripeptidi razlikuju se i u konfiguraciji alanina te je tako kod pokusne skupine 7 ispitivan tripeptid kod kojeg je alanin u β-konfiguraciji. Dobiveni rezultati u skladu s literaturom, odnosno pokazano je kako funkcionalne skupine na peptidnim hidrogelovima utječu na smjer i intenzitet imunodne reakcije (Lopez-Silva i sur., 2020.). Recentna istraživanja su pokazala kako i slijed aminokiselina snažno mijenja adjuvantnu aktivnost (Zhang i sur., 2022).

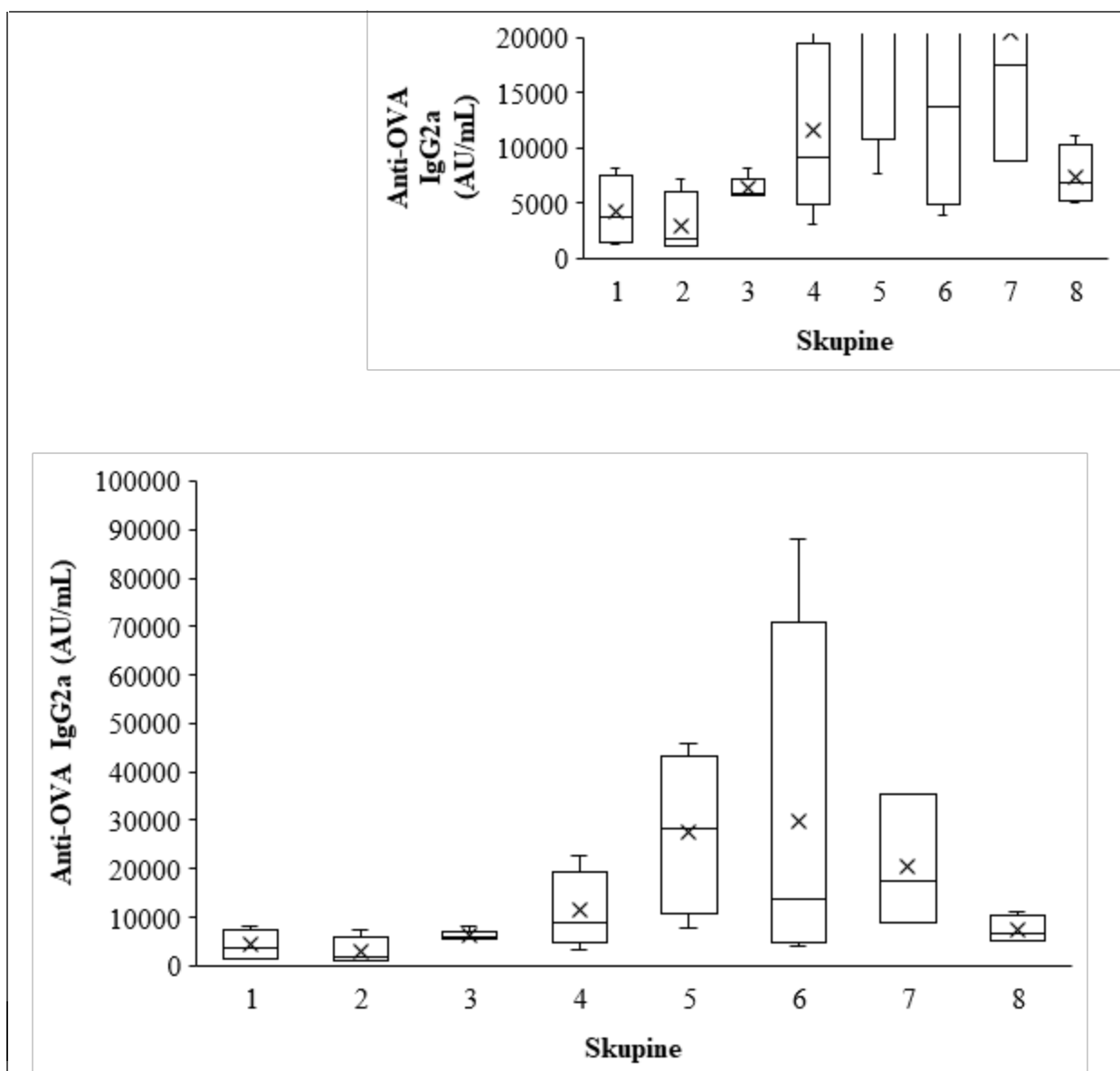
Opisani utjecaji kemijske strukture i konfiguracije aminokiselina u skladu su s literaturom u kojoj je opisana imunostimulacijska aktivnost supramolekuskog hidrogela D-tetra-peptida, strukture Nap-G<sup>D</sup>F<sup>D</sup>F<sup>D</sup>Y (Liu i sur., 2019; Luo i sur., 2016). Pokazano je kako D-peptidi imaju nešto bolju stabilnost u biološkim sustavima i pokazano je kako u usporedbi s L-gelom, korištenjem D-gela značajno se poboljšala produkcija anti-OVA IgG2a i IgG2b, a takva snažna indukcija imunskih odgovora mogla bi se objasniti sposobnošću gela da inducira sazrijevanje dendritičkih stanica i produljuje nakupljanje antigena u limfnim čvorovima, perifernim limfnim

organima u kojima aktivirane antigen-predodne stanice mogu stupiti u interakciju s T-stanicama i B-stanicama kako bi se potaknuo adaptivni imunski odgovor. Pokazana je ovisnost strukture i aktivnosti jer se zamjenom slijeda aminokiselina u peptidu i terminalnih skupina na peptidu smanjila imunostimulacijska aktivnost peptida. Nadalje, rezultati rada iz 2016. godine (Luo i sur., 2016) pokazali su kako je formulacija D-gela snažnije pojačala proizvodnju IL-5 u odnosu na njegov L-enantiomer i u odnosu na alum. Nadalje, D-formulacija značajno je inducirala proliferaciju ovalbumin-specifičnih splenocita za 1 – 2 puta u usporedbi s drugim istraživanim cjepivima te je pokazano kako je proliferacija splenocita bila ovisna o antigenu. Formulacija D-gela značajno je potaknula antigen-ovisnu proliferaciju splenocita, kao i proizvodnju IFN- $\gamma$  i IL-5.



**Slika 11.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu anti-OVA IgG1 protutijela. Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA u liposomima, 3 – OVA+PGM, 4 – OVA+MDP, 5 – OVA+IMI KVIMOD, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-βAla-OMe, 8 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini. \*Statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa ( $p < 0,05$ ).





**Slika 12.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu ukupnih anti-OVA IgG2a protutijela. Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA u liposomima, 3 – OVA+PGM, 4 – OVA+MDP, 5 – OVA+IMIKVIMOD, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-βAla-OMe, 8 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini.

Na slici 11 vidljivo je kako su najveći imunostimulacijski učinak na stvaranje anti-OVA IgG1 pokazale formulacije OVA+MDP te OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>. Statistički značajna razlika utvrđena je između skupine koja je primila antigen ugrađen u hidrogel tripeptida OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> u usporedbi sa samim antigenom, antigenom u liposomima te s PGM-om. Navedeni peptidni hidrogelator također je statistički značajnije stimulirao proizvodnju

anti-OVA IgG1 u usporedbi s druga dva hidrogelatora strukturno različitih tripeptida. MDP je također snažno potaknuo nastanak IgG1 protutijela kao rezultat jake humoralne imunostimulacijske reakcije. MDP, najmanja jedinica bakterijskog peptidoglikana koja pokazuje imunostimulacijsku aktivnost, stimulirao je statistički značajno jače stvaranje anti-OVA IgG1 protutijela u usporedbi sa samim antigenom te u usporedbi s formulacijama OVA+liposomi, OVA+PGM, OVA+Ac-L-Phe-L-Phe- $\beta$ Ala-OMe i OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH.

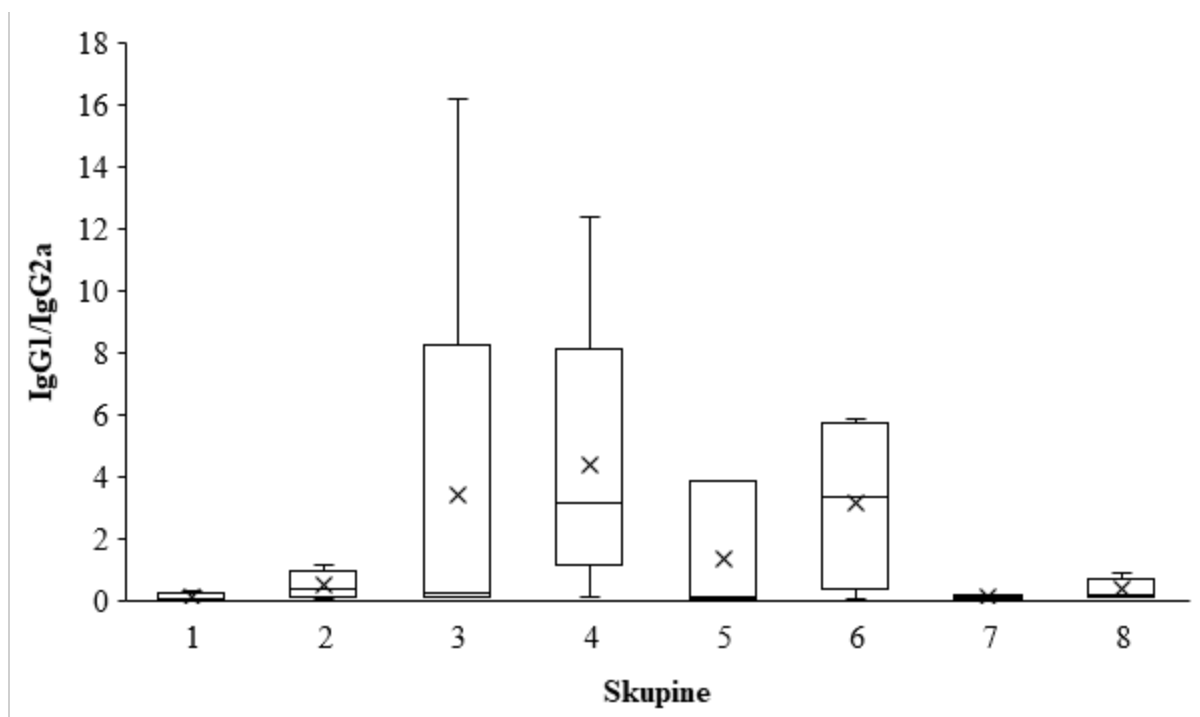
Na slici 12 prikazan je učinak ispitivanih adjuvantnih formulacija na količinu anti-OVA IgG2a protutijela, a statističkom obradom podataka utvrđeno je kako nema statistički značajne razlike između pokusnih skupina. Međutim, iz slike je vidljivo kako imikvimod te hidrogelatori tripeptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> i Ac-L-Phe-L-Phe- $\beta$ Ala-OMe imaju jači imunostimulacijski učinak na proizvodnju anti-OVA IgG2a u usporedbi s ostalim adjuvantima te u usporedbi sa samim antigenom OVA.

Ako se uspoređuje učinak ispitivanih hidrogelatora tri strukturno različita tripeptida na produkciju protutijela podrazreda IgG1 i IgG2a, vidi se kako Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> ima značajan utjecaj na stvaranje anti-OVA IgG1, ali i stvaranje anti-OVA IgG2a. Uporabom tog tripeptida postignuta je najveća srednja vrijednost količine induciranih anti-OVA IgG2a, ali pokazuje jači potencijal stvaranja anti-OVA IgG1, čija je srednja vrijednost količine gotovo tri puta veća u odnosu na srednju vrijednost količine anti-OVA IgG2a. Hidrogelatori druga dva tripeptida pokazala su značajniji utjecaj na stvaranje anti-OVA IgG2a u odnosu na produkciju anti-OVA IgG1. Nadalje, uspoređujući pokusne skupine 7 i 8 te njihov utjecaj na stvaranje IgG1 i IgG2a, može se zaključiti kako ta dva adjuvantna sustava imaju sličan utjecaj na proizvodnju IgG1, gdje su pokazali slabi imunostimulacijski potencijal, a u slučaju utjecaja na proizvodnju IgG2a, iako su oba adjuvantna sustava pokazala značajniji utjecaj, pokusna skupina 7 (OVA+Ac-L-Phe-L-Phe- $\beta$ Ala-OMe) pokazala je veću imunostimulacijsku sposobnost proizvodnje IgG2a u odnosu na pokusnu skupinu 8 (OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH), ali nije utvrđena statistički značajna razlika između te dvije pokusne skupine. Kao i na primjeru utjecaja na proizvodnju ukupnih anti-OVA IgG-a, tako se i na primjeru grafova prikazanih na slikama 11 i 12 može uočiti kako male promjene u strukturi peptida, kao što je konformacijski položaj aminokiseline ili različite funkcijske skupine, u ovom slučaju metoksi skupina kod grupe 7 te karboksilna skupina kod grupe 8, mogu imati utjecaja na imunostimulacijski potencijal ovakvih adjuvantnih sustava na proizvodnju anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a. Iz rezultata je vidljivo da je adjuvantni sustav temeljen na peptidu Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> prikladan adjuvant jer, pored sposobnosti

induciranja IgG1, pokazuje sposobnost povećanja razine protutijela IgG2a koja su važna u obrani od virusa i parazita te u poticanju stanične imunosti ovisne o protutijelima.

#### 4.2. UČINAK ADJUVANTSKIH FORMULACIJA NA TIP IMUNOREAKCIJE

Kako bi se ispitalo kako pojedina adjuvantna formulacija utječe na Th-tip imunoreakcije, analizirane su količine nastalih anti-OVA IgG1 i IgG2a podrazreda IgG. Omjer vrijednosti IgG1 i IgG2a izračunat je za svakog miša u svim pokusnim skupinama, a rezultati su prikazani na slici 13. Omjer relativnih količina anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a pokazuje jesu li i kako pojedine istraživane formulacije utjecale na tip imunoreakcije. Poznato je kako adjuvanti mogu modulirati omjer Th1/Th2 induciranoga imunosnog odgovora (Ioannou i sur., 2002). Što je omjer IgG1/IgG2a manji, količina protutijela IgG2a je veća, što označava kako je imunoreakcija više usmjerena prema Th1-tipu imunoreakcije te obrnuto, što je omjer IgG1/IgG2a veći, količina protutijela IgG1 je veća, što označava kako je imunoreakcija više usmjerena prema Th2-tipu imunoreakcije.



**Slika 13.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na omjer IgG1 i IgG2a. Kontrolna skupina:

1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA u liposomima, 3 – OVA+PGM, 4 – OVA+MDP, 5 – OVA+IMIKVIMOD, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-βAla-OMe, 8 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini.

Na slici 13 vidi se kako su najveće vrijednosti omjera IgG1/IgG2a izračunate za skupine imunizirane s OVA+MDP i OVA+Ac-Phe-Phe-Ala-NH<sub>2</sub>, što znači kako MDP i tripeptid Ac-Phe-

Phe-Ala-NH<sub>2</sub> induciraju Th2-tip imunoreakcije, dok je za ostale adjuvantne formulacije izračunata niska vrijednost omjera IgG1/IgG2a pa se može zaključiti kako navedene formulacije skreću imunoreakciju prema Th1-tipu.

Srednja vrijednost omjera IgG1/IgG2a za skupinu 2 imuniziranu liposomima s ugrađenim ovalbuminom veća je u odnosu na kontrolnu skupinu OVA. Dosadašnja istraživanja potvrdila su kako liposomi s ugrađenim OVA vrijednost IgG1/IgG2a pomiču dominantno na stranu IgG2a, čime usmjeravaju imunoreakciju prema Th1-tipu. Liposomi stimuliraju lučenje citokina IL-12 i IFN- $\gamma$ , što su citokini koji potiču diferencijaciju i proliferaciju Th1-limfocita (Yotsumoto i sur., 2004). Međutim, liposomi se mogu povezati i s Th2-tipom imunoreakcije, a ključnu ulogu u određivanju imunogenog odgovora ima veličina liposoma pa tako veći liposomi induciraju proizvodnju IFN- $\gamma$  i IgG2a, što je karakteristika Th1-odgovora, dok se manji liposomi povezuju s Th2-tipom imunoreakcije. Nadalje, iako je formulacija liposoma s ugrađenim ovalbuminom pokazala svojevrsnu adjuvantnu učinkovitost, inducirana imunoreakcija ograničenog je vijeka te za indukciju Th1-tipa imunoreakcije dužeg vijeka dominantnu ulogu imaju imunostimulatori kao što su peptidoglikan monomer ili imikvimod. PGM je stimulirao proizvodnju i anti-OVA IgG2a i anti-OVA IgG1. MDP je inducirao stvaranje i IgG1 i IgG2a, s tim kako je značajnije inducirao stvaranje IgG1. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako adjuvantna sposobnost MDP-a ovisi o obliku u kojem se primjenjuje. Ukoliko se daje u obliku fiziološke otopine, u pravilu pojačava humoralnu imunost, a ako se ugradi u liposome, induciraće stanično posredovanu imunost (Gupta i sur., 1993). Pokazano je i kako hidrofилni derivati MDP-a induciraju Th2-tip, dok lipofilni derivati MDP-a potenciraju Th1-tip imunoreakcije (Cox i Coulter, 1997). Imikvimod je TLR7 agonist i može jednako stimulirati i Th1-tip i Th2-tip imunoreakcije. Pokazano je kako imikvimod stimulira proizvodnju karakterističnog profila citokina, uključujući IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Međutim, iako pojačava Th1-odgovor, imikvimod aktivira i B-stanice te povećava i razinu IgG2a.

Formulacija antigena OVA ugrađenog u supramolekulski samoorganizirani hidrogel tripeptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> značajno je stimulirala proizvodnju i anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a, s tim kako je značajniji utjecaj imala na stvaranje anti-OVA IgG1. S druge strane, druga dva supramolekulska hidrogela tripeptida, OVA+Ac-L-Phe-L-Phe- $\beta$ Ala-OMe i OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH pokazala su značajniji utjecaj na stvaranje anti-OVA IgG2a, te skreću imunoreakciju prema Th1-tipu.

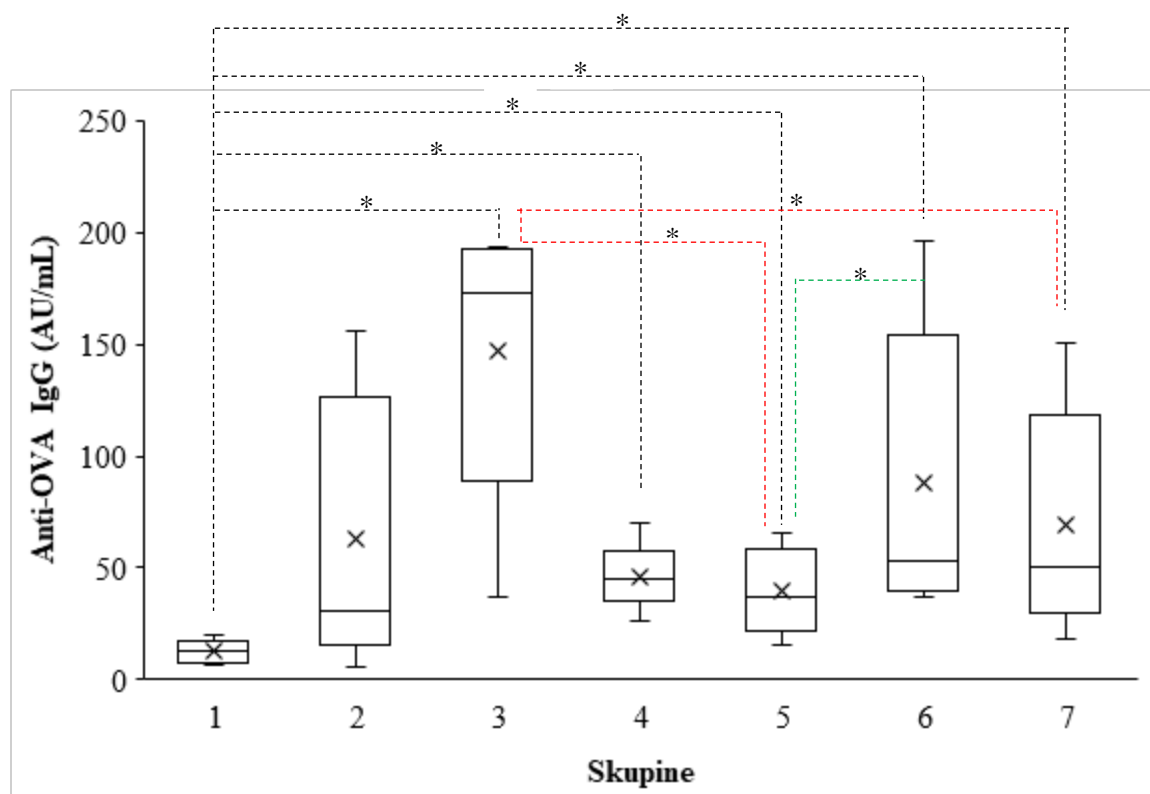
### 4.3. HIDROGELATORIS DODATKOM POLIMERA

Iako supramolekulski peptidni hidrogelovi pokazuju brojne prednosti, nedostatak im je ograničena mehanička stabilnost zbog slabih intermolekulskih sila, kao što su vodikove veze, koje drže molekule na okupu, što se može riješiti ugradnjom polimera koji su mehanički stabilni jer sadržavaju monomerne jedinice povezane kovalentnim vezama. Dostupnost raznih polimera s dokazanim sigurnosnim profilom i fleksibilnosti kemijskih modifikacija čini ove sustave posebno privlačnima u primjeni peptidnih cjepiva te se kombiniranjem odgovarajućeg polimera sa supramolekulskim gelom dobije se sustav s poboljšanim mehaničkim svojstvima koji zadržava karakteristike i prednosti supramolekulskog gela kao što su: visoki udio vode za difuziju ugrađenih molekula, značajan postotak vode kao u ljudskim tkivima, jednostavna biorazgradivost *in vivo*, jednostavna ugradnja funkcionalnih komponenti, poboljšanje topljivosti lijeka u vodi, veća bioraspoloživost, produženje vremena cirkulacije lijeka i smanjenje sistemskih nuspojava terapijama (Pham i sur., 2020). Pri tome su biokompatibilni i prihvatljivi polimeri polietilen glikol (PEG), hitozan, polistiren, polivinil-alkohol (PVA) i polilaktid (PLA) (Cui i sur., 2007., Sharp i sur., 2009., Ma i sur., 2012). Svoju primjenu nalaze u biomedicini, tkivnom inženjerstvu, regenerativnoj medicini te za razvoj sustava za dostavu lijekova.

Na temelju rezultata testiranja adjuvantnog učinka supramolekulskih peptidnih hidrogelova i činjenice da je peptid strukture Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> pokazao najjači učinak na specifični imunski odgovor pripremljeni su i karakterizirani nanokompoziti peptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> s polimerima PEG i PVA te je istražen njihov adjuvantni učinak na količinu nastalih anti-OVA protutijela u posebnom *in vivo* pokusu. Rezultati pokusa istraživanja adjuvantnog učinka nanokompozitnih hidrogelova peptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> s dodatkom PVA i PEG na količinu nastalih imunoglobulina anti-OVA IgG, IgG1 i IgG2a, prikazani su na slikama 14, 15 i 16.

Polivinil-alkohol (PVA) je biokompatibilan sintetski polimer, topljiv u vodi, koji sadrži veliki broj hidroksilnih skupina koje se mogu umrežiti u hidrogel (Chen i sur., 2019). Hidrofilni je, biorazgradivi, biokompatibilni i netoksičan sintetski polimer koji se koristi u različitim biomedicinskim područjima (Paradossi i sur., 2003), primjerice u mekim kontaktnim lećama (Hyon i sur., 1994), implantatima (Juang i sur., 1996) i umjetnim organima (Chen i sur., 1994). Nadalje, PEG je polimer koji se, među ostalim, koristi za povećanje toplinske stabilnosti cjepiva (Marco-Dufort i sur., 2022). PEG hidrogelovi su biokompatibilni sa stanicama pod odgovarajućim uvjetima polimerizacije (Bryant i sur., 2000). Pored dobre biokompatibilnosti, PEG pokazuje i povoljnu stabilnost te amfifilnost, ali nedostatak je manjak biološke aktivnosti (Xue i sur., 2021).

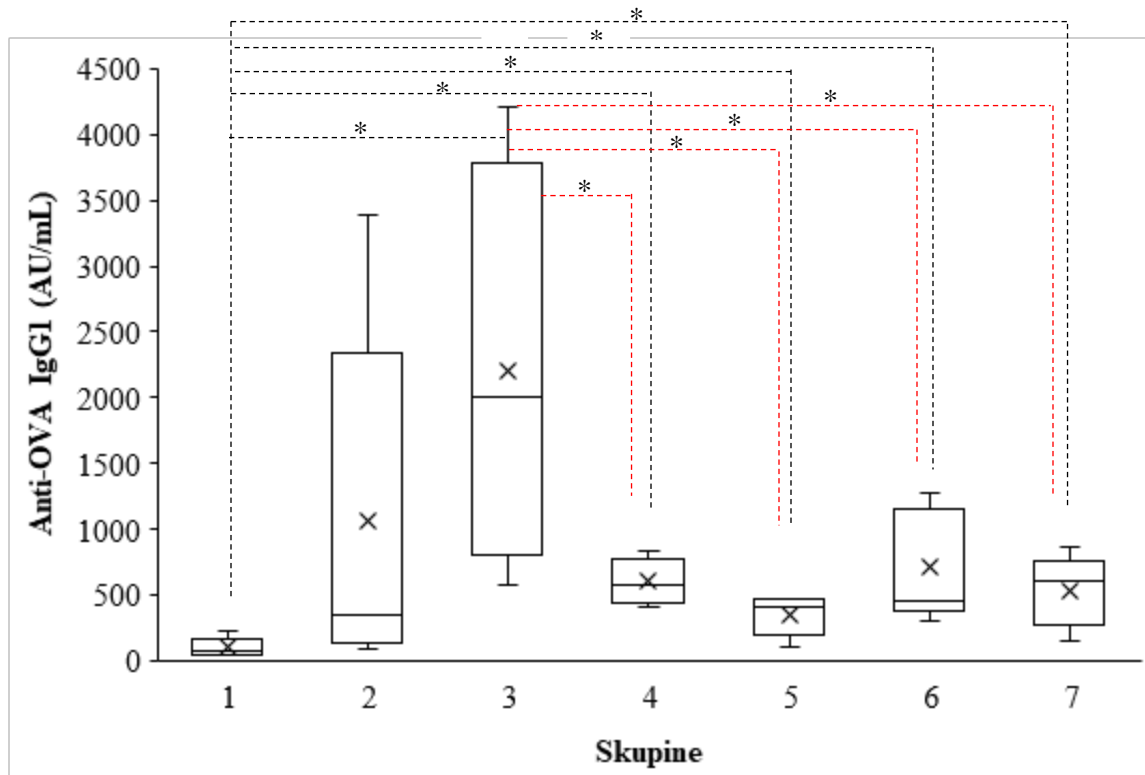
Cilj istraživanja bio je testirati možemo li pripremom nanokompozitnog materijala supramolekulskog peptidnog hidrogela s dodatkom PVA ili PEG pojačati njegovu adjuvantnu aktivnost i utjecati na tip specifične imunološke reakcije. Pokazano je da vezanje PEG-a na lijekove i liposome može značajno pridonijeti efikasnoj dostavi lijekova, farmakokinetici i biodistribuciji lijeka kroz povećanje topljivosti i zaštiti od enzimske razgradnje (Milla i sur., 2012). Dodatak polimera koji se dodaje u supramolekulski peptidni hidrogel utječe na strukturu gelske mreže.



**Slika 14.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu ukupnih anti-OVA IgG protutijela. Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA+PGM, 3 – OVA+MDP, 4 – OVA+IMIKVIMOD, 5 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>+PVA, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>+PEG. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini. \*Statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa ( $p < 0,05$ ).

Na slici 14 vidljivo je kako najveći učinak na proizvodnju ukupnih anti-OVA IgG ima pokusna skupina 3 (OVA+MDP), dok je najmanja srednja vrijednost kod skupine koja je primila

samo OVA. Sve pokusne skupine, izuzev pokusne skupine 2 (OVA+PGM) statistički značajnije stimuliraju proizvodnju anti-OVA IgG u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno antigen OVA. Pokusna skupina 3 (OVA+MDP) statistički značajno jače potiče proizvodnju ukupnih anti-OVA IgG u odnosu na pokusnu skupinu 5 (OVA+HG), odnosno skupinu kod koje je testiran hidrogelator bez dodatka polimera te u odnosu na pokusnu skupinu 7 (OVA+HG+PEG), odnosno skupinu za koju je testiran hidrogelator s dodatkom polimera PEG. Uspoređujući pokusnu skupinu 5, gdje nije dodan polimer s pokusnim skupinama 6 i 7, koje predstavljaju hidrogelatore s dodatkom polimera, može se zaključiti kako dodavanje polimera rezultira povećanim stvaranjem ukupnih anti-OVA IgG-a. Statističkom obradom podataka utvrđeno je kako je pokusna skupina 6 (OVA+HG+PVA) stimulirala statistički značajno jače stvaranje ukupnih anti-OVA IgG-a u odnosu na pokusnu skupinu 5 (OVA+HG bez dodatka polimera). Nadalje, iako je srednja vrijednost ukupnih anti-OVA IgG-a veća za pokusnu skupinu 6, gdje je testiran utjecaj dodatka PVA, u odnosu na pokusnu skupinu 7, gdje je testiran utjecaj dodatka PEG, nije pokazana statistički značajna razlika između te dvije pokusne skupine.

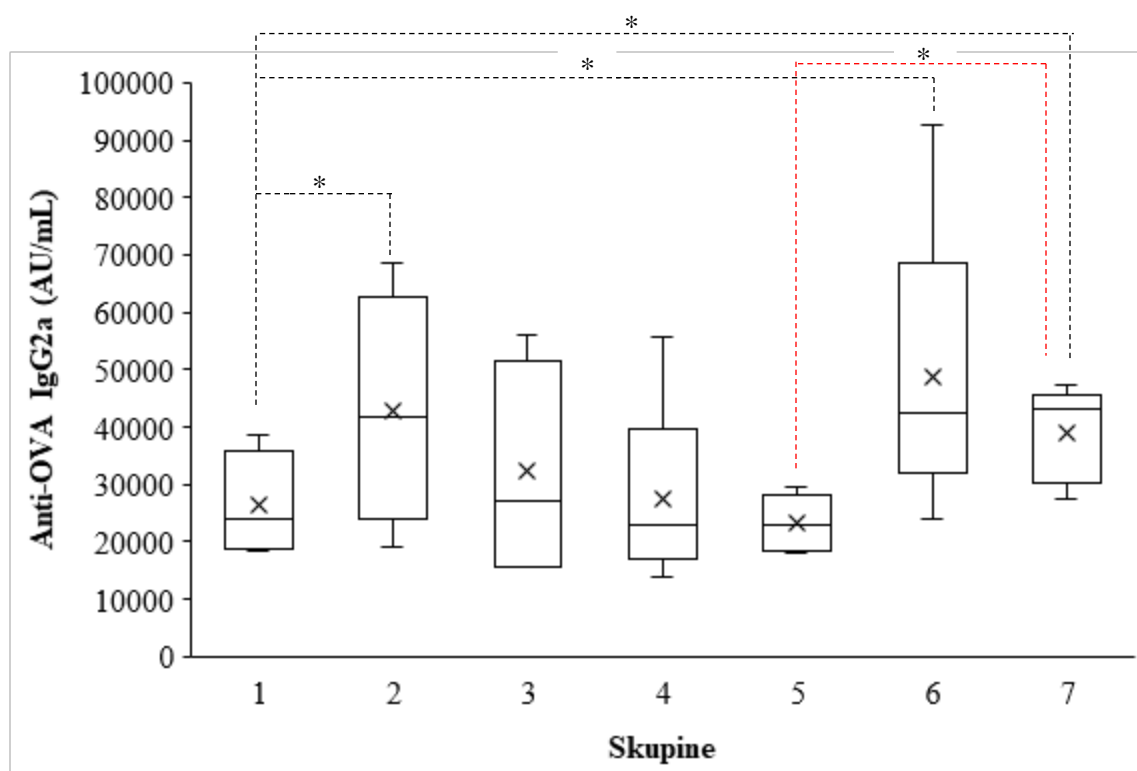


**Slika 15.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu anti-OVA IgG1. Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA+PGM, 3 – OVA+MDP, 4 – OVA+IMIKVIMOD, 5 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>+PVA, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>+PEG. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini. \*Statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa ( $p < 0,05$ ).

Analizirane su i količine protutijela podrazreda IgG1 i IgG2a kako bi testirali može li dodatak polimera PVA i PEG u supramolekulski peptidni hidrogel utjecati na smjer specifične imunoreakcije. Na slici 15 vidljivo je kako najveći učinak na proizvodnju anti-OVA IgG1 ima pokusna skupina 3 (OVA+MDP), dok je najmanja srednja vrijednost kod skupine miševa imuniziranih s OVA u fiziološkoj otopini. Pokusna skupina 3 (OVA+MDP) statistički značajno jače potiče proizvodnju anti-OVA IgG1 u odnosu na pokusnu skupinu 4 (OVA+IMIQUIMOD), pokusnu skupinu 5 (OVA+HG), odnosno skupinu kod koje je testiran hidrogelator bez dodatka polimera te u odnosu na pokusnu skupinu 6 (OVA+HG+PVA) i pokusnu skupinu 7 (OVA+HG+PEG), odnosno skupine za koje je testiran hidrogelator s dodatkom polimera. Uspoređujući pokusnu skupinu 5, gdje nije dodan polimer s pokusnim skupinama 6 i 7, koje predstavljaju hidrogelatore s dodatkom polimera, može se zaključiti kako dodavanje polimera



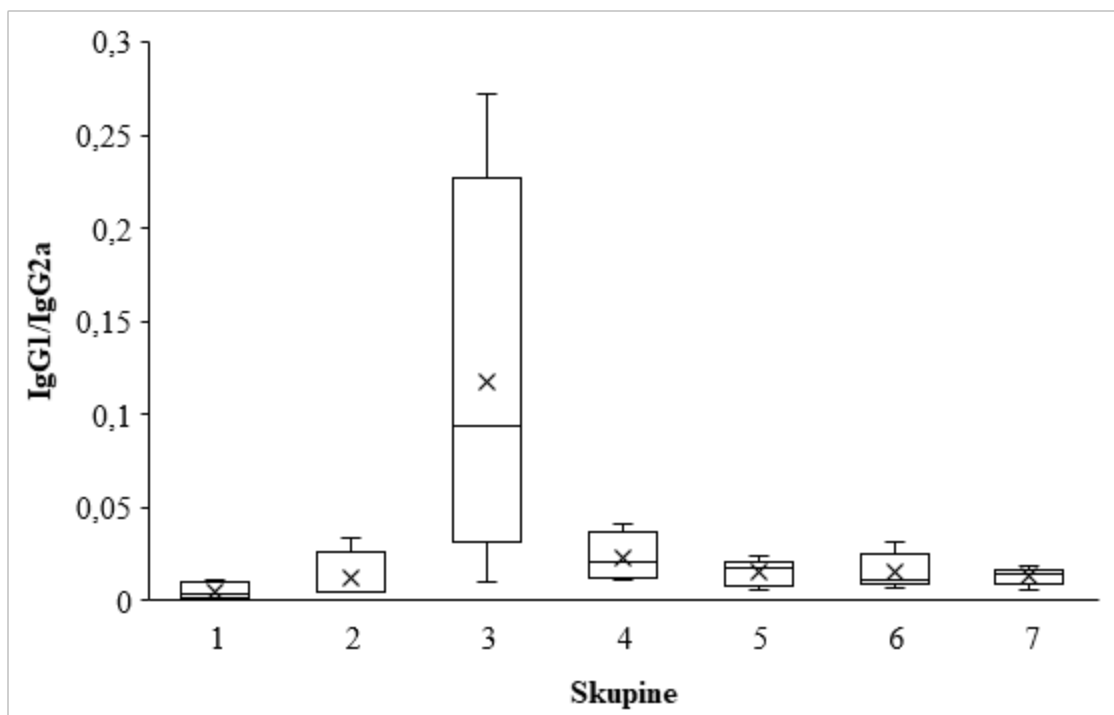
rezultira povećanim stvaranjem anti-OVA IgG1, ali nije utvrđena statistički značajna razlika između pokusne skupine 5 i 6 te između pokusne skupine 5 i 7. Nadalje, iako je srednja vrijednost anti-OVA IgG1 veća za pokusnu skupinu 6, gdje je testiran utjecaj dodatka PVA, u odnosu na pokusnu skupinu 7, gdje je testiran utjecaj dodatka PEG, nije pokazana statistički značajna razlika između te dvije pokusne skupine. Oba navedena polimera pokazuju slabiji imunostimulacijski učinak na stvaranje anti-OVA IgG1 u odnosu na adjuvante PGM i MDP.



**Slika 16.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na količinu anti-OVA IgG2a protutijela. Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA+PGM, 3 – OVA+MDP, 4 – OVA+IMIKVIMOD, 5 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>+PVA, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>+PEG. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini. \*Statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa ( $p < 0,05$ ).

Na slici 16 prikazani su rezultati analize anti-OVA IgG2a u skupinama koje su imunizirane s OVA uz adjuvante PGM, MDP i imikvimod te s OVA ugrađenim u nanokompozitni hidrogel bez dodatka polimera, te u isti hidrogel s dodatkom PVA i PEG. Na grafu je vidljivo kako je najveći učinak na proizvodnju anti-OVA IgG2a kod pokusne skupine 6 (OVA+HG+PVA), dok je

najmanja srednja vrijednost kod pokusne skupine 5 (OVA+HG). Pokusne skupine 2 (OVA+PGM), 6 (OVA+HG+PVA) i 7 (OVA+HG+PEG) statistički značajno jače potiče proizvodnju anti-OVA IgG2a u odnosu na pokusnu skupinu 1 (OVA). Uspoređujući pokusnu skupinu 5, gdje nije dodan polimer, s pokusnim skupinama 6 i 7, koje predstavljaju hidrogelatore s dodatkom polimera, može se zaključiti kako dodavanje polimera rezultira povećanim stvaranjem anti-OVA IgG2a, s tim kako je između pokusne skupine 5 i pokusne skupine 7 utvrđena statistički značajna razlika. Nadalje, iako je srednja vrijednost anti-OVA IgG2a veća za pokusnu skupinu 6, gdje je testiran utjecaj dodatka PVA, u odnosu na pokusnu skupinu 7, gdje je testiran utjecaj dodatka PEG, nije pokazana statistički značajna razlika između te dvije pokusne skupine. Uspoređujući utjecaj korištenja polimera na stvaranje IgG1 i IgG2a, moguće je zaključiti kako PVA i PEG imaju značajno bolji imunostimulacijski učinak na stvaranje IgG2a u odnosu na stvaranje IgG1, što ukazuje na činjenicu kako skreću imunoreakciju prema Th1-tipu imunološkog odgovora.



**Slika 17.** Učinak istraživanih adjuvantnih formulacija na omjer IgG1 i IgG2a. Kontrolna skupina: 1 – OVA. Pokusne skupine: 2 – OVA+PGM, 3 – OVA+MDP, 4 – OVA+IMIKVIMOD, 5 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>, 6 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>+PVA, 7 – OVA+Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub>+PEG. x predstavlja srednju vrijednost pet vrijednosti po svakoj skupini.

Omjer količina anti-OVA IgG1 i IgG2a kod različitih skupina imuniziranih miševa prikazan je na slici 17. Najveća vrijednost omjera IgG1/IgG2a izračunata je za skupinu 3 koja je tretirana s OVA+MDP, što znači kako MDP inducira Th2-tip imunoreakcije. Formulacija OVA+PGM dominantno je stimulirala proizvodnju anti-OVA IgG2a pa se može zaključiti kako PGM skreće imunoreakciju prema Th1-tipu. Nadalje, MDP je inducirao stvaranje i anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a, s tim kako je značajnije inducirao stvaranje IgG1. Dodatak imikvimoda rezultira značajnijom proizvodnjom anti-OVA IgG2a pa je jasno da navedeni imunomodulator uzrokuje skretanje imunoreakcije prema Th1-tipu imunoreakcije. Kod preostale tri skupine istraživao se utjecaj primjene hidrogelatora bez korištenja polimera (skupina 5) te utjecaj primjene hidrogelatora s različitim polimerima na tip imunoreakcije (skupine 6 i 7) te je vidljivo kako sve tri pokusne skupine dominantno stimuliraju proizvodnju anti-OVA IgG2a, što znači kako skreću imunoreakciju prema Th1-tipu imunoreakcije. Razlika između tih pokusnih skupina je u tome što primjenom polimera kod pokusnih skupina 6 i 7 dolazi do značajnije proizvodnje anti-OVA IgG2a antitijela. Nadalje, uspoređujući polimere PVA i PEG može se zaključiti kako PVA polimer ima bolji imunostimulacijski učinak i na proizvodnju anti-OVA IgG1 i na proizvodnju anti-OVA IgG2a antitijela u odnosu na PEG polimer. Stoga bi PVA polimer bio pogodniji kandidat za primjenu u hidrogelatorima u svrhu razvoja sustava za dostavu raznih terapeutika.

Kod imunoterapije Th1 stanice predstavljaju ciljni tip stanica koji se može modulirati primjenom hidrogelatora. Osim izravne modulacije postoje i neizravne strategije za pojačavanje Th1 imunskog odgovora koje uključuju lokalno smanjenje koncentracije protuupalnih čimbenika, kao što su IL-10 i transformirajući faktor rasta, odnosno *Transforming Growth Factor* (TGF). Nadalje, Th2 stanice također se mogu modulirati korištenjem hidrogelatora. Primjerice, transkutana imunizacija je nova neinvazivna metoda cijepljenja posredovana korištenjem hidrogelatora (Ishii i sur., 2008), a omogućuje značajnije stvaranje IgG1, IgG2a i IgG2b, ali ne i IgG2c, što ukazuje na Th2-tip imunoreakcije. Nadalje, pokazano je kako integracija ovalbumina u hidrogelator rezultira većom proliferacijom OVA-specifičnih CD8<sup>+</sup> T-stanica te većom proliferacijom OVA-specifičnih CD4<sup>+</sup> T-stanica u odnosu na primjenu samoga ovalbumina *in vivo* (Sexton i sur., 2009).

U literaturi nema podataka o utjecaju PEG-a i PVA na smjer specifične imunске reakcije s kojima bi se mogli usporediti dobiveni rezultati. Ovi preliminarni znanstveni rezultati predstavljaju originalan znanstveni doprinos razvoju novih potentnih adjuvantnih sustava za dostavu cjepnog antigena. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se saznalo više o mehanizmu djelovanja istraživanih adjuvantnih sustava.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Adjuvantna aktivnost supramolekulskih samoorganiziranih peptidnih hidrogelova i kompozitnih adjuvantnih formulacija peptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> s dodatkom polimera, PVA i PEG, uspoređena je s poznatim adjuvantima različite strukture i mehanizma djelovanja; liposomima, peptidoglikan monomerom i muramil dipeptidom te imikvimodom. Pokazano je kako je u serumima eksperimentalnih životinja imuniziranih s antigenom ugrađenim u hidrogel tripeptida Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> određena najviša količina imunoglobulina IgG, u usporedbi sa svim testiranim adjuvantima. Isto tako, pokazano je kako dodatak polimera PVA pojačava adjuvantni učinak testiranog peptidnog hidrogela.

2. Rezultati su pokazali kako sve tri adjuvantne formulacije antigena u peptidnim hidrogelovima moduliraju tip specifične imunoreakcije pa tako adjuvantna formulacija s ugrađenim antigenom u Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH<sub>2</sub> inducira i Th1 i Th-2 tip imunoreakcije, dok adjuvantne formulacije s ugrađenim antigenom u Ac-L-Phe-L-Phe-β-Ala-OMe i Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-COOH skreću imunosni odgovor prema Th-1 tipu imunoreakcije.

3. Rezultati su pokazali utjecaj kemijske strukture na adjuvantnu aktivnost, te važnost slobodne N-terminalne skupine u ispitivanim hidrogelatorima.

## 6. LITERATURA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2016) Osnove imunologije. Funkcije i poremećaji imunološkog sustava, 5. izd. (preveli Korać Prlić i sur.), Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet.

Alving CR (1991) Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J Immunol Methods* **140**, 1. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90120-5)

Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G (2013) Mechanisms of Action of Adjuvants. *Front Immunol* **4**, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>

Branco MC, Nettesheim F, Pochan DJ, Schneider JP, Wagner NJ (2009) Fast dynamics of semiflexible chain networks of self-assembled peptides. *Biomacromolecules* **10**(6), 1374-1380.e3. <https://doi.org/10.1021/bm801396e>

Bryant SJ, Nuttelman CR, Anseth KS (2000) Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts *in vitro*. *J Biomater Sci Polym Ed* **11**, 439–457.e3. <https://doi.org/10.1163/156856200743805>

Chen Y, Jiao C, Peng X, Liu T, Shi Y, Liang M, Wang H (2019) Biomimetic anisotropic poly(vinyl alcohol) hydrogels with significantly enhanced mechanical properties by freezing-thawing under drawing. *J Mater Chem* **7**, 3243-3249.e3. <https://doi.org/10.1039/C9TB00372J>

Chen DH, Leu JC, Huang TC (1994) Transport and hydrolysis of urea in a reactor-separator combining an anion-exchange membrane and immobilized urease. *J Chem Technol Biotechnol* **61**, 351-357.e3. <https://doi.org/10.1002/jctb.280610411>.

Cox JC, Coulter AR (1997) Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine* **15**(3), 248-256.e3. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(96\)00183-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00183-1)

Cui C, Stevens VC, Schwendeman SP (2007) Injectable polymer microspheres enhance immunogenicity of a contraceptive peptide vaccine. *Vaccine* **25**, 500–9.e3. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.07.055>.

Dahl MV (2002) Imiquimod: A cytokine inducer. *J Am Acad Dermatol* **47**, 205. <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.126586>

Dalsgaard K. (1970) Thin layer chromatographic fingerprinting of commercially available saponins. *Dan Tidsskr Farm* **44**, 327-331.e3. <https://doi.org/10.1007/BF01240612>

- Du X, Zhou J, Shi J, Xu B (2015) Supramolecular hydrogelators and hydrogels: from soft matter to molecular biomaterials. *Chem Rev* **115**(24), 13165–13307. e3. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00299>
- Dutta SS (2018) Types of Antibodies. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Types-of-Antibodies.aspx>. Pristupljeno 13. siječnja 2023.
- Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R, Lederer E (1974) Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives, *Biochem Biophys Res Commun* **59**(4), 1317-1325.E3. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(74\)90458-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(74)90458-6).
- Fletcher NL, Lockett CV, Dexter AF (2011) A pH-responsive coiled-coil peptide hydrogel. *Soft Matter* **7**(21), 10210. <https://doi.org/10.1039/C1SM06261A>
- Garland SM (2003) Imiquimod. *Curr Opin Infect Dis* **16**, 85. <https://10.1097/00001432-200304000-00004>
- Goldsby R, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J (2003) Cells and Organs of the Immune System. U: Immunology, 5. izd., W. H. Freeman and Company, New York, str. 24-56.
- Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK (1993) Adjuvants – a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* **11**, 293-306.e3. [10.1016/0264-410x\(93\)90190-9](https://doi.org/10.1016/0264-410x(93)90190-9)
- Gupta AK, Browne, M, Blubm R (2002) Imiquimod: A review. *J Cutan Med Surg* **6**, 554. <https://doi.org/10.1007/s10227-001-0134-6>
- Habjanec L, Frkanec R, Halassy B, Tomašić J (2006) Effect of liposomal formulations and immunostimulating peptidoglycan monomer on the immune reaction to ovalbumin in mice, *J Lip Research* **16**, 1-16.e3. [10.1080/08982100500528537](https://doi.org/10.1080/08982100500528537)
- Halassy Špoljar B, Cimbor T, Hanzl-Dujmović I, i sur. (2002) Influence of adjuvant-active peptidoglycan monomer on specific T cell responses in mice. *Vaccine* **20**, 3543–50.e3. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00336-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00336-5)
- Halassy B, Krstanović M, Frkanec R, Tomašić J (2003) Adjuvant activity of peptidoglycan monomer and its metabolic products. *Vaccine* **21**, 971-976.e3. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00547-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00547-9)

Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI (2002) Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. *PNAS* **99(8)**, 5133-5138.e3. <https://doi.org/10.1073/pnas.072699999>

Hršak I, Ljevaković Đ, Tomašić J, Vranešić B (1994) Preparation, properties and biological activity of tert-butyloxycarbonyl-L-thyrosyl peptidoglycan monomer. U: Masihi N (ured.) *Immunotherapy of Infection*, Marcel Dekker, Inc., New York/Basel/Hong Kong, str. 249-257. <https://blog.praxilabs.com/2021/09/20/elisa-principle/>. Pristupljeno 10. studenog 2022.

Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, Kita M, Ogura Y, Honda Y (1994) Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym Ed.* **5**, 397-406.e3. <https://doi:10.1163/156856294x00103>.

Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, i sur. (2008) A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection, *J. Control. Release* **131**, 113–120, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.07.025>.

Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, Vekemans J, Vincart B, Amraoui Z, Van Laethem F, Goldman M, Dubois PM (2002) Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol* **168(2)**, 926-32.e3. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.926.

Ioannou XP, Gomis SM, Karvonen B, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S (2002) CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein. *Vaccine* **21**, 127-37.e3. [https://doi:10.1016/s0264-410x\(02\)00378-x](https://doi:10.1016/s0264-410x(02)00378-x).

Johnston D, Bystryn JC (2006) Topical imiquimod is a potent adjuvant to a weakly-immunogenic protein prototype vaccine. *Vaccine* **24**, 1958-1965.e3. <https://doi:10.1016/j.vaccine.2005.10.045>.

Jorritsma SHT, Gowans EJ, Grubor Bauk B, Wijesundara DK (2016) Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. *Vaccine* **34**, 5488-5494.e3. [10.1016/j.vaccine.2016.09.062](https://doi:10.1016/j.vaccine.2016.09.062).

Juang JH, Bonner WS, Ogawa YJ, Vacanti P, Weir GC (1996) Outcome of subcutaneous islet transplantation improved by polymer device. *Transplantation* **61**, 1557-1561.e3. <https://doi:10.1097/00007890-199606150-00001>.

- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T Cell response? *Immunology* **123**, 326-38.e3. <https://doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x>
- Keglević D, Ladešić B, Tomašić J, Valinger Z, Naumski R (1979) Isolation procedure and properties of monomer unit from lysozyme digest of peptidoglycan complex excreted into the medium by penicillin-treated *Brevibacterium divaricatum* mutant. *Biochim Biophys Acta* **585**, 273-281.e3. [https://doi:10.1016/0304-4165\(79\)90027-8](https://doi:10.1016/0304-4165(79)90027-8).
- Kensil C, Patel C, Lennick M, Marciani D (1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria*, Molina cortex. *J Immunol* **146**, 431-437.e3. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.2.431>
- Korsholm KS, Agger EM, Foged C, Christensen D, Dietrich J, Andersen CS, Geisler C, Andersen P (2007) The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes. *Immunology* **121**, 216–26.e3. <https://doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02560.x>
- Kour P, Rath G, Sharma G, Goyal AK (2018) Recent advancement in nanocarriers for oral vaccination. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **46(3)**, 1102-1114.e3. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1533842>
- Lindblad EB (2004) Aluminium adjuvants – in retrospect and prospect. *Vaccine* **20**, 3658-3668.e3. <https://doi:10.1016/j.vaccine.2004.03.032>
- Liu C, Zhang Q, Zhu S, Liu H, Chen J (2019) Preparation and applications of peptide-based injectable hydrogels. *RSC Adv.* **9**, 28299–28311.e3. <https://doi.org/10.1039/C9RA05934B>
- Lopez-Silva TL, Leach DG, Azares A, Li IC, Woodside DG, Hartgerink JD, (2020) Chemical functionality of Multidomain Peptide Hydrogels governs early host immune response. *Biomaterials* **231**, 119667.
- Luo Z, Wu Q, Yang C, Wang H, He T, Wang Y, Wang Z, Chen H, Li X, Gong C, Yang Z (2016) A Powerful CD8+ T-Cell Stimulating D-Tetra-Peptide Hydrogel as a Very Promising Vaccine Adjuvant. *Adv Mater* **29(5)**. <https://doi.org/10.1002/adma.201601776>
- Ma W, Chen M, Kaushal S, McElroy M, Zhang Y, Ozkan C, Bouvet M, Kruse C, Grotjahn D, Ichim T (2012) PLGA nanoparticle-mediated delivery of tumor antigenic peptides elicits effective immune responses. *Int J Nanomedicine* **7**, 1475–87. <https://doi:10.2147/IJN.S29506>



Marco-Dufort B, Janczy JR, Hu T, Lutolf M, Gatti F, Wolf M, Woods A, Tetter S, Sridhar BV, Tibbitt MW (2022) Thermal stabilization of diverse biologics using reversible hydrogels. *Sci Adv* **8**(31). [https://doi: 10.1126/sciadv.abo050](https://doi.org/10.1126/sciadv.abo050).

Margolick JB, Markham RB, Scott AL (2006) *Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice*. U: Nelson KE, Masters CF (ured.) The immune system and host defense against infections, Jones and Bartlett, Boston, str. 317–43.

Martin M, Michalek SM, Katz J (2003) Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infect Immun* **71**, 2498-2507.e3. [https://doi:10.1128/IAI.71.5.2498-2507.2003](https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2498-2507.2003)

Meshcheryakova E, Makarov E, Philpott D, Andronova T, Ivanov V (2007) Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophylic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine* **25**, 4515–20.e3. [https://doi: 10.1016/j.vaccine.2007.04.006](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.006)

Milla P, Dosio F, Cattell L (2012) PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Curr Drug Metab* **13**(1), 105-19.e3. [https://doi: 10.2174/138920012798356934](https://doi.org/10.2174/138920012798356934).

Mondal S, Das S, Nandi AK (2020) A Review on Recent Advances in Polymer and Peptide Hydrogels. *Soft Matter* **16**, 1404-1454.e3. [https://doi: 10.1039/C9SM02127B](https://doi.org/10.1039/C9SM02127B)

Moore AN, Hartgerink JD (2017) Self-Assembling Multidomain Peptide Nanofibers for Delivery of Bioactive Molecules and Tissue Regeneration. *Acc Chem Res* **50**(4), 714-722.e3. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00553>

Moreira LO, Smith AM, DeFreitas AA, Qualls JE, El Kasmi KC, Murray PJ (2008) Modulation of adaptive immunity by different adjuvant-antigen combinations in mice lacking Nod2. *Vaccine* **26**, 5808–13.e3. [https://doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.038](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.08.038)

Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Bawab AA, Alshaer W (2022) Liposomes: structure, composition, types, and clinical application. *Heliyon* **8**(5). [https://doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394).

Omar J, Ponsford D, Dreiss CA, Lee TC, Loh XJ (2022) Supramolecular Hydrogels: Design Strategies and Contemporary Biomedical Applications. *Chemistry* **17**(9). <https://doi.org/10.1002/asia.202200081>.

O'Reilly T, Zak O (1992) Enhancement of the effectiveness of antimicrobial therapy by muramyl peptide immunomodulators. *Clin Infect Dis* **14** (5), 1100-1109.e3. <https://doi.org/10.1093/clinids/14.5.1100>

Paradossi G, Cavalieri F, Chiessi E, Spagnoli C, Cowman MK (2003) Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, 687-691.e3. <https://doi.org/10.1023/A:1024907615244>

Paul WE, Zhu J (2010) How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* **10**, 225-35.e3. [10.1038/nri2735](https://doi.org/10.1038/nri2735)

Perrie Y, Crofts F, Devitt A, Griffiths HR, Kastner E, Nadella V (2016) Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines. *Adv Drug Deliver Rev* **99**, 85-96.e3. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.005>.

Pham SH, Choi Y, Choi J (2020) Stimuli-Responsive Nanomaterials for Application in Antitumor Therapy and Drug Delivery. *Pharmaceutics* **12**(7), 630. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070630>

Pospišil T, Ferhatović Hamzić L, Brkić Ahmed L, Lovrić M, Gajović S, Frkanec L (2016) Synthesis, characterization and in vitro biocompatibility assessment of a novel tripeptide hydrogelator, as a promising scaffold for tissue engineering application. *Biomater Sci* **4**, 1412-1416.e3. <https://doi.org/10.1039/C6BM00287K>

Reches M, Gazit E (2006) Designed aromatic homo-dipeptides: formation of ordered nanostructures and potential nanotechnological applications. *Phys Biol* **3**, 10. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/3/1/S02>

Schwendener RA (2014) Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* **2**(6), 159-182.e3. <https://doi.org/10.1177/2051013614541440>

Sexton A, Whitney PG, Chong SF, et al. (2009) A protective vaccine delivery system for in vivo T cell stimulation using nanoengineered polymer hydrogel capsules, *ACS Nano* **3**, 3391-3400. <https://doi.org/10.1021/nn900715g>.

Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, Singh M, O'Hagan DT, Pétrilli V, Tschopp J (2009) Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**, 870-5.e3. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804897106>.

Stanley MA (2002) Imiquimod and the imidazoquinolones: Mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol* **27**, 571. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2002.01151.x>

Stewart-Tull DES (1989) Recommendations for the assessment of adjuvants (immunopotentiators). U: Gregoriadis, G., Allison, A. C., Poste, G. (ured.) Immunological adjuvants and vaccines, Plenum Publishing Corporation, New York, str. 213-226.

Tijssen P (1985) Practise and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, str. 123-221.

Tokenzero (2020) Schematic diagram of an antibody (immunoglobulin). [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antibody\\_basic\\_unit.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antibody_basic_unit.svg). Pristupljeno 13. siječnja 2023.

Tomai MA, Imbertson LM, Stanczak TL, Tygrett LT, Waldschmidt TJ (2000) The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cell Immunol* **203**, 55–65.e3. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1673>

Torchilin VP (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 145–160.e3. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>

Traub S, von Aulock S, Hartung T, Hermann C (2006) MDP and other muropeptides- direct and synergistic effects on the immune system. *J Endotoxin Res* **12** (2), 69-85.e3. <https://doi.org/10.1179/096805106X89044>

Valinger Z, Ladešić B, Hršak I, Tomašić J (1987) Relationship of metabolism and immunostimulating activity of peptidoglycan monomer in mice after three different routes of administration, *Int. J Immunopharmac* **9**, 325-332. e3. [10.1016/0192-0561\(87\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0192-0561(87)90057-9)

Varol C, Mildner A, Jung S (2015) Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol* **33**, 643-675.e3. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>

Vidal D (2006) Topical Imiquimod: Mechanism of Action and Clinical Applications. *Mini Rev Med Chem* **6**, 499. <https://doi.org/10.2174/138955706776876131>

Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T (2014) IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol* **5**, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>

Weeratna RD, McCluskie MJ, Xu Y, Davis HL (2000) CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* **18**, 1755-1762.e3. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00526-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00526-5)

- Wen Y, Waltman A, Han H, Collier JH (2016) Switching the immunogenicity of peptide assemblies using surface properties. *ACS Nano* **10(10)**, 9274–9286.e3. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03409>
- Woodard LF (1990) Surface chemistry and classification of vaccine adjuvants and vehicles. U: Mizraki, A. (ured.) *Bacterial Vaccines*, Alan R. Liss, Inc., New York, str. 281-306.
- Xue X, Hu Y, Deng Y, Su J (2021) Recent Advances in Design of Functional Biocompatible Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Adv Funct Mater* **31(19)**, 2009432. [10.1002/adfm.202009432](https://doi.org/10.1002/adfm.202009432)
- Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, Takada H (2001) Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide of lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun* **69**, 2045. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2045-2053.2001>
- Yotsumoto S, Aramaki Y, Kakiuchi T, Tsuchiya S (2004) Induction of antigen-dependent interleukin-12 production by negatively charged liposomes encapsulating antigens. *Vaccine* **22**, 3503-3509.e3. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.071>
- Zhang Y, Hu Z, Li X, Ding Y, Zhang Z, Zhang X, Zheng W, Yang Z, (2022) Amino acid sequence determines the adjuvant potency of a D-tetra-peptide hydrogel, *Biomater Sci* **10**, 3092.
- Zichao L, Qinjie W, Chengbiao Y, Huaimin W, Tao H, Youzhi W, Zhongyan W, Hao C, Xingyi L, Changyang G, Zhimou Y (2016) A Powerful CD8+ T-Cell Stimulating D-Tetra-Peptide Hydrogel as a Very Promising Vaccine Adjuvant. *Adv Mater* **29(5)**. <https://doi.org/10.1002/adma.201601776>.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Marija Ninković izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

