



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δι-ιδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Ανόργανη Βιολογική Χημεία»

Βάσιλα Μαρία

Μελέτη Αυτο-οργάνωσης Υβριδικών Μορίων Πεπτιδίων- Πορφυρινών

Εργαστήριο Φυσικών Βιοϋλικών

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Καθηγήτρια Μητράκη Άννα

Συνεπιβλέπων Καθηγητής: Καθηγητής Κουτσολέλος Αθανάσιος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ηράκλειο 2021

Ευχαριστίες:

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας και στο Εργαστήριο Φυσικών Βιοϋλικών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης με επιβλέπων καθηγητή τον κύριο Κουτσολέλο Αθανάσιο και συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια την κυρία Μητράκη Άννα. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουτσολέλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να είμαι μέρος του συγκεκριμένου Μεταπτυχιακού Προγράμματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ότι θα ανταπεξέλθω στις αυξημένες απαιτήσεις του. Στην συνέχεια οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην καθηγήτρια μου κυρία Μητράκη, η οποία υπήρξε δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια αυτών των δύο χρόνων που δουλεύω πάνω στην Μεταπτυχιακή μου διατριβή, καθώς και όταν αρχικά με εμπιστεύτηκε να πραγματοποιήσω την πρακτική μου άσκηση καθώς και την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό της. Ακόμη την ευχαριστώ για την επικοινωνία μας, για την υπόδειξη του θέματος της εργασίας μου καθώς και γιατί παρακολουθούσε κάθε βήμα της εργασίας μου αλλά και της εξέλιξης μου. Τέλος κατεύθυνε οποιαδήποτε προσπάθεια μου πιστεύοντας πάντα σε εμένα και στις ικανότητες μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος»: την κυρία Αλέκα Μανουσάκη, για την βοήθεια και την υπομονή που υπέδειξε με τα δείγματα μου κατά την διάρκεια της παρατήρησης στα Ηλεκτρονικά Μικροσκόπια Σάρωσης και τον κύριο Στέφανο Παπαδάκη για την βοήθεια στην προετοιμασία των δειγμάτων μου.

Δεν θα μπορούσα φυσικά να ξεχάσω τα άτομα που με βοήθησαν να ολοκληρώσω την παρούσα εργασία.

Εξέχοντα ρόλο για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας είχε επίσης και η δόκτωρ Κοκοτίδου Χρυσούλα, που χωρίς την επιστημονική της βοήθεια δεν θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω την παρούσα εργασία. Ήταν πάντα δίπλα μου από την πρώτη στιγμή που μπήκα στο εργαστήριο και θα είναι πάντα πολύτιμη συνεργάτιδα και φίλη. Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τους υποψήφιους διδάκτορες Χρυσάνθη-Πηνελόπη Αποστολίδου και Γιώργο Νηστικάκη για την συνεχόμενη βοήθεια τους και στήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Ήταν πάντα δίπλα μου και θα είναι πάντα αγαπημένοι συνεργάτες και φίλοι.

Ακόμη δεν θα ήθελα να ξεχάσω να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Φυσικών Βιοϋλικών: την Δόκτωρ Χρυσούλα Κοκοτίδου, την υποψήφια διδάκτορα Χρυσάνθη-Πηνελόπη Αποστολίδου, τον υποψήφιο διδάκτορα Πέτρο Ντιβανάκ, τον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Νηστικάκη, την Κωνσταντίνα Μητροπούλου και την Κατερίνα-Ισμήνη Πετροπούλου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Μάνο Νικολουδάκη από το Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας για την σύνθεση του υβριδικού πεπτιδίου αλλά και την βοήθεια για οποιαδήποτε απορία ή πρόβλημα αντιμετώπισα στο κομμάτι των πορφυρινών.

Τέλος δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους σημαντικότερους ανθρώπους στην ζωή μου. Ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά τους γονείς μου, Γιώργο και Αθηνά καθώς και τον αδερφό μου, Νικόλα για την αγάπη τους και την υποστήριξη τους, την πίστη τους σε εμένα και στήριξη τους σε κάθε μου επιλογή όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη:

Η παρούσα Διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας και στο Εργαστήριο Φυσικών Βιοϋλικών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η ραγδαία ανάπτυξη της αναγεννητικής ιατρικής έχει ως αποτέλεσμα της την όλο και αυξανόμενη ανάγκη για δημιουργία υλικών τα οποία χαρακτηρίζονται ως βιοσυμβατά καθώς και εφαρμογών αυτών των καινοτόμων υλικών. Η συγκεκριμένη Διπλωματική εργασία είχε ως αντικείμενο της την μελέτη αμφίφιλων πεπτιδικών υλικών, τα οποία περιέχουν την προστατευτική ομάδα Fmoc και λιπαρά οξέα καθώς και τον έλεγχο της ικανότητας τους να αυτο-οργανώνονται στον χώρο καθιστώντας τα κατάλληλα υλικά για εφαρμογές στην βιοϊατρική και την ιστοτεχνολογία. Ακόμη σκοπός μας μέσω αυτής της εργασίας ήταν ο δομικός χαρακτηρισμός των αμφίφιλων αυτών μορίων και η δημιουργία υδρογελών με σκοπό την εγκαψυλίωση πορφυρινών μέσα σε αυτές και κατ'έπекταση την εγκαψυλίωση φαρμάκων για εφαρμογές στην φαρμακοβιομηχανία και την βιομηχανία των καλλυντικών. Τα συστήματα των πεπτιδικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν περιέχουν μια προστατευτική ομάδα Fmoc, η οποία προάγει τον σχηματισμό των υδρογελών και συνεισφέρει στην υδροφοβικότητα. Αποτελούνται ακόμη από λιπαρά οξέα, τα οποία αυξάνουν την αντιμικροβιακή δραστηριότητα, ευνοούν την μεταφορά μορίων και έχουν ιδιαίτερα οφέλη για χρήση σε δερμοκαλλυντικά. Τέλος εμπεριέχουν και το αμινοξύ της λυσίνης (Lys), η οποία έχει ζωτικό ρόλο όσον αφορά την πρωτεϊνοσύνθεση και το crosslinking σε πλήθος πρωτεϊνών. Επίσης πραγματοποιήθηκε η ένωση ενός από τα πεπτίδια μας με την πορφυρίνη TPP, με την χρήση της οποίας αυξήσαμε περισσότερο τον αντιμικροβιακό χαρακτήρα των ενώσεων μας. Για το σκοπό αυτής της μελέτης επιστρατεύτηκαν διάφορα συστήματα διαλυτών σε διαφορετικές αναλογίες και συγκεντρώσεις των πεπτιδικών μας υλικών. Ακόμη για την παρατήρηση των υλικών μας χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και φασματοφωτομετρίας, για καταφέρουμε να ελέγξουμε αν τα υλικά που δημιουργήσαμε είναι κατάλληλα συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων.

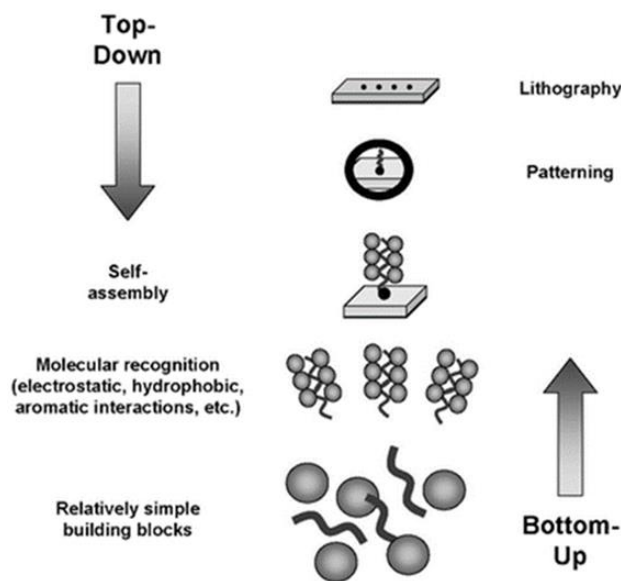
Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	4
A.Εισαγωγή.....	6
Αυτοοργάνωση.....	6
Αναδίπλωση Πρωτεϊνών.....	7
Πεπτίδια	8
Αμυλοειδή Ινίδια.....	9
Πορφυρίνες.....	12
Λιπαρά Οξέα.....	14
Υδρογέλες.....	16
B.Τεχνικές Χαρακτηρισμού.....	18
Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM).....	18
Στερεοσκοπικό Μικροσκόπιο.....	19
Χρώση με Congo Red.....	20
Γ. Μέθοδοι και Υλικά.....	21
Πεπτίδια.....	21
1.Fmoc-8-aminooctanoic acid.....	21
2. Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH.....	22
3.Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP.....	23
Προετοιμασία Δειγμάτων.....	24
1.Fmoc-8-aminoocatanoic acid.....	24
2.Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH.....	25
3.Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP.....	27
Ξήρανση Δειγμάτων σε Συνθήκες Ατμοσφαιρικού Αέρα.....	29
Congo Red Staining.....	30
Δ. Αποτελέσματα.....	31
Αποτελέσματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης Ηλεκτρονίων Εκπομπής Πεδίου (FE-SEM).....	31
1.Fmoc-8-aminooctanoic acid.....	31
2.Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH.....	40
3.Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP.....	69
Προετοιμασία Δειγμάτων και Αποτελέσματα Απελευθέρωσης Φαρμάκων(Drug Release).....	78
Αποτελέσματα Χρώσης Congo Red.....	85
Ε.Συζήτηση.....	88
Στ. Βιβλιογραφία.....	91

A. Εισαγωγή:

Αυτοοργάνωση:

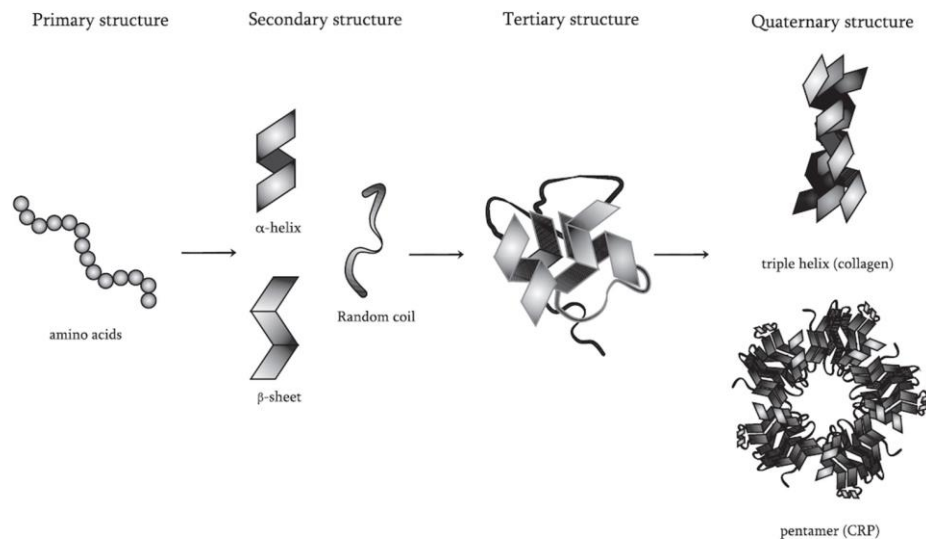
Ως αυτοοργάνωση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία τα απλά δομικά στοιχεία ενός συστήματος οργανώνονται σε καλά καθορισμένες και λειτουργικές τρισδιάστατες δομές με μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Η οργάνωση αυτή είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων των δομικών λίθων του κάθε συστήματος που μελετάται, οι οποίες είναι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις αρωματικές, υδροφοβικές ή ηλεκτροστατικές, δεσμοί υδρογόνου ή π-π stacking. Κατά την αυτοοργάνωση οι δομικοί λίθοι "συναρμόζονται" έτσι ώστε να προκύψει μια τρισδιάστατη υπερμοριακή δομή με την βοήθεια της μοριακής αναγνώρισης. Εξίσου σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα της διαδικασίας της αυτοοργάνωσης, δηλαδή στις δομές που προκύπτουν, παίζει και το περιβάλλον του συστήματος δηλαδή οι διαλύτες, η θερμοκρασία καθώς και η συγκέντρωση αλλά και τα χαρακτηριστικά των δομικών στοιχείων των δομών. Ως bottom-up ορίζουμε την φυσική και αυθόρμητη διαδικασία και σε αυτό το μοντέλο στηρίζονται πολλές διεργασίες που συναντάμε στα βιολογικά συστήματα και οι οποίες είναι συνυφασμένες με τον ορισμό της ζωής. Αντίθετα ως top-down προσέγγιση χαρακτηρίζουμε την διαδικασία η οποία δεν είναι αυθόρμητη, αναφέρεται σε τεχνικές κατεργασίας από τον άνθρωπο, πχ. χρησιμοποιώντας μικροτεχνικές λιθογραφίας.¹



Εικόνα 1: Απεικόνιση των bottom-up και top-down προσεγγίσεων **Plenty of Room for Biology at the Bottom: An introduction to Biotechnology** Ehud Gazit, Anna Mitraki, **2013**

Αναδίπλωση Πρωτεϊνών:

Οι πρωτεΐνες είναι τα γραμμικά πολυμερή των αμινοξέων, τα οποία μέσω της μετάφρασης του mRNA κωδικοποιούνται από το κάθε γονίδιο το οποίο καθορίζει την αλληλουχία τους. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών σε σταθερές τρισδιάστατες δομές αποτελεί αυθόρμητη διαδικασία. Οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να ξεδιπλώνονται σε αραιά διαλύματα, υποδεικνύοντας ότι από μόνη της η αλληλουχία της πρωτεΐνης είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη για την αναδίπλωσή της². Τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς ως προς τον σχηματισμό των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οι οποίες αποτελούν την πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Στη φύση, η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα των κυττάρων και χρησιμοποιούνται τα L-εναντιομερή των αμινοξέων. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει την ικανότητα αναδίπλωσης σε κανονικές δομές όπως οι α-έλικες, οι β-πτυχώσεις, οι στροφές και οι θηλιές (δευτεροταγής δομή). Τα δομικά στοιχεία της δευτεροταγούς δομής όταν αναδιπλωθούν στο χώρο δημιουργούν μία συμπαγή δομή (τριτοταγής δομή). Όσον αφορά στις πρωτεΐνες, που αποτελούνται από περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες, εμφανίζεται η τεταρτοταγής δομή στην οποία τα πολυπεπίδια που συγκροτούν την πρωτεΐνη (υπομονάδες) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και συγκρατούνται κυρίως με μη ομοιοπολικούς δεσμούς.³



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των δομικών στοιχείων των πρωτεϊνών. Herczenik and Gebbink, **FASEB Journal**, Vol. 22, 2008, 2115-2133

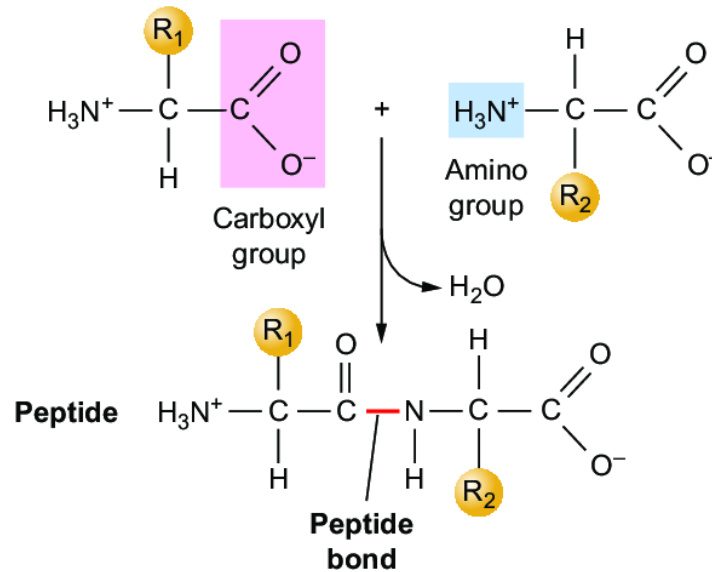
Η διαδικασία αναδίπλωσης αποτελεί μια γρήγορη διαδικασία, κατά την οποία μπορούν να συμμετέχουν μία ή περισσότερες μερικώς αναδιπλωμένες ενδιάμεσες καταστάσεις παροδικά μέχρι τον σχηματισμό της τελικής δομής. Σημαντικό στάδιο στη διαδικασία της αναδίπλωσης είναι η μετάπτωση σε μία μερικώς οργανωμένη σφαιρική κατάσταση γνωστή ως «εύπλαστη σφαίρα». Το στάδιο αυτό είναι σύντομο σε διάρκεια και σε αυτό εμπεριέχονται το μεγαλύτερο μέρος της δευτεροταγούς δομής καθώς και σε μερικές περιπτώσεις οι α -έλικες και οι β -πτυχώσεις κατέχουν τις ίδιες εκείνες θέσεις που κατέχουν και στη φυσική κατάσταση. Η αναδιπλωμένη κατάσταση μίας πρωτεΐνης είναι ενεργειακά ευνοϊκότερη από την μη αναδιπλωμένη κατάσταση, με μικρή ενεργειακή διαφορά (5-15 kcal/mol). Σε αυτό συμβάλλουν οι διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις όπως οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης, οι γέφυρες άλατος, οι δεσμοί υδρογόνου, οι μεγάλου εύρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Σημαντικό ρόλο παίζει ακόμα το φαινόμενο της υδροφοβικότητας, που οδηγεί τα 7 υδρόφοβα αμινοξέα στο εσωτερικό των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, ενώ στην περίπτωση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε υδρόφοβο περιβάλλον (π.χ. μεμβράνες) εμφανίζεται αντίθετη κατανομή αμινοξέων.^{3,4}

Οι πρωτεΐνες, στην πορεία για να φτάσουν στη φυσική τους κατάσταση, περνούν από διάφορες ενδιάμεσες ενεργειακές καταστάσεις οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη διαμόρφωση τους. Ο εγκλωβισμός των πρωτεϊνών σε ένα τέτοιο ενεργειακό ενδιάμεσο αποτελεί μία ενδογενή τάση των πρωτεϊνών. Η αμινοξική αλληλουχία καθώς και συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορούν να επάγουν την λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Επιπλέον περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως αύξηση της θερμοκρασίας, υψηλό/χαμηλό pH, ανακίνηση (agitation), ή οξειδωτικοί παράγοντες επηρεάζουν την αναδίπλωση. Η λανθασμένη αναδίπλωση δεν αποτελεί ενεργειακά ευνοϊκή κατάσταση, όποτε οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε μία τέτοια κατάσταση έχουν την τάση να συσσωματώνονται.⁵

Πεπτίδια:

Πεπτίδια ορίζουμε τις χημικές ενώσεις οι οποίες προκύπτουν από την ένωση δύο ή περισσότερων αμινοξέων που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς, δημιουργώντας μία αλυσίδα μορίων. Ο πεπτιδικός ή αμιδικός δεσμός αποτελεί έναν ομοιοπολικό δεσμό, στον οποίο η καρβοξυλική ομάδα του ενός αμινοξέος αντιδρά με την αμινική ομάδα του επόμενου, απελευθερώνοντας ένα μόριο νερού. Στη διαδικασία σχηματισμού των πεπτιδίων μπορούν να συμμετάσχουν και τα 20 αμινοξέα τα οποία αποτελούν τους δομικούς λίθους των πρωτεϊνών. Με βάση το μέγεθος μπορούμε να διακρίνουμε τα πεπτίδια από τις πρωτεΐνες, καθώς γνωρίζουμε ότι μία πρωτεΐνη συνήθως αποτελείται από περισσότερα από 50 αμινοξέα, γεγονός που τείνει να κάνει την σύνθεση των πρωτεϊνών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά σε μοριακό επίπεδο μια δύσκολη διαδικασία. Αυτό έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στην ευρεία σύνθεση πεπτιδίων, τα οποία αποτελούνται από συγκεκριμένες αλληλουχίες και κατ'επέκταση

συγκεκριμένες ιδιότητες, με σκοπό τη δημιουργία «έξυπνων» λειτουργικών υλικών, αποκρινόμενα σε εξωτερικά ερεθίσματα (pH, θερμοκρασία, ιοντική ισχύ κ.α.), στη μικρο- και νάνο- κλίμακα.⁶



Εικόνα 3: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού The Chemical Structure of Proteins In book: **The Evolution of Molecular Biology** (pp.19-31) Kensal E. van Holde Jordanka Zlatanova, 2018

Αμυλοειδή Ινίδια:

Τα πιο σημαντικά παραδείγματα συσσωμάτωσης πρωτεϊνών που έχουν παρατηρηθεί είναι τα σωμάτια εγκλεισμού (inclusion bodies) και τα αμυλοειδή ινίδια.

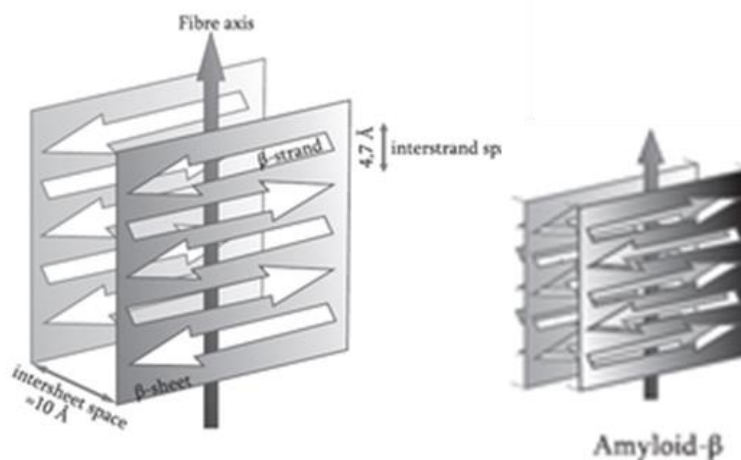
Τα σωμάτια εγκλεισμού αποτελούν σύνηθες αποτέλεσμα της υπερέκφρασης μίας ετερόλογης πρωτεΐνης σε βακτηριακά συστήματα υπερέκφρασης όπως τα *E.coli*. Είναι άμορφα πορώδη συσσωματώματα, τα οποία αποτελούνται σε ποσοστό κατά 70-95% από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Ακόμη αποτελούν συστήματα τα οποία καταφέρνουν να διατηρήσουν σε μεγάλο ποσοστό στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης και σε μερικές περιπτώσεις, τη βιολογική τους ενεργότητα.

Η δεύτερη μορφή συσσωμάτωσης που συναντάμε στα βιολογικά συστήματα, τα αμυλοειδή ινίδια σχηματίζονται όταν πεπτίδια ή πρωτεΐνες, που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι διαλυτές, αλλά τελικά σε ορισμένες συνθήκες συσσωματώνονται σε αδιάλυτες, μη αποικοδομήσιμες ίνες. Τα αμυλοειδή ινίδια αποτελούν μακριές ραβδοειδείς δομές οι οποίες απαρτίζονται από παράλληλες ή αντιπαράλληλες β-πτυχώσεις κάθετες στον άξονα της ίνας, με απόσταση μεταξύ των πτυχώσεων $4,7\text{\AA}$ και απόσταση μεταξύ των πτυχωτών φύλλων περίπου 10\AA .^{7,8}

Τόσο τα σωμάτια εγκλεισμού όσο και τα αμυλοειδή ινίδια είναι αποτέλεσμα εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων που έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των πρωτεϊνικών αλυσίδων. Ως υλικά, εμφανίζουν μεγάλη μηχανική και χημική σταθερότητα, είναι ανθεκτικά στην αύξηση θερμοκρασίας και στην παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων.⁹

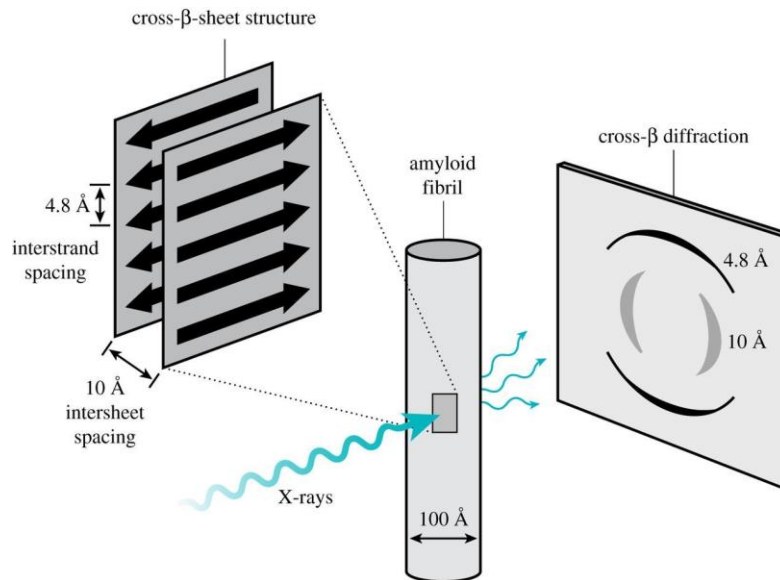
Η ταυτοποίηση των αμυλοειδών ινιδίων, μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους όπως για παράδειγμα με ανάλυση ακτίνων-Χ, χρώση με Congo Red, ηλεκτρονική μικροσκοπία κ.α.

Τα ινίδια, αφού προετοιμαστούν κατάλληλα και γίνει η χρώση τους με την χρωστική Congo Red παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική κίτρινο-πράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή. Από την άλλη, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με πειράματα περίθλασης ακτίνων-Χ και αφορούν ευθυγραμμισμένα ινίδια, αποκάλυψαν ότι τα ινίδια αυτά σχηματίζουν διασταυρωμένες β δομές (cross-β).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός αμυλοειδούς ινιδίου (αριστερά) και των αμυλοειδών πλακών του Αβ πεπτιδίου της νόσου Alzheimer (δεξιά). Herczenik and Gebbink, **FASEB Journal**, Vol. 22, **2008**, 2115-2133

Από το περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ για τα ευθυγραμμισμένα ινίδια παρατηρούμε την ύπαρξη μίας μεσημβρινής ανάκλασης στα $\sim 4.7 \text{ \AA}$, η οποία είναι παράλληλη στον άξονα της ίνας και μίας ισημερινής ανάκλασης στα $\sim 10 \text{ \AA}$, κάθετη στον άξονα της ίνας. Η απόσταση των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στις β-πτυχώσεις που στοιβάζονται κατά μήκος του άξονα ανάπτυξης της ίνας μπορεί να υπολογιστεί από την μεσημβρινή ανάκλαση, ενώ η απόσταση που οφείλεται στο πακετάρισμα των β-πτυχωτών φύλλων και εξαρτάται από τον όγκο των πλευρικών ομάδων υπολογίζεται από την ισημερινή ανάκλαση που μας δίνει το περιθλασίγραμμα.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση περιθλασιμετρίας ακτίνων-X σε ευθυγραμμισμένες ίνες καθώς και απεικόνιση του χαρακτηριστικού αποτυπώματός τους. Dharmadana D, Reynolds NP, Conn CE, Valéry C. Molecular interactions of amyloid nanofibrils with biological aggregation modifiers: implications for cytotoxicity mechanisms and biomaterial design. **Interface Focus.** 2017;7(4):20160160. doi:10.1098/rsfs.2016.0160

Τα αμυλοειδή ινίδια έχουν αρκετά μεγάλη σημασία όσον αφορά της ανθρώπινες ασθένειες και αυτό συμβαίνει γιατί η εναπόθεσή τους σε μαλακούς ιστούς, έχει παθογόνο επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό οδηγώντας στην εμφάνιση διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι το Alzheimer (Tau protein, Amyloid β peptide), η νόσος του Parkinson (α -Synuclein protein), ο διαβήτης τύπου II (Amylin peptide), η νόσος του Huntington (Huntingtin protein), η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια (Prion protein) κ.α.^{8,10,11,12}

Η νόσος του Huntington οφείλεται στην πάνω από 35 φορές επανάληψη της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων CAG που εντοπίζεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη huntingtin, ενώ ο φυσιολογικός αριθμός επαναλήψεων ανέρχεται στις 16 έως 20 φορές. Αυτή η επανάληψη της αλληλουχίας CAG κωδικεύει μία μακριά αλληλουχία πολυ-γλουταμίνης στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης huntingtin, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσωμάτωσή της σε τοξικές αμυλοειδείς ίνες.¹³

Η νόσος Alzheimer αποτελεί αποτέλεσμα της αυτο-οργάνωσης το πεπτιδίου amyloid- β (A β). Το συγκεκριμένο πεπτίδιο έχει μήκος 40-42 αμινοξέων, παράγεται από το κόψιμο της πρωτεΐνης Amyloid Precursor Protein (APP) και αυτο-οργανώνεται σε πλάκες αμυλοειδών ινιδίων στον εγκέφαλο των ασθενών. Σημαντικό μοτίβο αναγνώρισης για την αυτο-οργάνωση των συγκεκριμένων πλακών του πεπτιδίου A β αποτελεί η αλληλουχία KLVFFAE.^{5,14}

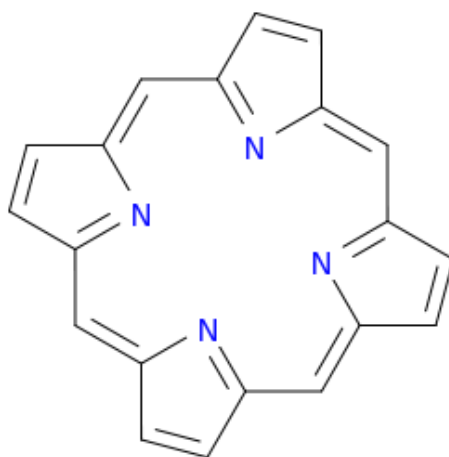
Βέβαια, τα αμυλοειδή ινίδια στη φύση δε συναντώνται μόνο ως αίτια παθογενειών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το ινώδες στέλεχος που συγκρατεί το αυγό του εντόμου *Chrysopa Flava*, το

οποίο αποτελείται από έχει αμυλοειδή διαμόρφωση και έτσι προσδίδει μηχανική αντοχή και προστασία του αυγού της *Chrysopa* από τους θύτες.^{15,7}

Πορφυρίνες:

Οι πορφυρίνες αποτελούν μακροκυκλικά συστήματα, τα οποία εμπεριέχουν τέσσερις πυρολικούς δακτυλίους, ενωμένους σε κυκλική διάταξη με τέσσερις ρίζες μεθινίου (=C-). Ανήκουν στις αρωματικές ενώσεις επομένως οι μακρόκυκλοι των πορφυρινών είναι εξαιρετικά συζυγή συστήματα, διαθέτουν πολύ έντονες ζώνες απορρόφησης στο ορατό φάσμα και αποτελούν χρωμοφόρα.

Στον πορφυρινικό δακτύλιο εντοπίζονται 22 ηλεκτρόνια τα οποία επιτρέπουν στο μόριο της πορφυρίνης να συμμετέχει σε ηλεκτρονιόφιλες αντιδράσεις και αντιδράσεις ριζών. Τα πυρρόλια τείνουν να προωθούν τις π-π αλληλεπιδράσεις στοιβαξης (π-π stacking) μεταξύ των μορίων των πορφυρινών και τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με άλλα μόρια, λόγω της ύπαρξης του αζώτου. Τα πυρολικά άζωτα, τα οποία εντοπίζονται στο εσωτερικό των πορφυρινών, προσδίδουν στην κάθε πορφυρίνη επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα. Ακόμη τα άζωτα αυτά χαρακτηρίζονται από sp^2 υβριδισμό. Τα 2 από αυτά προκαλούν τον σχηματισμό σ δεσμού με ένα υδρογόνο και το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων συνεισφέρει στην αρωματικότητα του μορίου. Από την άλλη τα εναπομείναντα άζωτα, που δεν συνδέονται με Η έχουν την δυνατότητα να προσφέρουν το ζεύγος των ηλεκτρονίων τους για συναρμογή με κάποιο μέταλλο. Οι πορφυρίνες μπορούν να συνδεθούν με όλα σχεδόν τα μέταλλα του Περιοδικού Πίνακα, αποτελούν άριστους υποκαταστάτες, και όταν δεν έχουν συζευχθεί με κάποιο μεταλλικό ιόν αντιμετωπίζονται ως ελεύθερες βάσεις.

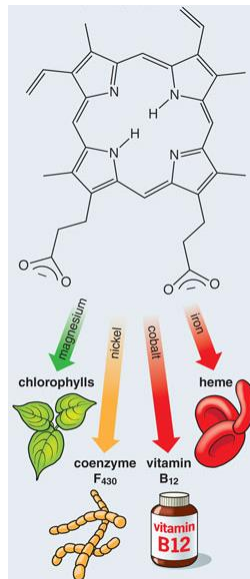


Εικόνα 6: Δομή πορφυρινικού δακτυλίου

Η πορφυρίνη συναντάται πολύ συχνά σε βιολογικά συστήματα ως βασικό κομμάτι της χλωροφύλλης των φυτών συμμετέχοντας σε φωτοχημικές αντιδράσεις καθώς και της αίμης της αιμογλοβίνης δεσμεύοντας το σίδηρο στο αίμα. Ακόμη αποτελεί τη χρωμοφόρο ομάδα της μυσσοφαιρίνης, της αιμοσφαιρίνης και τον κυτοχρωμάτων.

Ως χρωμοφόρα ένωση, η πορφυρίνη έχει τη δυνατότητα να απορροφά φως και να παρέχει ηλεκτρόνια. Η διαδικασία μετατροπής του φωτός σε ρεύμα αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την έρευνα των ηλιακών κελιών από φωτοευαίσθητα οργανικά μόρια. Για αυτό το λόγο η έρευνα έχει στραφεί και σε σύνθετα μόρια όπως πολυμερή πορφυρινών¹⁶, υβρίδια πορφυρίνης με carbon-nanohorns¹⁷ αλλά και βιολογικά μόρια, όπως κυκλικόι πολυσακχαρίτες¹⁸.

Μερικές από τις σπουδαιότερες εφαρμογές των συνθετικών πορφυρινών, οι οποίες έχουν καταγραφεί στην πρόσφατη έρευνα και βιβλιογραφία είναι η χρήση των συνθετικών πορφυρινών ως ανιχνευτές όγκων που εντοπίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και η χρήση τους στην απεικόνιση των όγκων καθώς και στην καταπολέμηση τους μέσω των σύγχρονων τεχνικών της πειραματικής φωτοδυναμικής θεραπείας (experimental photodynamic therapy)¹⁹. Ακόμη οι συνθετικές πορφυρίνες μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως φωτοευαίσθητοποιητές²⁰ και χημικοί αισθητήρες²¹. Επιπλέον παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες²², γεγονός πολύ σημαντικό για την χρήση τους στην σύγχρονη φαρμακοβιομηχανία. Τέλος έχουμε την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε τις συνθετικές πορφυρίνες σε dye-based ηλιακά φωτοβολταϊκά κύτταρα ως "αποθήκες" ενέργειας με τη μορφή φωτός²³.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της ένωσης του πρόδρομου μορίου της πορφυρίνης με διαφορετικά μέταλλα για την παραγωγή χρωστικών μορίων απαραίτητων για το μεταβολισμό σε διάφορους οργανισμούς. Η αίμη και η βιταμίνη B12 είναι ζωτικής σημασίας στα ζώα, η χλωροφύλλη στα φυτά και το συνένζυμο F430 σε βακτήρια επεξεργασίας μεθανίου FRANCK E. DAYAN, EMILIE A. DAYAN. Porphyrins: One Ring in the Colors of Life, **American Scientist**, VOLUME 99, NUMBER 3 PAGE 236, **MAY-JUNE 2011**

Λιπαρά Οξέα:

Τα λιπαρά οξέα είναι μια ομάδα των καρβοξυλικών οξέων με μακριές αλειφατικές αλυσίδες. Συχνά συνδέονται στο N-τελικό άκρο ή στην πλευρική αλυσίδα μια λυσίνης των πεπτιδίων. Ακόμη τα υπολείμματα κυστεΐνης μπορούν να τροποποιηθούν με λιπαρά οξέα για να παραχθούν τα αντίστοιχα παράγωγα θειοεστέρα.

Τα πεπτίδια τα οποία έχουν τροποποιηθεί με λιπαρά οξέα βρίσκουν χρήση σε διάφορες εφαρμογές, όπως αύξηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας ή παράταση της ημιζωής. Τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται συνήθως σε τέτοιες περιπτώσεις είναι το καπρυλικό οξύ (8 άτομα άνθρακα (C8), επίσης οκτανοϊκό οξύ), το καπρικό οξύ (10 άτομα άνθρακα (C10), γνωστό ως δεκανοϊκό οξύ), το λαυρικό οξύ (12 άτομα άνθρακα (C12)), το μυριστικό οξύ (14 άτομα άνθρακα (C14)), το παλμιτικό οξύ (16 άτομα άνθρακα (C16)) ή το στεατικό οξύ (18 άτομα άνθρακα (C18)).

Οι τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή τα τροποποιημένα με λιπαρά οξέα πεπτίδια είναι οι ακόλουθοι:

- ***Αύξηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας:***

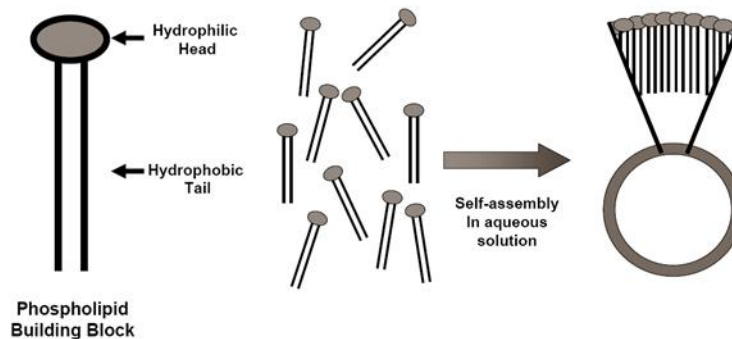
Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs), γνωστά ως και πεπτίδια άμυνας ξενιστή, είναι ικανά σκοτώνουν παθογόνα άμεσα ή έμμεσα. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια αποτελούν σύγχρονες και πολλά υποσχόμενες αντιμικροβιακές εναλλακτικές λύσεις για τη θεραπεία των λοιμώξεων. Πλήθος αντιμικροβιακών πεπτιδίων εξετάζονται σε εργαστηριακή κλίμακα, παρ' όλα αυτά ορισμένα εμπόδια εξακολουθούν να μην βοηθούν στην περαιτέρω ανάπτυξη των πεπτιδίων αυτών, όπως για παράδειγμα η χαμηλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα και η αστάθεια υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η εισαγωγή των λιπαρών οξέων στα αντιμικροβιακά αυτά πεπτίδια αυξάνει σημαντικά την αντιμικροβιακή τους δράση.²⁴

Από τις μελέτες που έχουν διεξαχθεί καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η σύζευξη λιπαρών οξέων με τα συγκεκριμένα πεπτίδια μπορεί να βελτιώσει τη χρησιμότητα των πεπτιδίων ως αντιμικροβιακών παραγόντων ενισχύοντας την ικανότητά τους να σχηματίζουν δευτερεύουσες δομές κατά την αλληλεπίδραση με τις βακτηριακές μεμβράνες.²⁵

- ***Παράταση του χρόνου ημιζωής των θεραπευτικών πεπτιδίων:***

Έρευνες έχουν δείξει ότι η σύζευξη των λιπαρών οξέων με θεραπευτικά πεπτίδια χρησιμοποιείται για την καθυστέρηση του ρυθμού απορρόφησης, την επέκταση της σταθερότητας των πεπτιδίων αυτών και την προστασία τους από την πρωτεόλυση.²⁶

- **Βελτίωση της μεταφοράς νουκλεϊκών οξέων από πεπτιδικούς μεταφορείς:**
Τα πεπτίδια που καταφέρνουν και διεισδύουν στα κύτταρα είναι μικρές αλληλουχίες αμινοξέων που χαρακτηρίζονται ως ικανά να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να μεταφέρουν ένα ευρύ φάσμα μορίων, συμπεριλαμβανομένων των DNA / RNA, διαφόρων πεπτιδίων, νανοσωματιδίων μέχρι και μεγάλων δραστικών πρωτεϊνών.²⁷ Η τροποποίηση των πεπτιδίων τα οποία μπορούν και διεισδύουν στα κύτταρα με λιπαρά οξέα χρησιμοποιείται για να βελτιώσει τις συνθήκες μεταφοράς των νουκλεϊκών οξέων, οποία πραγματοποιείται από τα συγκεκριμένα πεπτίδια.²⁸
- **Οφέλη στην περιποίηση δέρματος:**
Τα πεπτίδια διαθέτουν την ικανότητα να επάγουν συγκεκριμένες βιολογικές αποκρίσεις από καθορισμένες αλληλουχίες κάτω από in vitro συνθήκες. Τέτοια πεπτίδια μπορεί να είναι είτε φυσικά είτε συνθετικά πεπτίδια. Μητρικά (matrix) ονομάζουμε τα πεπτίδια που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας και τα πεπτίδια, τα οποία προέρχονται από αλληλουχίες του προκολλαγόνου I και της ελαστίνης χρησιμοποιούνται συνήθως στα προϊόντα περιποίησης δέρματος. Άλλα πεπτίδια έχουν σχεδιαστεί για την βελτίωση των ρυτίδων έκφρασης, όπως τα πεπτίδια που προέρχονται από την νευροτοξίνη αλλαντίασης, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην μέθοδο Botox.²⁹



Εικόνα 8: Plenty of Room for Biology at the Bottom: An introduction to Biotechnology E.Gazit, A.Mitraki, Imperial College Press, 2013, 216

Τα πεπτίδια, των οποίων η χρήση τους είναι ευρέως διαδεδομένη στα προϊόντα περιποίησης του δέρματος συνήθως λιπιδιώνονται μέσω της σύζευξης μιας αλυσίδας παλμιτοϋλικού οξέος, η οποία θεωρείται ότι βελτιώνει τη διαπερατότητα σε όλη τη περιοχή της κεράτινης στοιβάδας. Τα λιποπεπτίδια που προκύπτουν ταξινομούνται ως πεπτιδικά αμφίφιλα μόρια. Τα μόρια αυτά συνδυάζουν την βιοδραστικότητα, οποία προέρχεται από το πεπτιδικό μέρος τους, και τον ισχυρό αμφίφιλο χαρακτήρα, που τους προσίεται από την λιπιδική ουρά. Αυτή η μοριακή δομή προάγει την αυτοοργάνωση των μορίων αυτών σε ποικιλία συσσωματωμάτων όπως τα κυλινδρικά ινίδια, τα φύλλα, τα κυστίδια και τα μικκύλια. Η αυτοοργάνωση των αμφίφιλων πεπτιδίων στο νερό δημιουργεί συσσωματώματα, στα οποία οι λιπιδικές ουρές «κρύβονται» στον πυρήνα

και οι πεπτιδικές κεφαλές εκτίθονται στην εξωτερική επιφάνεια. Η συγκεκριμένη δομή αυτοοργάνωσης μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην *in vitro* βιοδραστικότητα αυτών των υλικών και βάσει αυτής της δομής να βρίσκουν εφαρμογές στη μηχανική ιστών και αναγεννητική ιατρική.^{30,31,32}

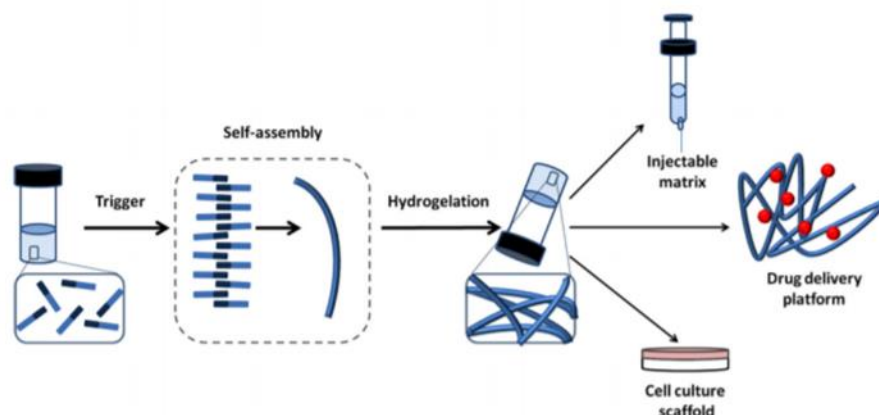
Υδρογέλες:

Υδρογέλες ορίζονται τα τρισδιάστατα πολυμερικά δίκτυα τα οποία δεν διαθέτουν ρευστή φάση και είναι ικανά να δεσμεύουν μεγάλες ποσότητες νερού. Οι υδρογέλες χωρίζονται σε χημικές και φυσικές. Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στο ότι στις χημικές υδρογέλες η δόμηση τους έχει προκληθεί από κάποιο ανάλογο παράγοντα, οποίος έχει επιφέρει την δημιουργία cross-linking και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών είναι ομοιοπολικής φύσης. Στις φυσικές υδρογέλες, από την άλλη μεριά, οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου, αρωματικές, υδροφοβικές, ηλεκτροστατικές, π-π stacking) μεταξύ των συστατικών του διαλύματος (συνθετικά πολυμερή, πολυσακχαρίτες, πεπτίδια, πρωτεΐνες) έχουν ως αποτέλεσμα την αυτοοργάνωση των υδρογελών.

Σχηματισμό υδρογελών παρατηρούμε συνήθως όταν σημειωθούν αλλαγές στις συνθήκες του διαλύματος (pH, θερμοκρασία, προσθήκη αλάτων, αλλαγή διαλύτη) και μπορούμε να χαρακτηρίσουμε αυτές τις υδρογέλες με ποικίλες μεθόδους όπως είναι η οπτική παρατήρηση οι ρεολογικές μελέτες, ο χαρακτηρισμός μέσω μικροσκοπίας και οι φασματοσκοπικές μελέτες. Οι φυσικές υδρογέλες ολιγοπεπτιδίων είναι κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν σε βιοιατρικές εφαρμογές καθώς είναι ενέσιμες, ελαστικές και βιοαποικοδομήσιμες, γεγονός που οφείλεται στο ότι οι πεπτιδικοί δεσμοί τους είναι ικανοί να διασπαστούν από τις πρωτεάσες του οργανισμού με αποτέλεσμα να απεκκρίνονται εύκολα από αυτόν.

Επιπλέον, οι υδρογέλες οι οποίες αποτελούνται από δίκτυα αμυλοειδών ινών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εγκαψυλίωση μικρών μορίων, φαρμάκων και ενζύμων με στόχο τη μεταφορά τους σε συγκεκριμένους ιστούς στόχους ως μοριακά «οχήματα». Έτσι επιτυγχάνουμε την προστασία των μορίων αυτών από παράγοντες όπως η θερμότητα και η ενζυμική αποδόμηση με το να βρίσκονται στο εσωτερικό των συγκεκριμένων υδρογελών (hydrogels).³³ Ακόμη οι υδρογέλες πεπτιδίων έχουν την ικανότητα να αυτορυθμίζονται και να απελευθερώνουν την δραστική ουσία με ελεγχόμενο ρυθμό απελευθέρωσης που εξαρτάται από τις συνθήκες pH, συγκέντρωσης αλάτων στον επιθυμητό ιστό.^{34,35} Επίσης χαρακτηρίζονται ως βιοσυμβατά συστήματα, συστήματα δηλαδή τα οποία λόγω των λειτουργικών τους ομάδων μπορούν να αποτελέσουν και ένα χημικά λειτουργικό gel το οποίο είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών.

Τέλος στα πλεονεκτήματα των υδρογελών συγκαταλέγονται ότι ορισμένες υδρογέλες εμφανίζουν αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές και αντικές ιδιότητες. Τέτοιες είναι οι υδρογέλες κατιονικών πολυμερικών δικτύων και δικτύων μειγμάτων πολυμερών οι οποίες έχουν συνδεθεί με ενώσεις που διαθέτουν αντιμικροβιακές και αντικές ιδιότητες όπως επιφανειοδραστικά μόρια, νανοσωματίδια, πολικά λιπίδια και πολυπεπτίδια.³⁶



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού υδρογέλης από πεπτίδια. Αρχικά τα μονομερή βρίσκονται σε διάλυμα όπου μια αλλαγή στις συνθήκες πυροδοτεί την αλληλεπίδραση μεταξύ τους και παρατηρείται μείωση στην διαλυτότητα. Αποτέλεσμα αυτού είναι αυτοοργανωμένες ινώδεις δομές που σχηματίζουν υδρογέλες, οι οποίες αξιοποιούνται σε ποικιλία εφαρμογών. Fichman G, Gazit E. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: design of building blocks, physical properties, and technological applications. **Acta Biomater.** 2014 Apr;10(4):1671-82.

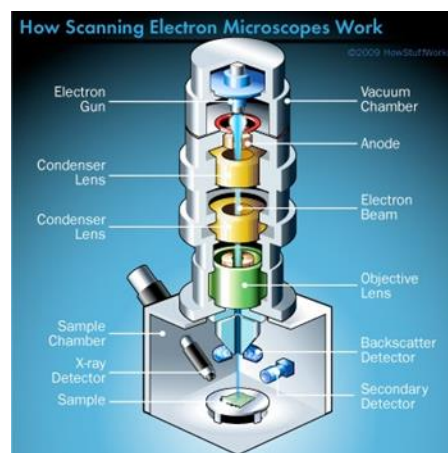
Ολιγοπεπτίδια με ελεύθερο το αμινοτελικό τους άκρο συνήθως δεν έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν υδρογέλες. Η σύνδεση τους, αντ' αυτού, με προστατευτικές ομάδες όπως οι fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), παράγωγα ναφθαλένιου (Nap), βενζοθειαζίνη (PTZ), καρβοξυβενζόλιο (Cbz), azoben-zene (Azo), πυρένιο (Pyr), σπιροπυράνιο ή cinnamoyl συμβάλει στην δημιουργία και τον σχηματισμό των υδρογελών –επιπλέον, και οι αρωματικές ομάδες που διαθέτουν συνεισφέρουν στις αλληλεπιδράσεις τύπου π-π stacking και στην υδροφοβικότητα.^{34,35}

Β.Τεχνικές Χαρακτηρισμού:

Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)

Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) χρησιμοποιήθηκε ώστε να παρατηρήσουμε την 3D μορφολογία των πεπτιδικών δειγμάτων μας και αν αυτά σχηματίζουν νανοδομές. Στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, το δείγμα σαρώνεται από μία δέσμη ηλεκτρονίων η οποία παράγεται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή εξαβοριούχου λανθανίου (LaB6).³⁷ Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, τα οποία δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση της πρωτογενούς δέσμης ηλεκτρονίων με την επιφάνεια του δείγματος, συλλέγονται από ανιχνευτές και καθ' αυτόν τον τρόπο παράγεται εικόνα. Η ανάλυση του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης είναι περίπου 5 nm. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν υπό κενό και έπρεπε να είναι στεγνά πριν την παρατήρηση.

Στην περίπτωση που το μικροσκόπιο SEM δεν μπορεί να αναπεξέλθει στην απεικόνιση του δείγματος, το μικροσκόπιο FESEM (Filled Emission Scanning Electron Microscopy) έχει δυνατότητα καλύτερης ανάλυσης και κατά συνέπεια δίνει φωτογραφίες σε πιο μεγάλη μεγέθυνση από το SEM, ενώ μπορεί να λειτουργήσει σε χαμηλότερες τάσεις.



Τα πεπτιδικά μας δείγματα εναποτέθηκαν πάνω σε γυάλινα πλακίδια και στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ξηρά δείγματα επικαλύφθηκαν με 15 nm χρυσού χρησιμοποιώντας ένα όργανο επιμετάλλωσης τύπου BALTEC SCD 050. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση είναι το JEOL JSM-6390LV, το οποίο βρίσκεται στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, και λειτουργεί στα 15 kV

Στερεοσκοπικό Μικροσκόπιο:

Το Στερεοσκοπικό Μικροσκόπιο ή Στερεοσκόπιο ανήκει στην κατηγορία των οπτικών μικροσκοπίων πράγμα που σημαίνει ότι για την δημιουργία εικόνας στο συγκεκριμένο μικροσκόπιο είναι απαραίτητο το ορατό φως. Η διαδικασία που ακολουθείται για την δημιουργία αυτής της εικόνας είναι αρκετά απλή. Αρχικά το φως ανακλάται πάνω στην επιφάνεια του αντικειμένου το οποίο επιθυμούμε να μελετήσουμε με αποτέλεσμα την δημιουργία της εικόνας η οποία καταλήγει στο οπτικό πεδίο του χρήστη από δύο διαφορετικά μονοπάτια. Οι δύο προσοφθάλμιοι φακοί που διαθέτει το μικροσκόπιο και οι δύο στόχοι προσφέρουν διαφορετικές γωνίες θέασης στον αριστερό και στον δεξί οφθαλμό αντίστοιχα και έτσι δημιουργείται το τελικό τρισδιάστατο ειδώλο που βλέπει ο χειριστής.

Η μεγέθυνση που μπορούμε να επιτύχουμε με ένα Στερεοσκόπιο είναι χαμηλή (μέχρι 100X) και μπορεί να γίνει είτε με αντικειμενικούς φακούς σταθερής εστιακής απόστασης, είτε με μεταβλητή μεγέθυνση σε συγκεκριμένη περιοχή (zoom). Και στις δύο περιπτώσεις, η ολική μεγέθυνση εξαρτάται από την απόδοση των προσοφθάλμιων φακών.



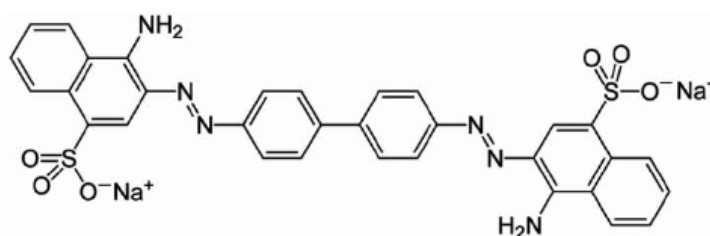
Εικόνα 10: Στερεοσκοπικό Μικροσκόπιο www.microscopeworld.com

Το συγκεκριμένο μικροσκόπιο, δίνει την δυνατότητα στον χειριστή να προσαρμόσει διάφορα εξαρτήματα, όπως κάμερα για καταγραφή των εικόνων και πολωτές. Οι διασταυρωμένοι πολωτές επιτρέπουν την διέλευση του φωτός σε καθορισμένες περιοχές με αποτέλεσμα τον φωτισμό συγκεκριμένων σημείων των δειγμάτων και τον συσκοτισμό των υπόλοιπων περιοχών. Χρησιμοποιούνται για δείγματα τα οποία εμφανίζουν χαρακτηριστική διπλοθλαστικότητα (οπτική ιδιότητα ενός ανισοτροπικού υλικού κατά την οποία ο δείκτης

διάθλασης μεταβάλλεται σε διαφορετικές περιοχές του), π.χ. αμυλοειδή ινίδια. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να ληφθούν συμπεράσματα σχετικά με τη δομή του δείγματος.

Χρώση με Congo Red- Congo Red Stain:

Το Congo Red αποτελεί μία αμφίφιλη ένωση, η οποία αποτελείται από δύο μόρια ναφθονικού οξέος συζευγμένα, μέσω αζωμαθών, με μία διφαινυλική ομάδα. Διαθέτει πολύ καλές οπτικές ιδιότητες, παρουσιάζοντας μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 490 nm (μπλε/πράσινο), αποδίδοντας ένα έντονο κόκκινο χρώμα.³⁸



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση δομής της χρωστικής Congo Red, Magnetic nanopowder as effective adsorbent for the removal of Congo Red from aqueous solution. O. Paşka, R. Ianoş, C. Păcurariu, A. Brădeanu, **Water Sci Technol** 1 March **2014**; 69 (6): 1234-1240.

Η ικανότητα ανίχνευσης των αμυλοειδών εναποθέσεων στους ανθρώπινους ιστούς είναι το πρώτο και πιο σημαντικό βήμα για τη διάγνωση της αμυλοείδωσης. Η χρώση Congo Red χρησιμοποιείται ευρέως σαν εύκολο και γρήγορο διαγνωστικό τεστ για την επιβεβαίωση της ύπαρξης αμυλοειδών εναποθέσεων και ινιδίων *in vitro*. Όταν τα αμυλοειδή ινίδια εμποτίζονται με την χρώση Congo Red, αποκτούν διάφορες αποχρώσεις του κόκκινου στο κανονικό φως, ενώ κάτω από διασταυρωμένο πολωτή, εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινό-πράσινη διπλοθλαστικότητα. Ουσιαστικά η χρωστική προσδένεται ανάμεσα στις β-πτυχώσεις, λόγω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να προσανατολίζεται παράλληλα στον άξονα της ίνας. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός πρόσδεσης δεν είναι ακόμα γνωστός.³⁹

Το διάλυμα που θα προετοιμάσουμε θα πρέπει να είναι αλκαλικό ή ελαφρώς όξινο για να έχουμε το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα της χρωστικής. Σε αντίθετη περίπτωση αν το διάλυμα μας είναι ισχυρού οξέος, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης δίνοντας μας πορτοκαλί/κίτρινο χρώμα το οποίο αποδίδεται σε ιώδες χρώμα.⁴⁰

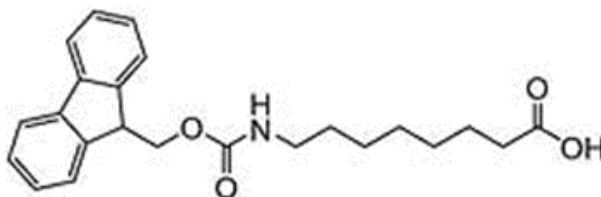
Γ. Μέθοδοι και Υλικά:

Πεπτίδια:

Τα πεπτίδια που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία είχαν την μορφή λυοφιλωμένης πεπτιδικής σκόνης υψηλής καθαρότητας σε ποσοστό >99% και χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα χωρίς κάποια άλλη χημική επεξεργασία όσον αφορά τη δομή τους.

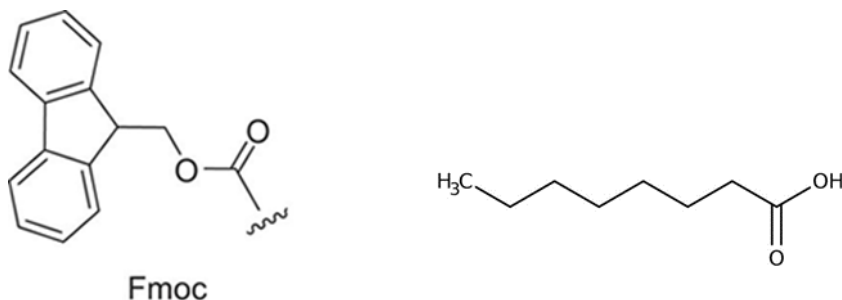
1. Fmoc-8-aminooctanoic acid

- Μοριακό Βάρος: 381.47 g/mol
- Χημική Δομή:



Εικόνα 12: Χημική Δομή **Fmoc-8-aminooctanoic acid**

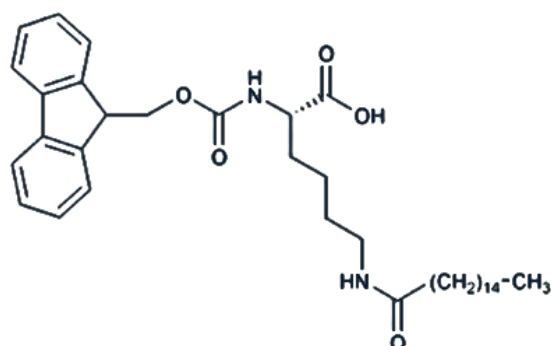
Όπως βλέπουμε η συγκεκριμένη ένωση αποτελείται από ένα μόριο Fmoc και ένα αμινοοκτανοϊκό οξύ. Το Fmoc αποτελεί προστατευτική ομάδα, η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα στην οργανική σύνθεση κυρίως ως προστατευτική ομάδα αμινών και όπως είδαμε και παραπάνω είναι ένας πολύ καλός «τζελοποιητής». Τέλος να σημειωθεί ότι μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα με διάλυμα πιπεριδίνης. Το οκτανοϊκό οξύ είναι ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ, άχρωμο λιπαρό υγρό και ελάχιστα διαλυτό στο νερό. Οι ενώσεις του συναντώνται στο γάλα διάφορων θηλαστικών και ως δευτερεύον συστατικό του έλαιου καρύδας και του φοινικέλαιου. Χρησιμοποιείται ως αντιμικροβιακό φυτοφάρμακο, απολυμαντικό επιφανειών, αλγοκτόνο, βακτηριοκτόνο και μυκητοκτόνο.



Εικόνα 13: Χημική Δομή των μορίων **Fmoc** και **οκτανοϊκό οξύ**

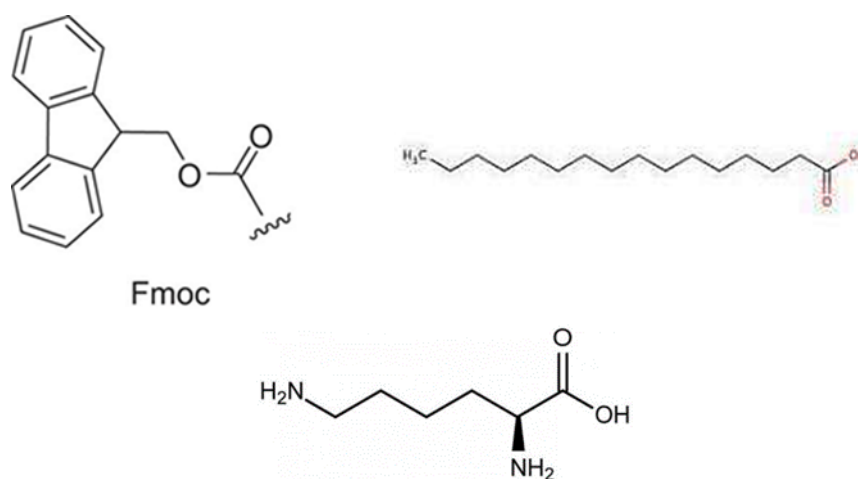
2. Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH

- Μοριακό Βάρος: 606.85 g/mol
- Χημική Δομή:



Εικόνα 14: Χημική Δομή **Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH**

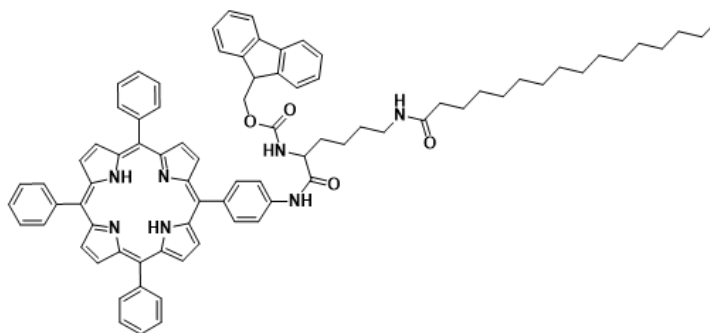
Από την χημική δομή του συγκεκριμένου πεπτιδίου παρατηρούμε ότι αποτελείται από ένα μόριο Fmoc, μια λυσίνη και ένα παλμιτοϋλικό οξύ. Το Fmoc αποτελεί την προστατευτική ομάδα που περιγράφηκε στην προηγούμενη ένωση. Η λυσίνη είναι α-αμινοξύ, το οποίο είναι απαραίτητο για την σύνθεση πρωτεϊνών. Περιέχει μια α-αμινομάδα, μια α-καρβοξυλομάδα κατατάσσοντας την ως βασικά φορτισμένο αλειφατικό αμινοξύ. Έχει σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση, στο crosslinking πεπτιδίων κολλαγόνου και στην παραγωγή καρνιτίνης, η οποία είναι βασική στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων ($pK_a=10.8$). Τέλος το παλμιτοϋλικό οξύ το οποίο εμπεριέχεται στην συγκεκριμένη ένωση, είναι το πιο κοινό κορεσμένο λιπαρό οξύ που βρίσκεται στους οργανισμούς. Το παλμιτοϋλικό οξύ είναι το πρώτο λιπαρό οξύ που παράγεται κατά τη σύνθεση λιπαρών οξέων και αποτελεί πρόδρομο των λιπαρών οξέων με μεγαλύτερη αλυσίδα. Κατά συνέπεια, το παλμιτοϋλικό οξύ είναι το κύριο συστατικό του σώματος των ζώων.



Εικόνα 15: Χημική Δομή των μορίων **Fmoc**, **Λυσίνης** και **παλμιτοϋλικό οξύ**

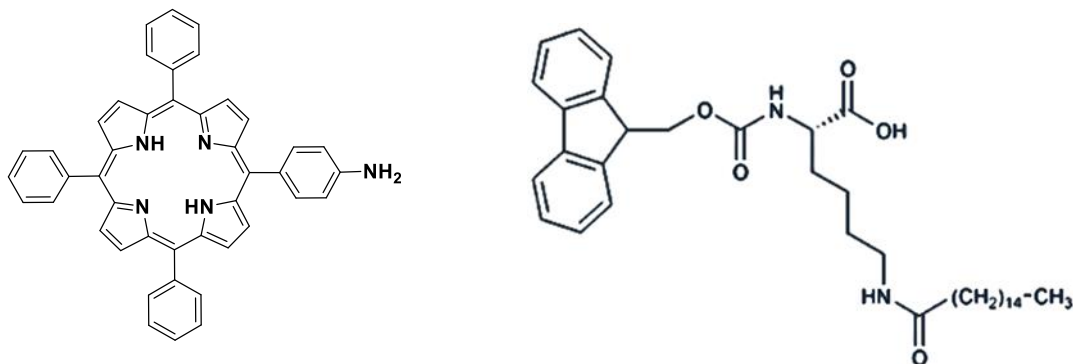
3. *Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP*

- Μοριακό Βάρος: 1239,6 g/mol
- Χημική Δομή:



Εικόνα 16: Χημική Δομή *Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP*

Η παραπάνω ένωση συντέθηκε από τον Διδακτορικό φοιτητή Μάνο Νικολουδάκη στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του καθηγητή Α. Κουτσολέλου του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η συγκεκριμένη ένωση παράχθηκε αφού πραγματοποιήθηκε σύζευξη του πεπτιδίου *Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH* με *TPP-NH₂* σε θειονυλοχλωρίδιο (SOCl_2) παρουσία τετραϋδροφουρανίου (THF).



Εικόνα 17: Χημική Δομή *Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH* και *TPP-NH₂*

Προετοιμασία Δειγμάτων:

1. Fmoc-8-aminooctanoic acid:

Η συγκέκριμένη πεπτιδική σκόνη διαλύθηκε σε διάφορα συστήματα διαλυτών και σε διάφορες συγκεντρώσεις έτσι ώστε να βελτιστοποιήσουμε τις συνθήκες διάλυσης με σκοπό να μελετηθεί η αυτοοργάνωση του πεπτιδίου στα συστήματα αυτά.

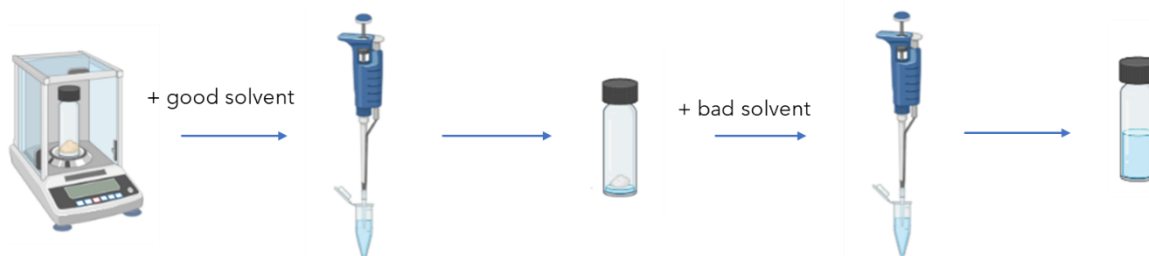
Τα συστήματα αυτά αποτελούνται από ένα «καλό» και ένα «κακό» διαλύτη. Συνήθως ως «καλός» διαλύτης χρησιμοποιείται ένας χαστροπικός διαλύτης στον οποίο και πραγματοποιείται η διάλυση της πεπτιδικής σκόνης. Από την άλλη «κακός» διαλύτης θεωρείται ο διαλύτης ο οποίος προάγει την διαδικασία της αυτοοργάνωσης.⁴¹

➤ **1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O**

Το πρώτο σύστημα διαλυτών που μελετήθηκε ήταν το 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP) :H₂O σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα το HFIP διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ το H₂O είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά διαλύσαμε την πεπτιδική σκόνη στο πρώτο μας διαλύτη (HFIP) και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Αφού προσθέσουμε τον «κακό» μας διαλύτη (H₂O) παρατηρήθηκε ότι το τελικό μας διάλυμα μια γαλακτώδη όψη. Με το πέρασ 20 λεπτών το διάλυμα μας είχε γίνει διαφανές ενώ μετά από μια ώρα είχαν σχηματιστεί λευκά συσσωματώματα τα οποία είχαν καθιζάνει στο γυάλινο φυαλίδιο. Τα συσσωματώματα αυτά μετά το πέρασ των 24 ωρών είχαν αυξηθεί και παρέμεναν στο κάτω μέρος του φυαλιδίου.

➤ **Ethanol (C₂H₅OH): H₂O**

Το δεύτερο σύστημα διαλυτών που μελετήθηκε ήταν το Ethanol (EtOH):H₂O σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα η EtOH διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ το H₂O είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά διαλύσαμε την πεπτιδική σκόνη στο πρώτο μας διαλύτη (EtOH) και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Αφού προσθέσουμε τον «κακό» μας διαλύτη (H₂O) παρατηρήθηκε ότι το τελικό μας διάλυμα απέκτησε μια γαλακτώδη όψη. Με το πέρασ 20 λεπτών στο διάλυμα διαπιστώσαμε ότι είχαν σχηματιστεί λευκά συσσωματώματα τα οποία αιωρούνταν στο τελικό μας διάλυμα. Τα συσσωματώματα αυτά μετά το πέρασ των 24 ωρών είχαν αυξηθεί και είχαν καθιζάνει στο γυάλινο φυαλίδιο.



Εικόνα 18: Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων του πεπτιδίου **Fmoc-8-aminooctanoic acid**

2. Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH:

Η συγκεκριμένη πεπτιδική σκόνη διαλύθηκε και αυτή σε διάφορα συστήματα διαλυτών και σε διάφορες συγκεντρώσεις έτσι ώστε να ελέγξουμε την απόκριση της σε αυτά, να βελτιστοποιήσουμε τις συνθήκες διαλυτοποίησης και να μελετήσουμε την αυτοοργάνωση της στα συστήματα αυτά. Τα συστήματα στα οποία μελετήθηκε και η ένωση Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH αποτελούν συστήματα «καλού-κακού» διαλύτη όπως και τα συστήματα που μελετήθηκαν παραπάνω στην ένωση Fmoc-8-aminooctanoic acid.

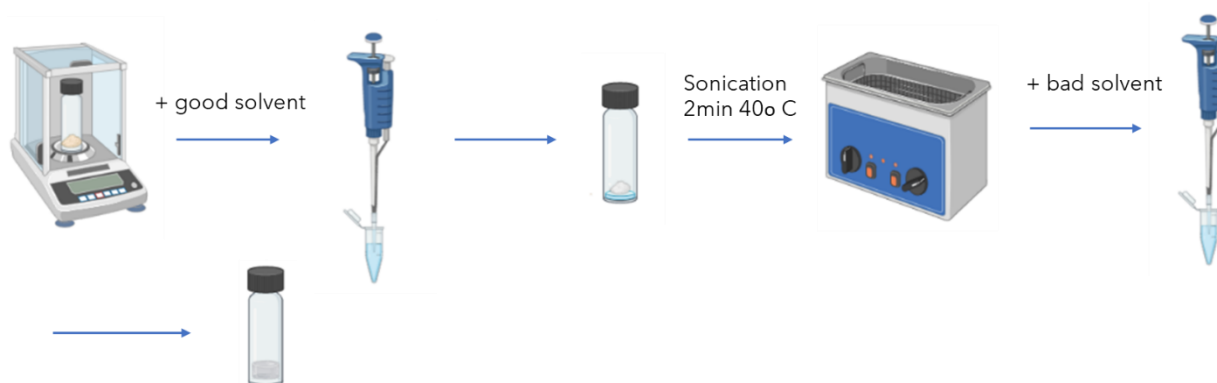
➤ **1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O**

Το πρώτο σύστημα διαλυτών που μελετήθηκε και για αυτό το πεπτίδιο ήταν το 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP) :H₂O σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα το HFIP διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ το H₂O είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά διαλύσαμε την πεπτιδική σκόνη στο πρώτο μας διαλύτη (HFIP) και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Αφού προσθέσουμε τον «κακό» μας διαλύτη (H₂O) παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του διαλύματος και μετά το πέρας 10-20 λεπτών, ανάλογα με την συγκέντρωση του πεπτιδίου κάθε φορά, είχαμε την δημιουργία μιας χαλαρής υδρογέλης με γαλακτώδη όψη. Σε περιπτώσεις μεγάλης συγκέντρωσης του πεπτιδίου η υδρογέλη σχηματιζόταν ακόμη και σε χρόνο 5 λεπτών από την προσθήκη του «κακού» διαλύτη. Αφήνοντας τα δείγματα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρας των ωρών το ιξώδες τους είχε αυξηθεί και κατά συνέπεια είχαν δημιουργηθεί σταθερότερες υδρογέλες, ανάλογα με την τελική συγκέντρωση του διαλυματός μας. Δηλαδή σε χαμηλές συγκεντρώσεις το gel παρέμενε χαλαρό σε υφή ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις γινόταν πιο «στητό».

➤ **Ethanol (C₂H₅OH): H₂O**

Το δεύτερο σύστημα διαλυτών που μελετήθηκε ήταν το Ethanol (EtOH):H₂O σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα η EtOH διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ

το H₂O είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά προσθέσαμε την πεπτιδική σκόνη στην EtOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετήσαμε το γυάλινο φιαλίδο με την πεπτιδική σκόνη και την αιθανόλη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόσαμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στην αιθανόλη. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε τον «κακό» μας διαλύτη, στην συγκεκριμένη περίπτωση το νερό. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Έπειτα από 2 ώρες παρατηρήθηκε αλλαγή στην όψη της υδρογέλης (από διαυγή σε γαλακτερή) και περαιτέρω αύξηση του ιξώδους της. Τέλος αφήσαμε τα δείγματα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες των δειγμάτων είχε αυξηθεί και άλλο ως προς τον σχηματισμό σταθερότερων υδρογελών.



Εικόνα 19: Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων του πεπτιδίου **Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH** για το σύστημα διαλυτών EtOH:H₂O

➤ **Tetrahydrofuran (THF): H₂O**

Το τρίτο σύστημα διαλυτών που μελετήθηκε ήταν το Tetrahydrofuran (THF):H₂O σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα το THF διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ το H₂O είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά προσθέσαμε την πεπτιδική σκόνη στο THF και παρατηρήσαμε ότι διαλύεται κατευθείαν. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε το νερό (H₂O). Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε ότι το διάλυμα μας έγινε ένα γαλακτερό εναιώρημα ενώ με το πέρασμα μιας ώρας διαπιστώθηκε η αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος. Στην συνέχεια αφήνοντας τα δείγματα μας overnight παρατηρήθηκε η αύξηση του ιξώδους τους με αποτέλεσμα την δημιουργία διαυγών υδρογελών τα οποία όμως εμπεριείχαν και μια μικρή ποσότητα υγρού πάνω από το σχηματισμένο gel.

➤ **Methanol (CH₃OH): H₂O**

Το τέταρτο σύστημα διαλυτών που μελετήθηκε για το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH ήταν το Methanol (MeOH):H₂O σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα η EtOH διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ το H₂O είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά προσθέσαμε την πεπτιδική σκόνη στην MeOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Επομένως ακολουθήσαμε την διαδικασία που είχαμε ακολουθήσει και για το σύστημα διαλυτών EtOH:H₂O, τοποθετώντας το γυάλινο φυαλίδο με την πεπτιδική σκόνη και την μεθανόλη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζοντας υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στην μεθανόλη. Αφού διαλυθεί προσθέσαμε το νερό. Με την προσθήκη του νερού δημιουργήθηκε ένα γαλακτερό διάλυμα. Έπειτα από 2 ώρες διαπιστώθηκε αύξηση του ιξώδους του πεπτιδικού μας διαλύματος. Αφήσαμε τα δείγματα μας overnight και με το πέρας 24 ωρών παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση του ιξώδους των δειγμάτων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό διαυγών και σταθερών υδρογελών τα οποία όμως εμπεριείχαν και μια μικρή ποσότητα υγρού πάνω από το σχηματισμένο gel.

3. Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP

Η συγκεκριμένη πεπτιδική σκόνη συντέθηκε όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας και αποτελεί την σύζευξη της πεπτιδικής σκόνης Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH με την πορφυρίνη TPP-NH₂. Κάνοντας χρήση της πορφυρίνης αυξάνουμε τον ήδη αντιμικροβιακό χαρακτήρα του πεπτιδίου μας, ο οποίος προέρχεται από τα παλμιτοϋλικό οξύ που περιέχει, και καθιστούμε το νεοσυντιθέμενο πεπτίδιο μας ιδανικό υλικό για βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα συστήματα στα οποία μελετήθηκε και η ένωση Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP αποτελούν συστήματα «καλού-κακού» διαλύτη όπως και τα συστήματα που μελετήθηκαν και οι δύο προηγούμενες ενώσεις μας.

➤ **CHCl₂: Methanol (CH₃OH)**

Το πρώτο σύστημα διαλυτών που μελετήθηκε για αυτή την ένωση ήταν το CHCl₂:Methanol (MeOH) σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα το δίχλωρομεθάνιο (CHCl₂) διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ η μεθανόλη (MeOH) είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά διαλύσαμε την σκόνη της ένωσης μας στον «καλό» μας διαλύτη (CHCl₂) και παρατηρήθηκε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν, επομένως το διάλυμα μας τοποθετείται σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και το δείγμα τίθεται σε θερμική επεξεργασία υπερήχων για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στο δίχλωρομεθάνιο. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε τον «κακό» μας διαλύτη, στην συγκεκριμένη περίπτωση την μεθανόλη (MeOH). Με την

προσθήκη του «κακού» μας διαλύτη (MeOH) παρατηρήθηκε θόλωμα του τελικού διαλύματος. Να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη ένωση μετά την σύζευξη της με την πορφυρίνη απέκτησε ένα σκούρο κόκκινο χρώμα σε αντίθεση με το λευκό χρώμα της πεπτιδικής σκόνης του ασύζευκτου πεπτιδίου Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH, επομένως τα τελικά μας διαλύματα διαθέτουν ένα σκούρο ροζ- φούξια χρώμα. Αφήνοντας τα δείγματα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρασ των ωρών δημιουργήθηκαν μερικά ιζήματα στο κάτω μέρος του φιαλιδίου ενώ το τελικό μας διάλυμα παρέμενε θολό και σε υγρή κατάσταση.

➤ **CHCl₂: Heptane (C₇H₁₆)**

Το δεύτερο σύστημα διαλυτών που μελετήθηκε και για αυτή την ένωση ήταν το CHCl₂:Heptane (C₇H₁₆) σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα το διχλωρομεθάνιο (CHCl₂) διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ το επτάνιο (C₇H₁₆) είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά διαλύσαμε την σκόνη της ένωσης μας στον «καλό» μας διαλύτη (CHCl₂) και παρατηρήθηκε ότι δεν διαλύεται απευθείας και για αυτό τον λόγο το διάλυμα μας τοποθετείται σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και το δείγμα τίθεται σε επεξεργασία υπερήχων για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στο διχλωρομεθάνιο. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε το επτάνιο (C₇H₁₆). Με την προσθήκη του «κακού» μας διαλύτη, επτάνιο (C₇H₁₆) παρατηρήθηκε κατακρήμνιση πεπτιδικής σκόνης. Αφήνοντας τα δείγματα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρασ των ωρών ο αριθμός των ιζημάτων της ένωσης είχε αυξηθεί, το διάλυμα μας παρέμενε σε υγρή κατάσταση και είχε ένα αρκετά διαυγές σκούρο ροζ χρώμα.

➤ **Tetrahydrofuran (THF): Methanol (CH₃OH)**

Το τρίτο σύστημα διαλυτών που ελέγξαμε για την ένωση Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP ήταν το Tetrahydrofuran (THF):Methanol (MeOH) σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα το τετραϋδροφουράνιο (THF) αποτελεί τον «καλό» διαλύτη ενώ η μεθανόλη (MeOH) είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά διαλύσαμε την σκόνη της ένωσης μας στον «καλό» μας διαλύτη (THF) και παρατηρήθηκε ότι απαιτείται θερμική επεξεργασία μέσω υπερήχων για 2 λεπτά και στους 40° C για να διαλυθεί στο διαλύτη THF. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε την μεθανόλη (MeOH). Με την προσθήκη του «κακού» μας διαλύτη (MeOH) παρατηρήθηκε θόλωμα του τελικού διαλύματος. Αφήνοντας τα δείγματα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρασ των ωρών το τελικό μας διάλυμα παρέμενε θολό, σκούρο ροζ και σε υγρή κατάσταση.

➤ **Tetrahydrofuran (THF): Heptane (C₇H₁₆)**

Το τέταρτο σύστημα διαλυτών που εξετάστηκε για την συζευγμένη ένωση που δημιουργήσαμε ήταν το Tetrahydrofuran (THF):Heptane (C₇H₁₆) σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα το τετραϋδροφουράνιο (THF) διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ το επτάνιο (C₇H₁₆) είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά διαλύσαμε την σκόνη της ένωσης μας στον «καλό» μας διαλύτη (THF) μέσω υπερήχων για 2 λεπτά αφού έχουμε τοποθετήσει το vial μας σε θερμό υδατόλουτρο και στους 40° C. Έπειτα από αυτή την κατεργασία παρατηρήθηκε η άμεση διάλυση του πεπτιδίου στον συγκεκριμένο διαλύτη. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε το επτάνιο (C₇H₁₆). Με την προσθήκη του «κακού» μας διαλύτη, επτάνιο (C₇H₁₆) παρατηρήθηκε κατακρήμνιση της πεπτιδικής σκόνης. Αφήνοντας τα δείγματα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρασ των ωρών ο αριθμός των ιζημάτων της ένωσης είχε αυξηθεί κατα πολύ, το διάλυμα μας παρέμενε διαυγές, και συγκεκριμένα το πιο διαυγές από όσα διαλύματα κάναμε για την ένωση Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP, σε υγρή κατάσταση και με έντονο σκούρο ροζ χρώμα.

➤ **Tetrahydrofuran (THF): H₂O**

Το τελευταίο σύστημα διαλυτών που εξετάστηκε για την ένωση Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP που δημιουργήσαμε ήταν το Tetrahydrofuran (THF):H₂O σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και αναλογίες των διαλυτών. Στο συγκεκριμένο σύστημα το τετραϋδροφουράνιο (THF) διαδραματίζει τον ρόλο του «καλού» διαλύτη ενώ το νερό (H₂O) είναι ο «κακός» διαλύτης του συστήματος. Αρχικά διαλύσαμε την σκόνη της ένωσης μας στον «καλό» μας διαλύτη (THF) και παρατηρήθηκε ότι το πεπτίδιο μας διαλύεται στον συγκεκριμένο διαλύτη μόνο παρουσία υπερήχων για 2 λεπτά και θερμότητας περίπου 40° C. Εφόσον διαλυθεί προσθέτουμε το H₂O. Με την προσθήκη του «κακού» μας διαλύτη παρατηρήθηκε άμεση κατακρήμνιση της πεπτιδικής σκόνης και δημιουργία ενός ανομοιογενούς μίγματος. Αφήνοντας τα δείγματα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρασ των ωρών το διάλυμα μας παρέμενε ανομοιογενές, η ποσότητα ιζήματος της ένωσης ήταν αυξημένος, το διάλυμα μας είχε θολώσει και είχε ένα αχνό ροζ χρώμα ενώ βρισκόταν ακόμη σε υγρή φάση.

Ξήρανση δειγμάτων σε Συνθήκες Ατμοσφαιρικού Αέρα

Όλα τα δείγματα μας παρατηρήθηκαν για τον δομικό τους χαρακτηρισμό στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο FESEM. Για την παρατήρηση τους απαραίτητη προϋπόθεση ήταν η ξήρανση τους σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα και σε θερμοκρασία δωματίου. Πιο αναλυτικά, οι σταγόνες από τα δείγματα, περίπου 10μl από το καθένα εναποτέθηκαν σε γυάλινο πλακίδιο διαμέτρου 12-13 mm και αφέθηκαν σε κλειστό τρυβλίο petri μέχρι την εξάτμιση των διαλυτών και τελικά την παρατήρηση τους.

Congo Red Staining (CRS)

Για την χρώση Congo Red έπρεπε να παρασκευαστεί αρχικά αλκαλικό διάλυμα, διαλύοντας 1.0 g NaOH σε 100 mL απιονισμένο νερό, με τελική συγκέντρωση 0.25 M. Έπειτα το διάλυμα που παρασκευάστηκε αραιώθηκε έως ότου το pH του να φτάσει το 9.0. Στην συνέχεια, αναμίξαμε 1 mL από αυτό το διάλυμα με 100 mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης 50%. Παράλληλα, 0.5 g σκόνης Congo Red (Sigma Aldrich, 97% καθαρότητα) διαλύθηκε σε 100 mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης 50%. Το τελικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την χρώση των δειγμάτων, προκύπτει από την ανάμιξη 1 mL διαλύματος, του διαλύματος της αιθανόλης στο οποίο διαλύθηκε η σκόνη του Congo Red, με 10 μL από το διάλυμα NaOH-αιθανόλης. Πριν από τη διαδικασία της χρώσης με το Congo Red, τα δείγματα μας ξηράνθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες διαμέτρου 12-13 mm, σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα και θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ξήρανση τους, στα δείγματα προς παρατήρηση, εναποτέθηκε μία σταγόνα 8-10 μL του διαλύματος Congo Red και αμέσως έγινε η παρατήρηση τους σε στερεοσκοπικό μικροσκόπιο, με τη χρήση διασταυρωμένου πολωτή.

Δ. Αποτελέσματα:

Αποτελέσματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης Ηλεκτρονίων Εκπομπής Πεδίου (FE-SEM):

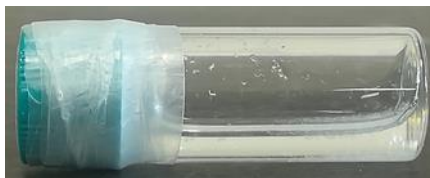
Για τα αποτελέσματα από την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης FE-SEM έγινε χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης πεδίου FESEM JEOL 7000 στα 15 kV το οποίο βρίσκεται στο τμήμα Φυσικής, για την ερευνητική ομάδα μικροηλεκτρονικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ του Ι.Τ.Ε.

1. Fmoc-8-aminooctanoic acid:

Η συγκεκριμένη πεπτιδική σκόνη μελετήθηκε σε δύο συστήματα διαλυτών, όπως αναφέρθηκε σε παραπάνω κεφάλαιο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, τα οποία είναι τα 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O και Ethanol (C₂H₅OH): H₂O, και η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιγράφηκε εκτενώς παραπάνω. Για το πρώτο σύστημα οι αναλογίες και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

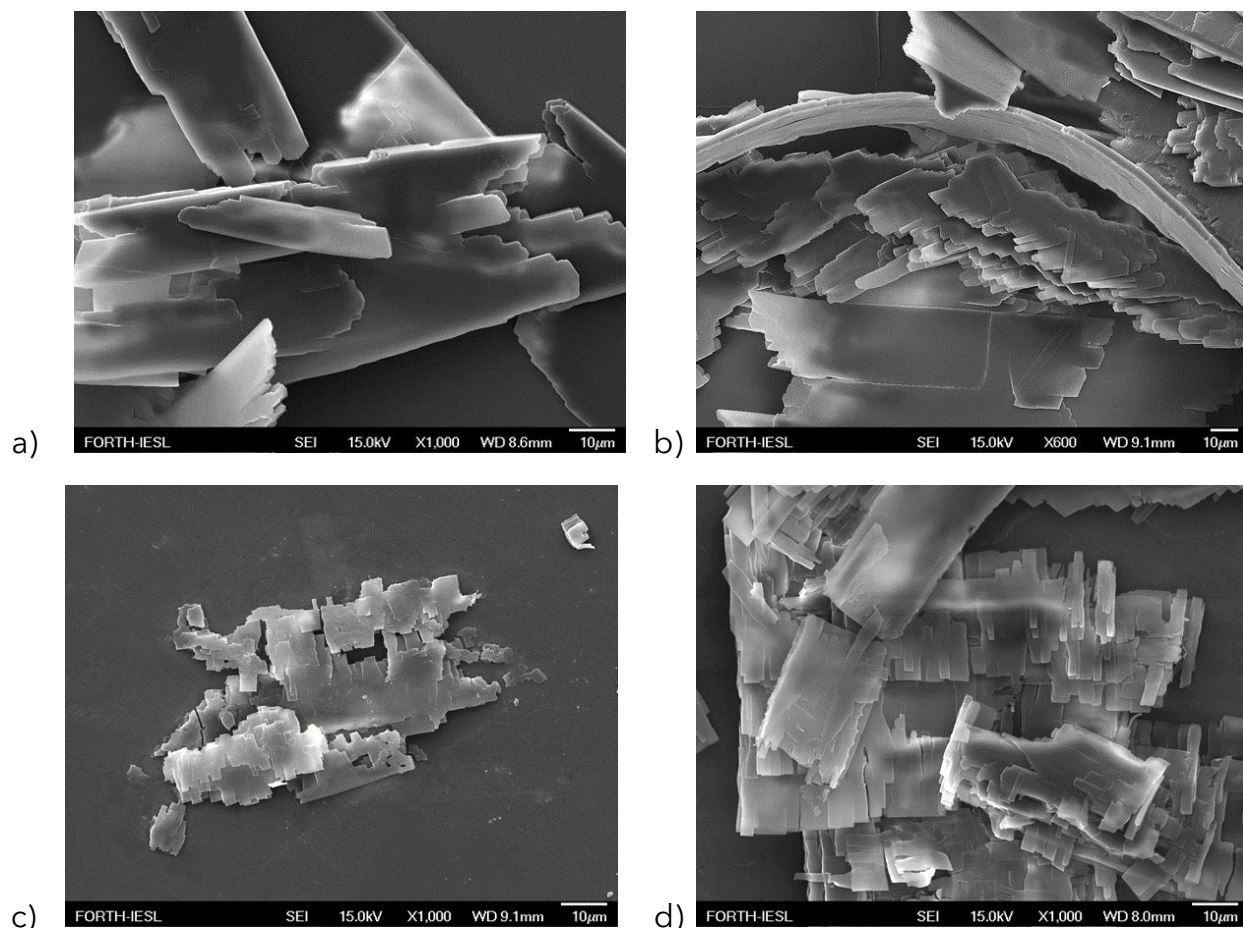
- Fmoc-8-aminooctanoic acid συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύσαμε 1mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100μl HFIP και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400μl H₂O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500μl και παρατηρήθηκε ότι από ένα διάφανο διάλυμα καταλήξαμε σε ένα διάλυμα με γαλακτερό χρώμα. Με το πέρασ 20 λεπτών το διάλυμα μας είχε γίνει διαφανές ενώ μετά από μια ώρα είχαν σχηματιστεί λευκά συσσωματώματα τα οποία είχαν καθιζάνει στο γυαλίνο φυαλίδιο. Τα συσσωματώματα αυτά μετά το πέρασ των 24 ωρών είχαν αυξήσει τον αριθμό τους και παρέμεναν στο κάτω μέρος του φυαλιδίου.



Εικόνα 20: Fmoc-8-aminooctanoic acid $c=2\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O 2:8 όπου είναι διακριτά τα λευκά συσσωματώματα που έχουν σχηματιστεί

Για να παρατηρήσουμε τα πεπτιδικά μας δείγματα στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο εναποθέταμε περίπου 10μl από το καθένα σε γυάλινο πλακίδιο διαμέτρου 12-13 mm και αφέθηκαν σε κλειστό τρυβλίο petri μέχρι την εξάτμιση των διαλυτών και τελικά την παρατήρησή τους. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για δείγματα time course, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 21: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-8-amino-octanoic acid $c=2\text{mg/ml}$ σε HFIP: H_2O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες που λάβαμε με την βοήθεια της Μικροσκοπίας FE-SEM καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτίδιο Fmoc-8-amino-octanoic acid σε HFIP: H_2O 2:8 και συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ορθογώνιες πλάκες (flakes) ποικίλων διαστάσεων. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται ότι αυτές οι δομές πακετάρονται μεταξύ τους και δημιουργούν μεγαλύτερες δομές.

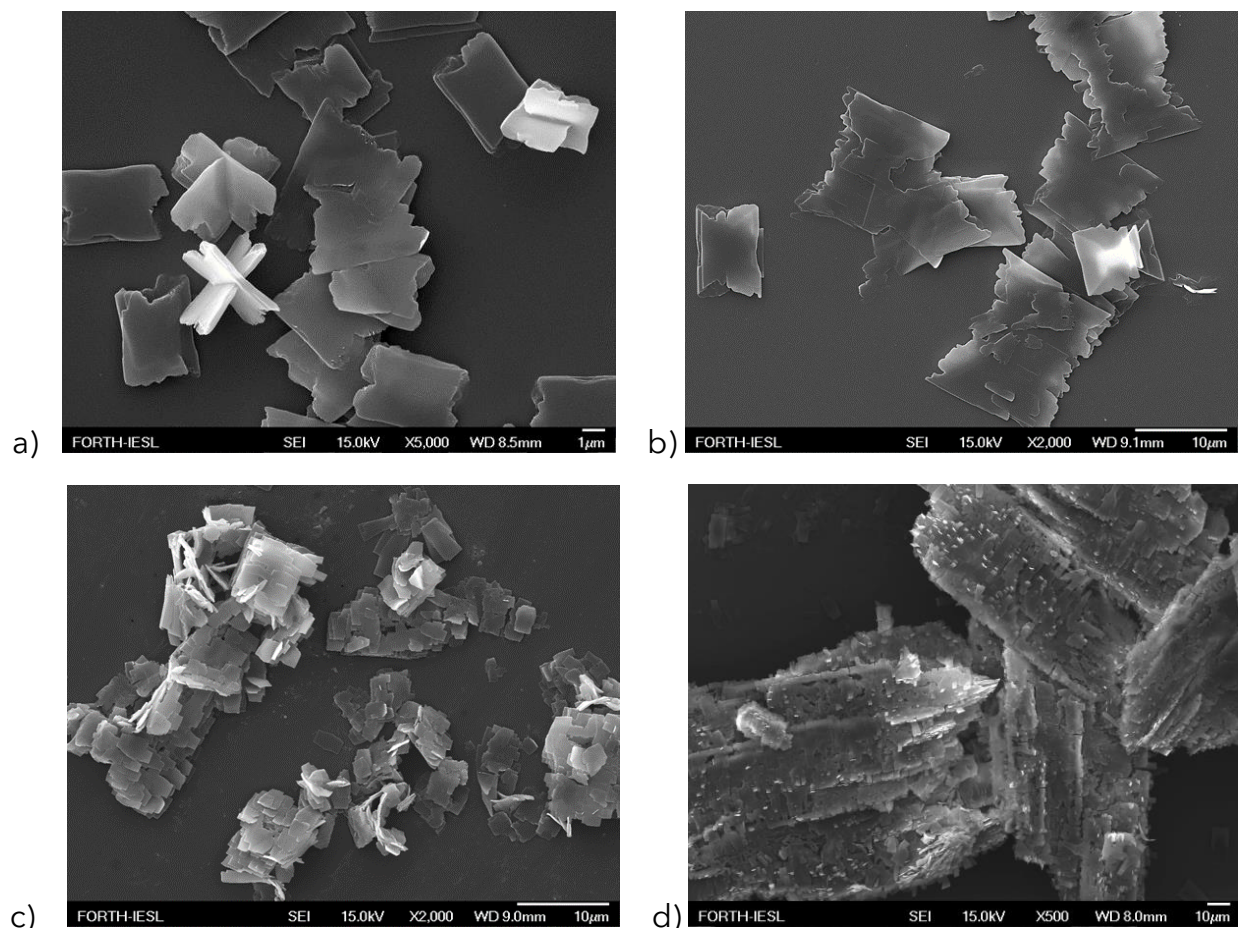
- Fmoc-8-aminooctanoic acid συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H_2O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύσαμε 0.5mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100μl HFIP και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400μl H_2O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500μl και παρατηρήθηκε ότι από ένα διάφανο διάλυμα καταλήξαμε σε ένα διάλυμα μεγαλακτώδη όψη. Με το πέρασ 20 λεπτών το διάλυμα μας είχε γίνει διαφανές ένω μετά από μια ώρα είχαν σχηματιστεί λευκά συσσωματώματα τα οποία είχαν καθιζάνει στο γυάλινο φυαλίδιο. Τα συσσωματώματα αυτά μετά το πέρασ των 24 ωρών είχαν αυξήσει τον αριθμό τους και παρέμεναν στο κάτω μέρος του φυαλιδίου.



Εικόνα 22: Fmoc-8-aminooctanoic acid $c=1\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H_2O 2:8 όπου είναι διακριτά τα λευκά συσσωματώματα που έχουν σχηματιστεί

Για να παρατηρήσουμε τα πεπτιδικά μας δείγματα στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο ακολουθήσαμε την διαδικασία ξήρανσης που περιγράψαμε και στην προηγούμενη συγκέντρωση που εξετάστηκε, δηλαδή εναποθέταμε περίπου 10μl από το καθένα σε γυάλινο πλακίδιο διαμέτρου 12-13 mm και αφήθηκαν σε κλειστό τρυβλίο petri μέχρι την εξάτμιση των διαλυτών και τελικά την παρατήρηση τους. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για δείγματα time course, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



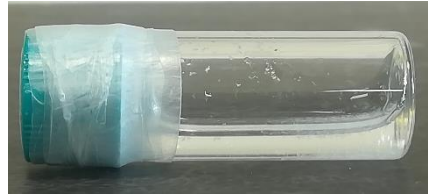
Εικόνα 23: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-8-aminooctanoic acid $c=1\text{mg/ml}$ σε HFIP: H_2O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες που λάβαμε με την βοήθεια της Μικροσκοπίας FE-SEM καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτιδίο Fmoc-8-aminooctanoic acid σε HFIP: H_2O 2:8 και συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ορθογώνιες πλάκες (flakes) ποικίλων διαστάσεων. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται ότι αυτές οι δομές πακετάρονται μεταξύ τους και δημιουργούν μεγαλύτερες δομές.

➤ Fmoc-8-aminooctanoic acid συγκέντρωσης $c=3\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H_2O αναλογίας 2:8

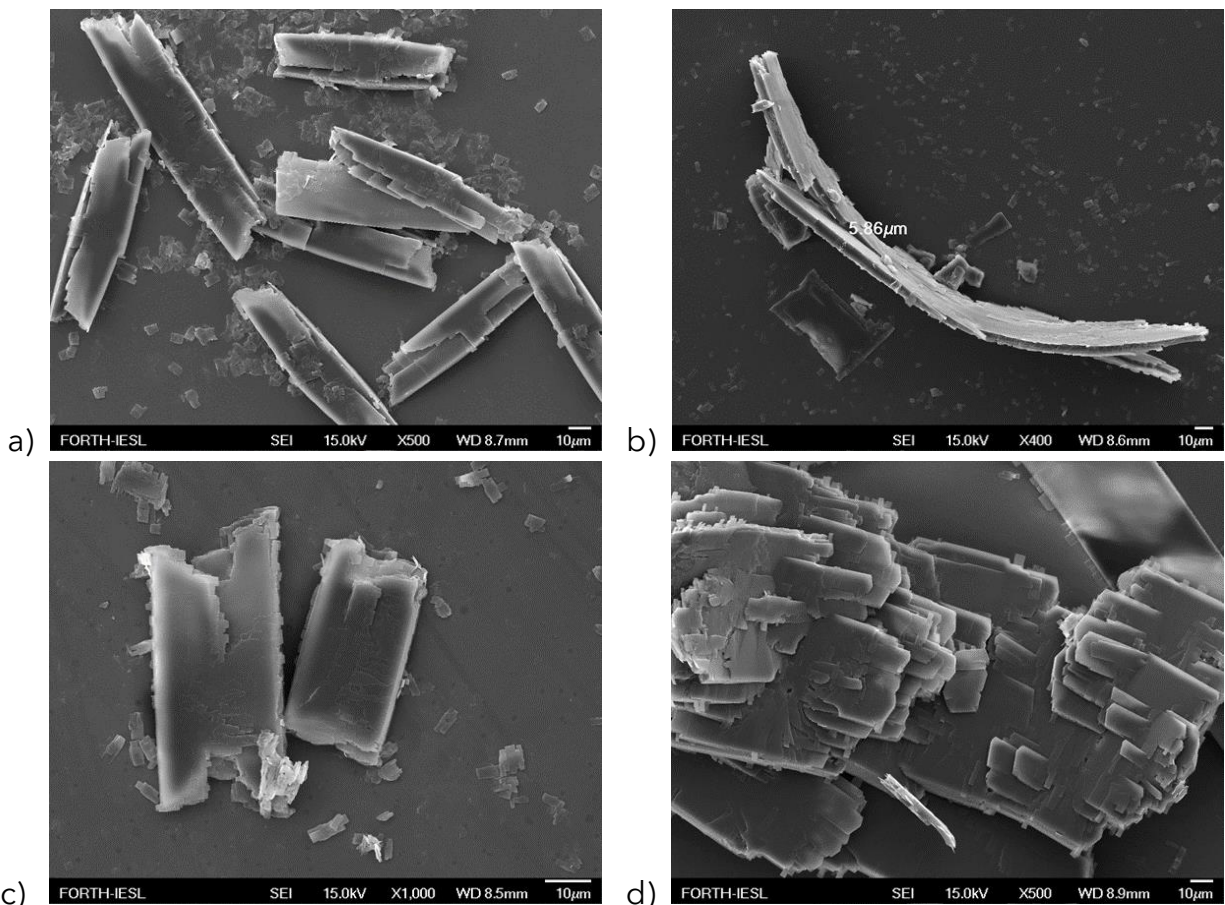
Αρχικά διαλύσαμε 1.5 mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100µl HFIP και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400µl H_2O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500µl και παρατηρήθηκε ότι από ένα διάφανο διάλυμα καταλήξαμε σε ένα διάλυμα με γαλακτώδη όψη. Με το πέρασ 20 λεπτών το διάλυμα μας είχε γίνει διαφανές ενώ μετά από μια ώρα είχαν σχηματιστεί λευκά συσσωματώματα τα οποία είχαν καθιζάνει στο

γυάλινο φυαλίδιο. Τα συσσωματώματα αυτά μετά το πέρας των 24 ωρών είχαν αυξήσει τον αριθμό τους και παρέμεναν στο κάτω μέρος του φυαλιδίου.



Εικόνα 24: Fmoc-8-αμινοοκτανοϊκό οξύ $c=3\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H_2O 2:8 όπου είναι διακριτά τα λευκά συσσωματώματα που έχουν σχηματιστεί

Για να παρατηρήσουμε τα πεπτιδικά μας δείγματα στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ξήρανσης που περιγράφηκε και παραπάνω. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για time course, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.

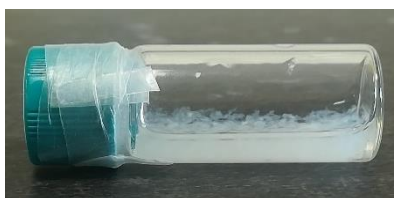


Εικόνα 25: Φωτογραφίες Ηλ. Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-8-αμινοοκτανοϊκό οξύ $c=3\text{mg/ml}$ σε HFIP: H_2O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες που λάβαμε με την βοήθεια της Μικροσκοπίας FE-SEM καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτιδίο Fmoc-8-aminooctanoic acid σε HFIP:H₂O 2:8 και συγκέντρωσης $c=3\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ορθογώνιες πλάκες (flakes) ποικίλων διαστάσεων. Από ότι όμως παρατηρούμε τα flakes σε αυτή την συγκέντρωση είναι αρκετά μεγαλύτερα σε μέγεθος από τις πρώτες κιολάς ημέρες σε σχέση με τα flakes των 2 μικρότερων συγκεντρώσεων που έχουμε ήδη αναφέρει. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται ότι αυτές οι δομές πακετάρονται ακόμα περισσότερο μεταξύ τους και δημιουργούν μεγαλύτερες δομές.

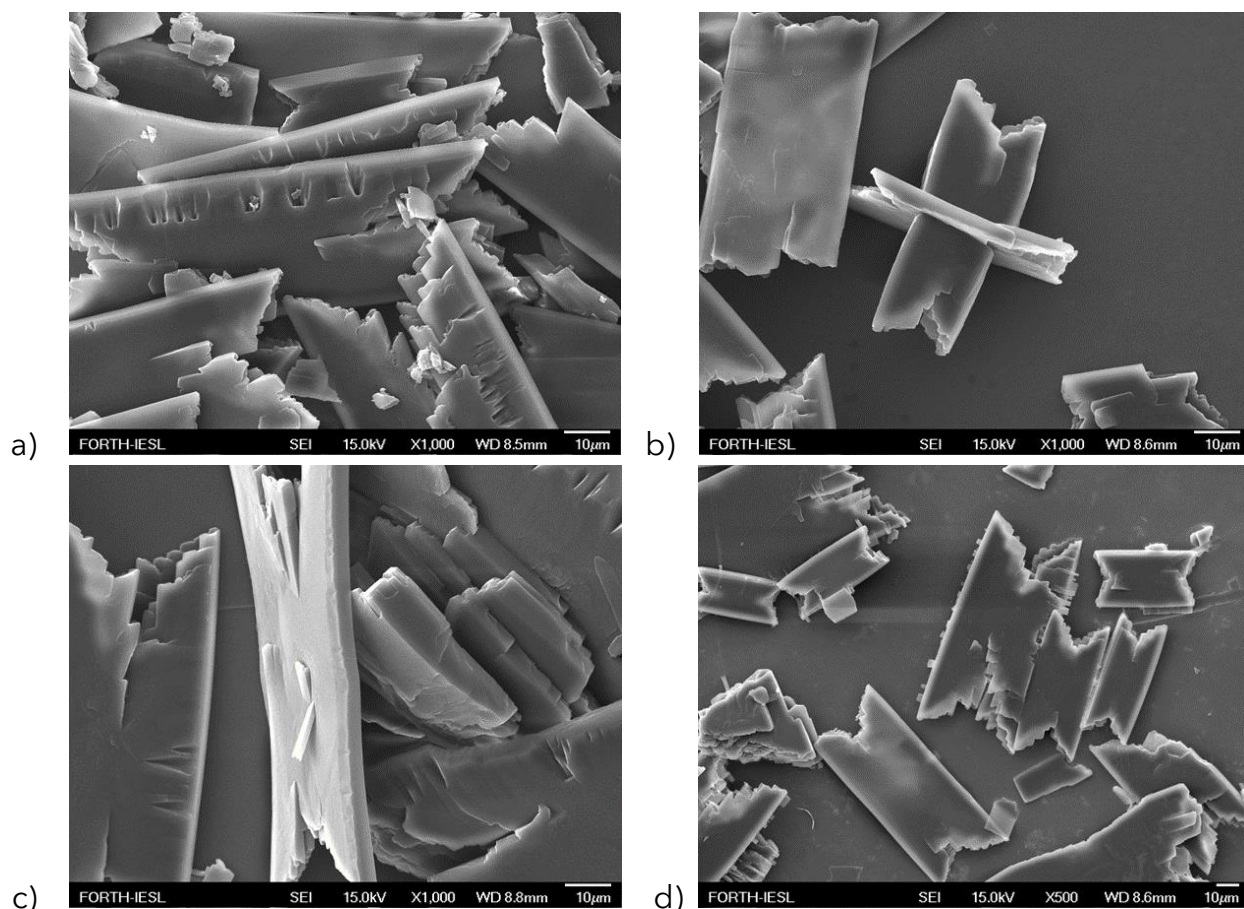
➤ Fmoc-8-aminooctanoic acid συγκέντρωσης $c=5\text{ mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύσαμε 2.5mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100ml HFIP και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400ml H₂O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500ml και παρατηρήθηκε ότι από ένα διάφανο διάλυμα καταλήξαμε σε ένα διάλυμα μεγαλακτώδη όψη. Με το πέρασ 20 λεπτών το διάλυμα μας είχε γίνει διαφανές ενώ μετά από μια ώρα είχαν σχηματιστεί λευκά συσσωματώματα τα οποία είχαν καθιζάνει στο γυάλινο φιαλίδιο. Τα συσσωματώματα αυτά μετά το πέρασ των 24 ωρών είχαν αυξήσει τον αριθμό τους και παρέμεναν στο κάτω μέρος του φιαλιδίου.



Εικόνα 26: Fmoc-8-aminooctanoic acid $c=5\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O 2:8 όπου είναι διακριτά τα λευκά συσσωματώματα που έχουν σχηματιστεί

Για να παρατηρήσουμε τα πεπτιδικά μας δείγματα στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ξήρανσης που περιγράφηκε και παραπάνω. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για time course, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 27: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-8-amino-octanoic acid $c=5\text{mg/ml}$ σε HFIP: H_2O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτιδίο Fmoc-8-amino-octanoic acid σε HFIP: H_2O 2:8 και συγκέντρωσης $c=5\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ορθογώνιες πλάκες (flakes) ποικίλων διαστάσεων. Από ότι όμως παρατηρούμε τα flakes σε αυτή την συγκέντρωση είναι αρκετά μεγαλύτερα σε μέγεθος από τις πρώτες κιόλας ημέρες σε σχέση με τα flakes των προηγούμενων συγκεντρώσεων. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται ότι αυτές οι δομές πακετάρονται ακόμα περισσότερο μεταξύ τους και δημιουργούν μεγαλύτερες δομές.

Για το δεύτερο σύστημα διαλυτών οι αναλογίες και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- Fmoc-8-amino-octanoic acid συγκέντρωσης $c=0,5\text{mg/ml}$ σε Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): H_2O αναλογίας 2:8

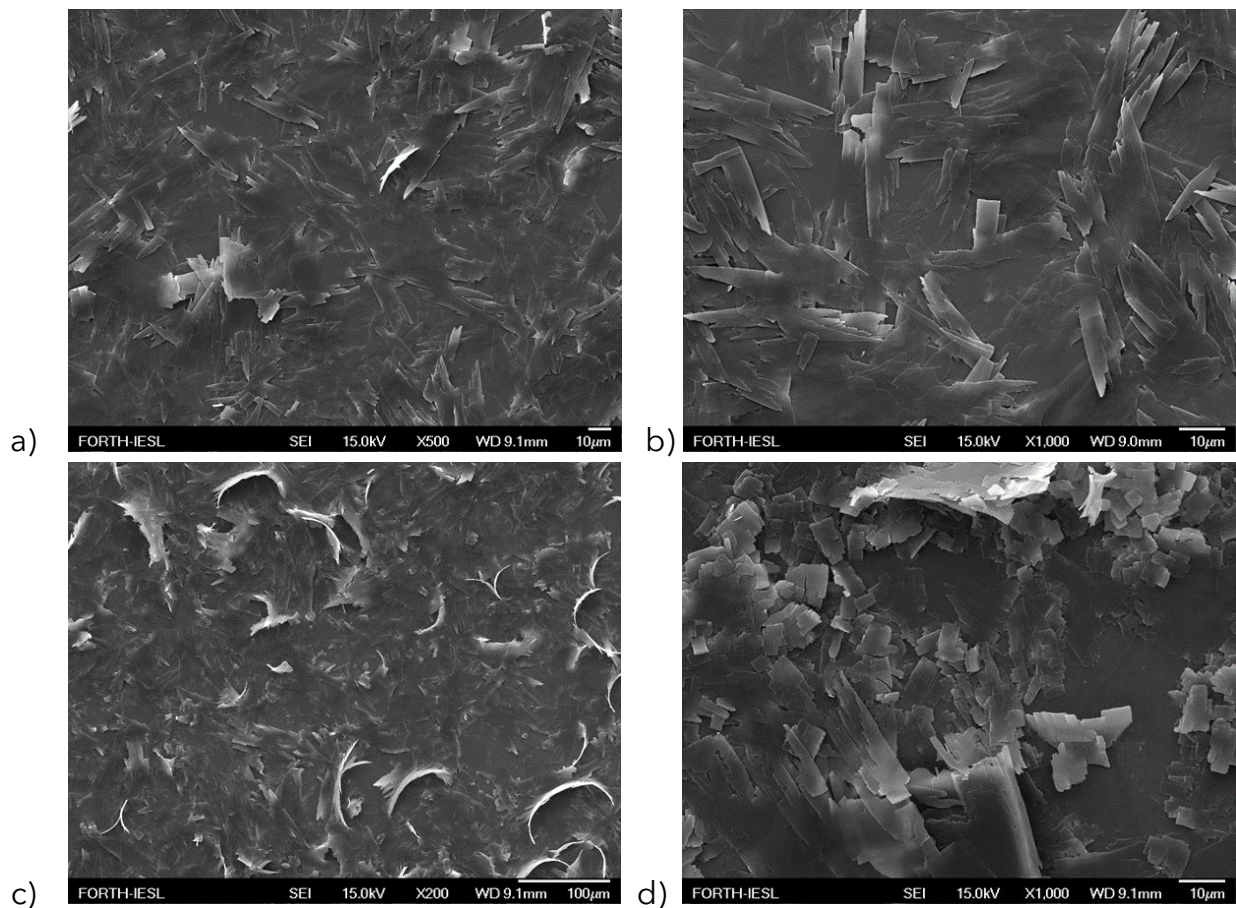
Αρχικά διαλύσαμε $0,25\text{mg}$ από την πεπτιδική μας σκόνη σε $100\mu\text{l}$ EtOH και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε $400\mu\text{l}$ H_2O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο $500\mu\text{l}$ και παρατηρήθηκε ότι από ένα διάφανο διάλυμα καταλήξαμε σε ένα

διάλυμα με γαλακτώδη όψη . Με το πέρασ 20 λεπτών το διάλυμα μας είχε γίνει διαφανές ένω μετά από μια ώρα είχαν σχηματιστεί λευκά συσσωματώματα τα οποία είχαν καθιζάνει στο γυαλινο φυαλίδιο. Τα συσσωματώματα αυτά μετά το πέρασ των 24 ωρών είχαν αυξησει τον αριθμό τους και παρέμεναν στο κάτω μέρος του φυαλιδίου.



Εικόνα 28: Fmoc-8-aminooctanoic acid $c=0.5\text{mg/ml}$ σε *Ethanol* ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): H_2O 2:8 όπου είναι διακριτά τα λευκά συσσωματώματα που έχουν σχηματιστεί

Για να παρατηρήσουμε τα πεπτιδικά μας δείγματα στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ξήρανσης που περιγράφηκε και παραπάνω. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για time course, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 29: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-8-aminooctanoic acid $c=0.5\text{mg/ml}$ σε EtOH: H_2O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-8-aminooctanoic acid σε EtOH:H₂O 2:8 και συγκέντρωσης $c=0.5\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ορθογώνιες πλάκες (flakes) ποικίλων διαστάσεων, οι οποίες όπως παρατηρούμε δεν είναι επίπεδες όπως στο σύστημα διαλυτών HFIP:H₂O αλλά εμφανίζουν μια κυρτότητα. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται ότι αυτές οι δομές πακετάρονται ακόμα περισσότερο μεταξύ τους και δημιουργούν μεγαλύτερες δομές.

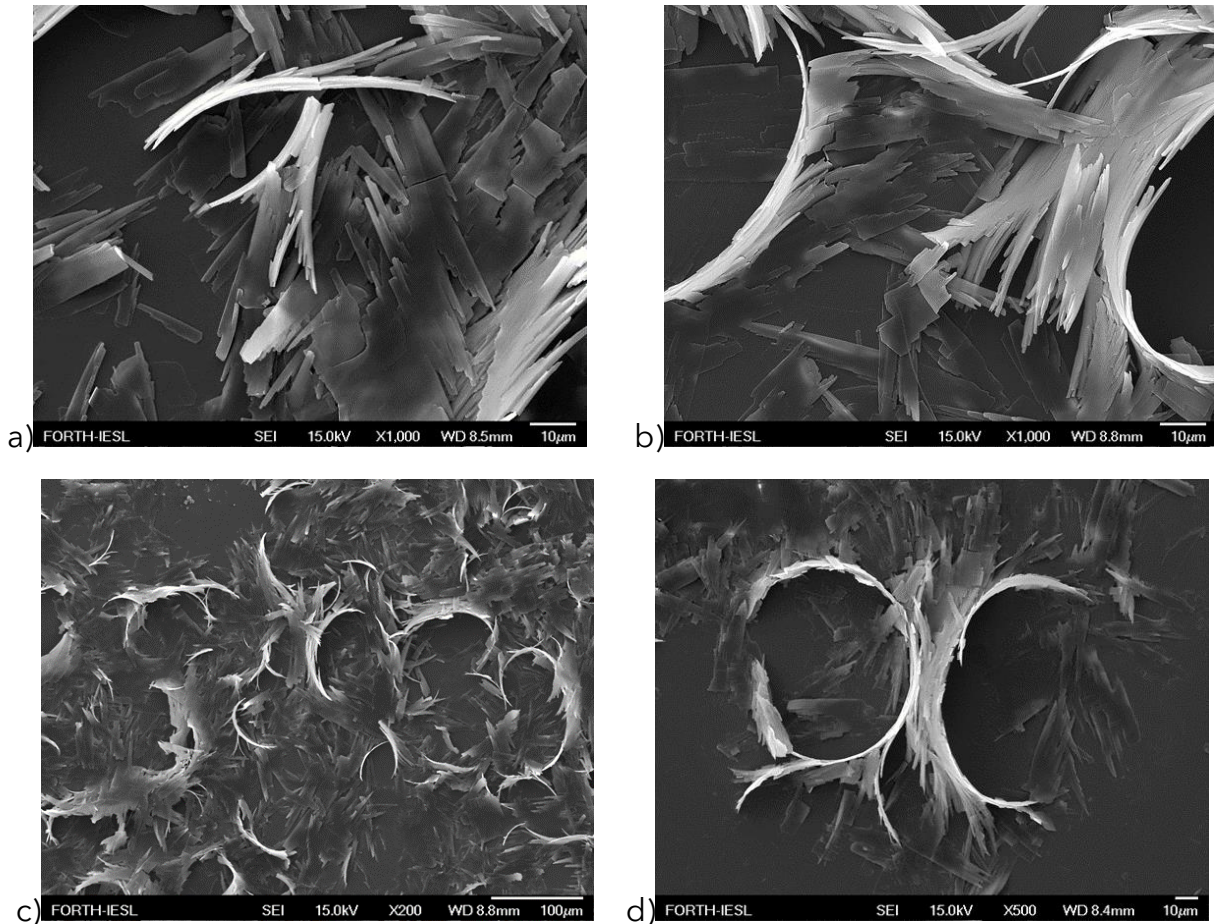
- Fmoc-8-aminooctanoic acid συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ σε Ethanol (C₂H₅OH): H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύσαμε 0.5mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100μl EtOH και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400μl H₂O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500μl και παρατηρήθηκε ότι από ένα διάφανο διάλυμα καταλήξαμε σε ένα διάλυμα με γαλακτώδη όψη. Με το πέρασ 20 λεπτών το διάλυμα μας είχε γίνει διαφανές ένω μετά από μια ώρα είχαν σχηματιστεί λευκά συσσωματώματα τα οποία είχαν καθιζάνει στο γυάλινο φυαλίδιο. Τα συσσωματώματα αυτά μετά το πέρασ των 24 ωρών είχαν αυξήσει τον αριθμό τους και παρέμεναν στο κάτω μέρος του φυαλιδίου.



Εικόνα 30: Fmoc-8-aminooctanoic acid $c=1\text{mg/ml}$ σε Ethanol (C₂H₅OH): H₂O 2:8 όπου είναι διακριτά τα λευκά συσσωματώματα που έχουν σχηματιστεί

Για να παρατηρήσουμε τα πεπτιδικά μας δείγματα στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ξήρανσης που περιγράφηκε και παραπάνω. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για time course, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 31: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-8-amino-octanoic acid $c=1\text{mg/ml}$ σε EtOH: H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-8-amino-octanoic acid σε EtOH:H₂O 2:8 και συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ορθογώνιες πλάκες (flakes) ποικίλων διαστάσεων, οι οποίες όπως παρατηρούμε δεν είναι επίπεδες όπως στο σύστημα διαλυτών HFIP:H₂O αλλά εμφανίζουν μια κυρτότητα, ακόμη παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των flakes σε σχέση με την συγκέντρωση $c=0.5\text{mg/ml}$. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται ότι αυτές οι δομές πακετάρονται ακόμα περισσότερο μεταξύ τους και δημιουργούν μεγαλύτερες δομές.

2. Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH:

Το δεύτερο πεπτίδιο που μας δόθηκε μελετήθηκε σε τέσσερα συστήματα διαλυτών, όπως αναφέρθηκε σε παραπάνω κεφάλαιο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, τα οποία είναι τα 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O, Ethanol (C₂H₅OH): H₂O, Tetrahydrofuran (THF):H₂O και Methanol (CH₃OH): H₂O, και η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιγράφηκε εκτενώς παραπάνω. Για το πρώτο σύστημα οι αναλογίες και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

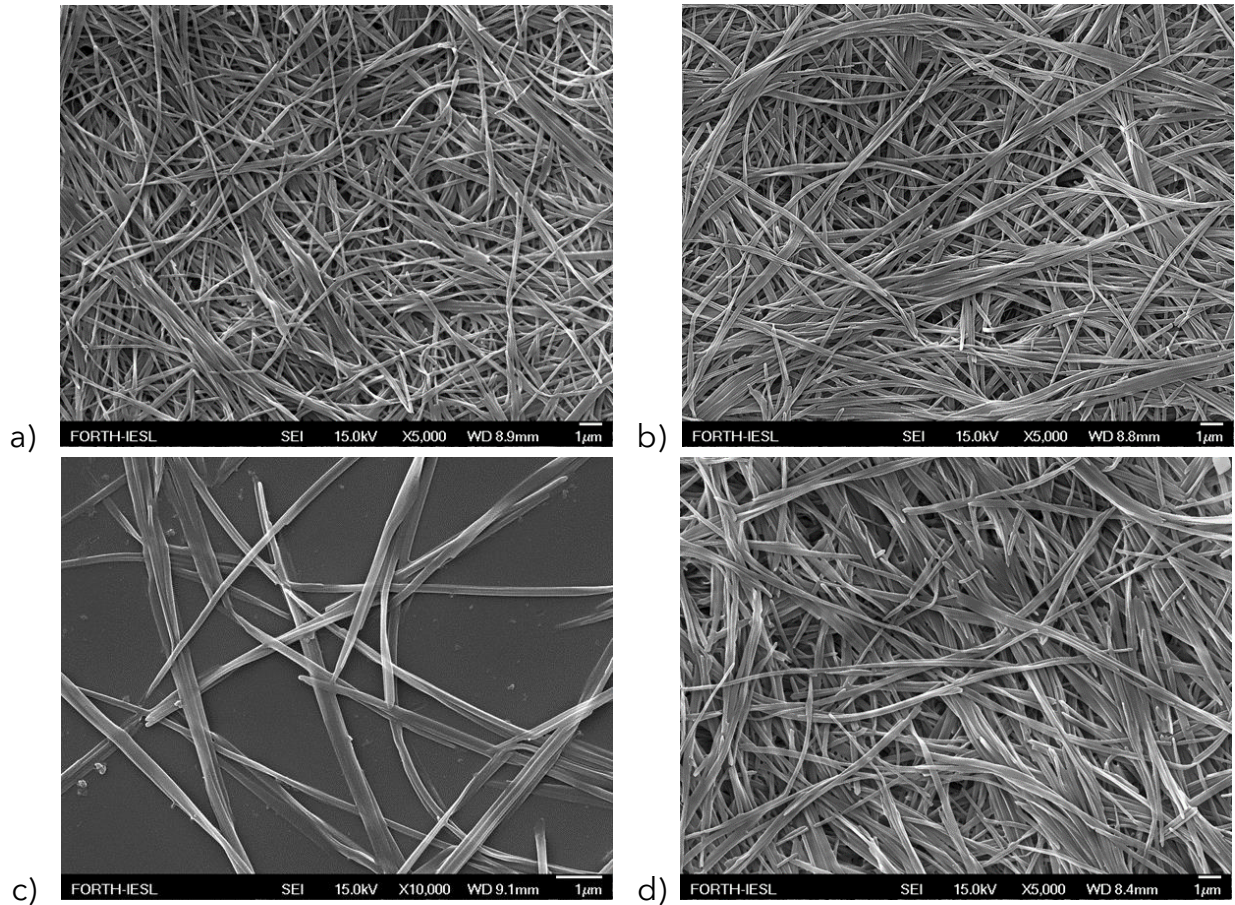
- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H_2O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύσαμε 1mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100μl HFIP και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400μl H_2O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500μl και παρατηρήθηκε αύξηση του ιζώδους του διαλύματος. Μετά το πέρας 10-20 λεπτά, είχαμε την δημιουργία μιας χαλαρής υδρογέλης με γαλακτερό χρώμα. Αφήνοντας το δείγμα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρας των ωρών το ιζώδες του είχε αυξηθεί και κατά συνέπεια δημιουργήθηκε μια χαλαρή υδρογέλη η οποία συνυπήρχε με την υγρή φάση των διαλυτών.



Εικόνα 32: Χαλαρή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε HFIP: H_2O 2:8

Για να παρατηρήσουμε τα πεπτιδικά μας δείγματα από το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ξήρανσης που περιγράφηκε και για το πρώτο πεπτίδιο που μελετήσαμε το Fmoc-8-aminooctanoic acid . Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 33: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε HFIP: H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε HFIP:H₂O 2:8 και συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε πυκνό δίκτυο ινιδίων τα οποία όπως φαίνεται και από την οπτική παρατήρηση έχουν διάμετρο 100-500 nm.

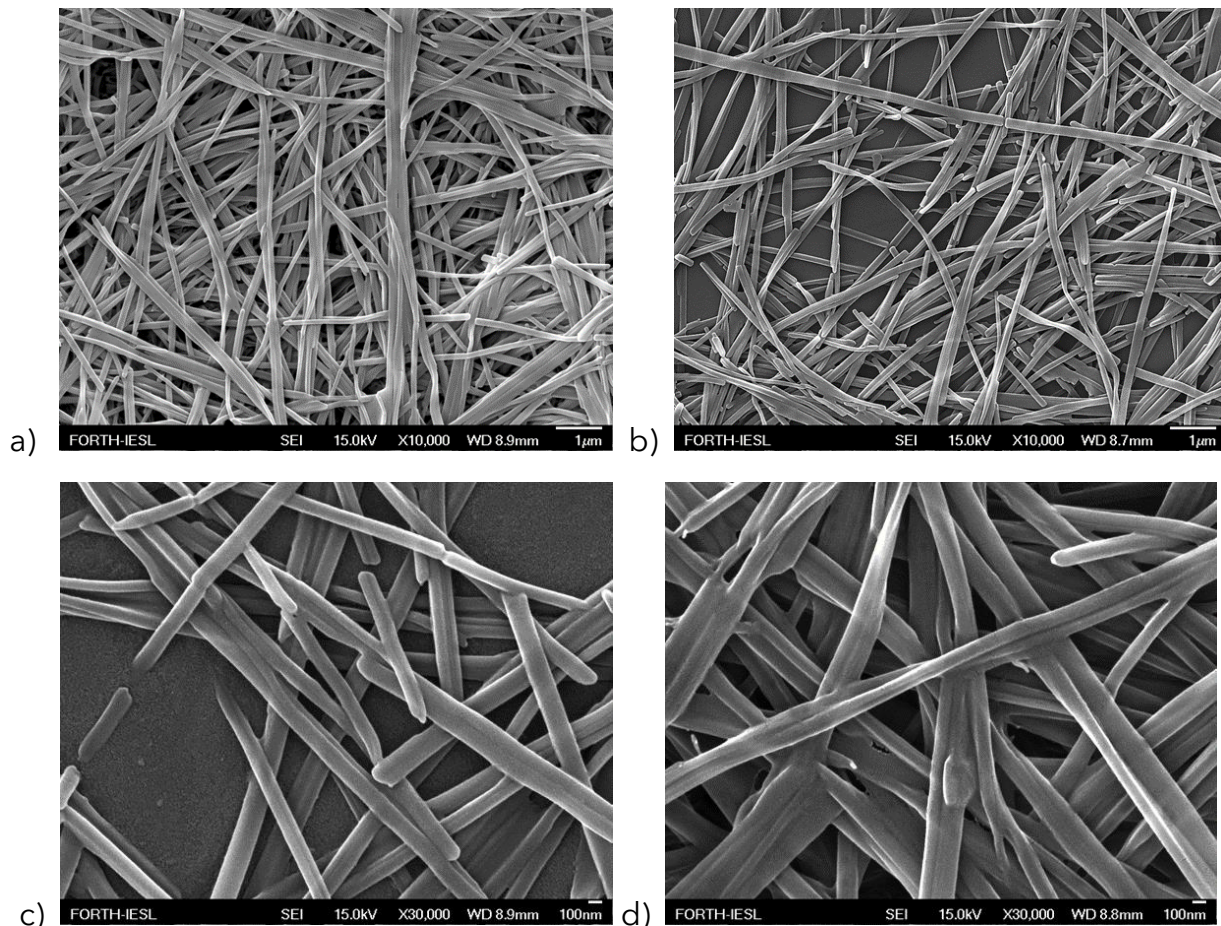
➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύσαμε 0,5mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100µl HFIP και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400µl H₂O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500µl και εντοπίστηκε αύξηση του ιξώδους του διαλύματος. Μετά το πέρας 10-20 λεπτών, είχαμε την δημιουργία μιας χαλαρής υδρογέλης μεγαλακτώδη όψη. Αφήνοντας το διάλυμα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρας των ωρών το ιξώδες του είχε αυξηθεί και κατά συνέπεια δημιουργήθηκε μια χαλαρή υδρογέλη η οποία συνυπήρχε μαζί με την υγρή φάση των διαλυτών, αλλά η υδρογέλη μας ήταν μικρότερη σε ποσοστό από την υδρογέλη που είχαμε για την συγκέντρωση $c=2\text{mg/ml}$.



Εικόνα 34: Χαλαρή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε HFIP:H₂O 2:8

Για να παρατηρήσουμε τα πεπτιδικά μας δείγματα από το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε και για τα υπόλοιπα διαλύματά μας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών.



Εικόνα 35: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε HFIP: H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε HFIP:H₂O 2:8 και συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε πυκνό δίκτυο ινιδίων τα οποία όπως φαίνεται και από την οπτική παρατήρηση έχουν μεγάλη διάμετρο.

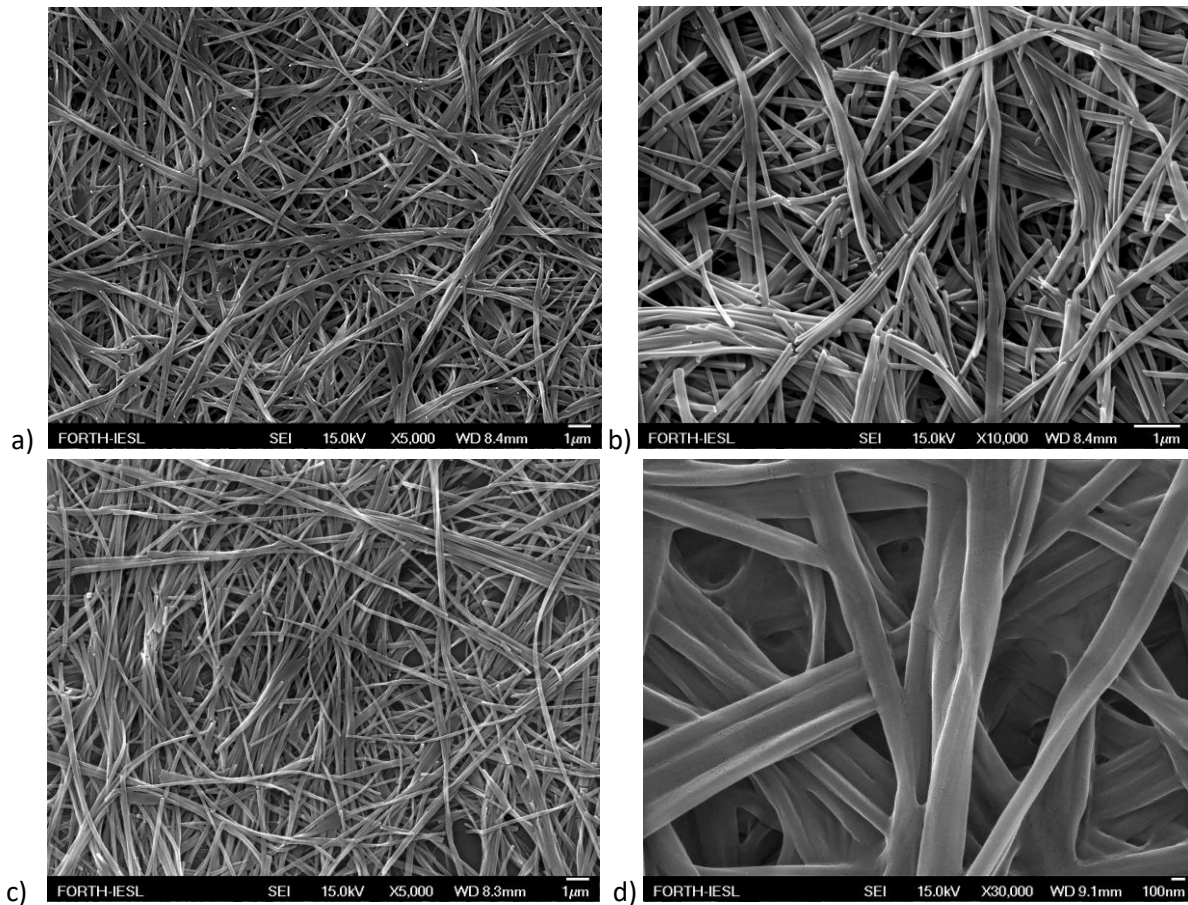
- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=3\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H_2O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύσαμε 1,5mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100μl HFIP και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400μl H_2O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500μl και εντοπίστηκε αύξηση του ιξώδους του διαλύματος. Μετά το πέρας 10-20 λεπτών, είχαμε την δημιουργία μιας χαλαρής υδρογέλης με γαλακτώδη όψη.. Αφήνοντας το διάλυμα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρας των ωρών το ιξώδες του είχε αυξηθεί και κατά συνέπεια δημιουργήθηκε μια χαλαρή υδρογέλη η οποία συνυπήρχε μαζί με την υγρή φάση των διαλυτών, αλλά το ποσοστό της υδρογέλης ήταν αυξημένη σε σχέση με τις δύο προηγούμενες συγκεντρώσεις που περιγράψαμε παραπάνω.



Εικόνα 36: Χαλαρή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=3\text{mg/ml}$ σε HFIP: H_2O 2:8

Η διαδικασία ξήρανσης που ακολουθήθηκε και για αυτό το δείγμα ήταν η ίδια όπως και με τα προηγούμενα δείγματα και πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών.

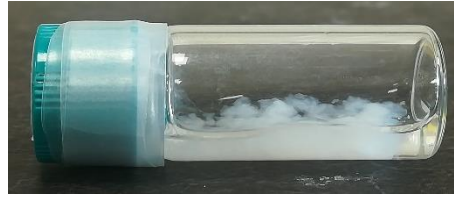


Εικόνα 37: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=3\text{mg/ml}$ σε HFIP: H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε HFIP:H₂O 2:8 και συγκέντρωσης $c=3\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε πυκνότερο δίκτυο ινιδίων σε σχέση με τις προηγούμενες συγκεντρώσεις που είδαμε παραπάνω, τα οποία όπως φαίνεται και από την οπτική παρατήρηση έχουν μεγάλη διάμετρο.

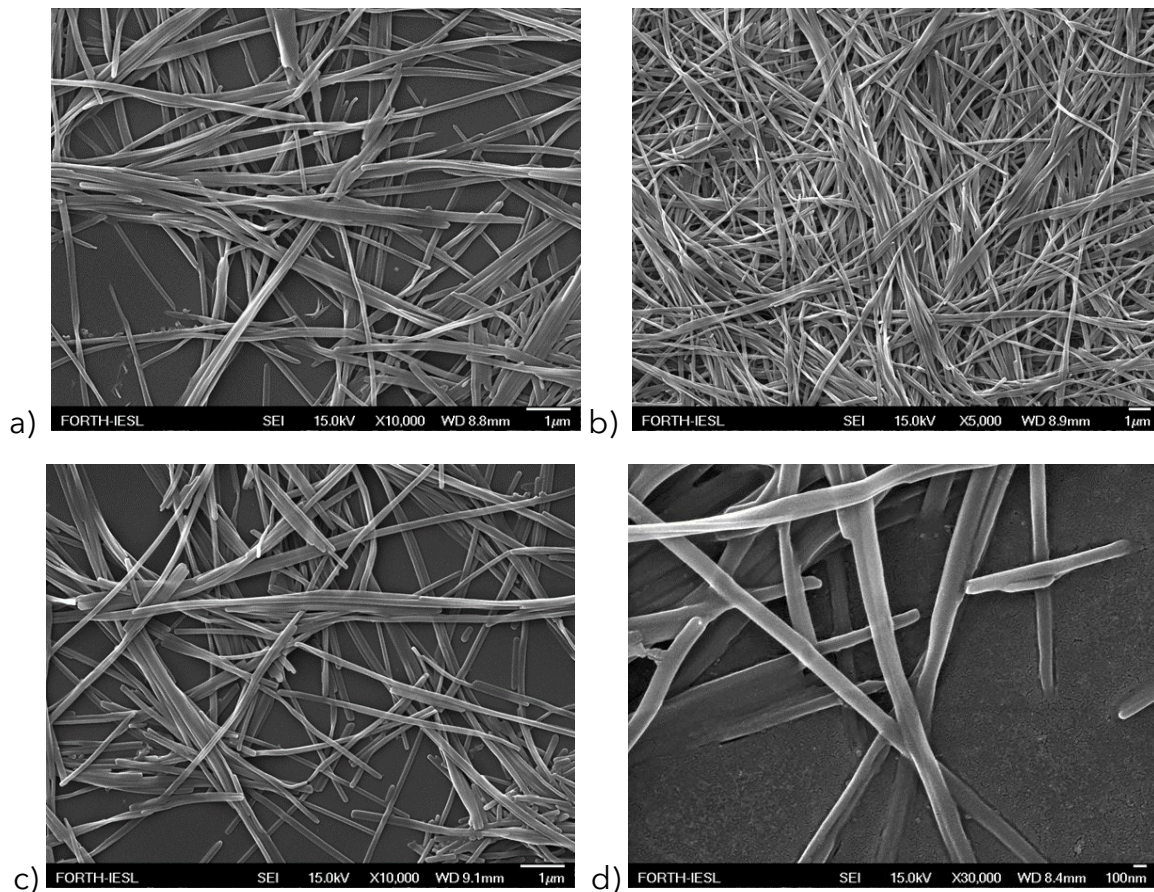
➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=5\text{mg/ml}$ σε 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP): H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύσαμε 2,5mg από την πεπτιδική μας σκόνη σε 100ml HFIP και παρατηρήθηκε ότι διαλύεται κατευθείαν. Έπειτα προσθέσαμε 400ml H₂O επομένως το διάλυμα μας απέκτησε τελικό όγκο 500ml και εντοπίστηκε αύξηση του ιξώδους του διαλύματος. Μετά το πέρασ 5 λεπτών, είχαμε την δημιουργία μιας χαλαρής υδρογέλης με γαλακτώδη όψη. Αφήνοντας το διάλυμα μας overnight παρατηρήθηκε ότι το ιξώδες της υδρογέλης είχε αυξηθεί και κατά συνέπεια δημιουργήθηκε μια χαλαρή υδρογέλη η οποία συνυπήρχε μαζί με την υγρή φάση των διαλυτών, αλλά η ποσότητα της υδρογέλης ήταν αυξημένη σε σχέση με τις συγκεντρώσεις που έχουμε ήδη εξετάσει.



Εικόνα 38: Χαλαρή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=5\text{mg/ml}$ σε HFIP:H₂O 2:8

Η διαδικασία ξήρανσης που ακολουθήθηκε και για αυτό το δείγμα ήταν η ίδια όπως και με τα προηγούμενα δείγματα και πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών.



Εικόνα 39: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=5\text{mg/ml}$ σε HFIP: H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε HFIP:H₂O 2:8 και συγκέντρωση $c=5\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε πυκνότερο δίκτυο ινιδίων ήδη από τις πρώτες 24 ώρες της αυτοοργάνωσης του.

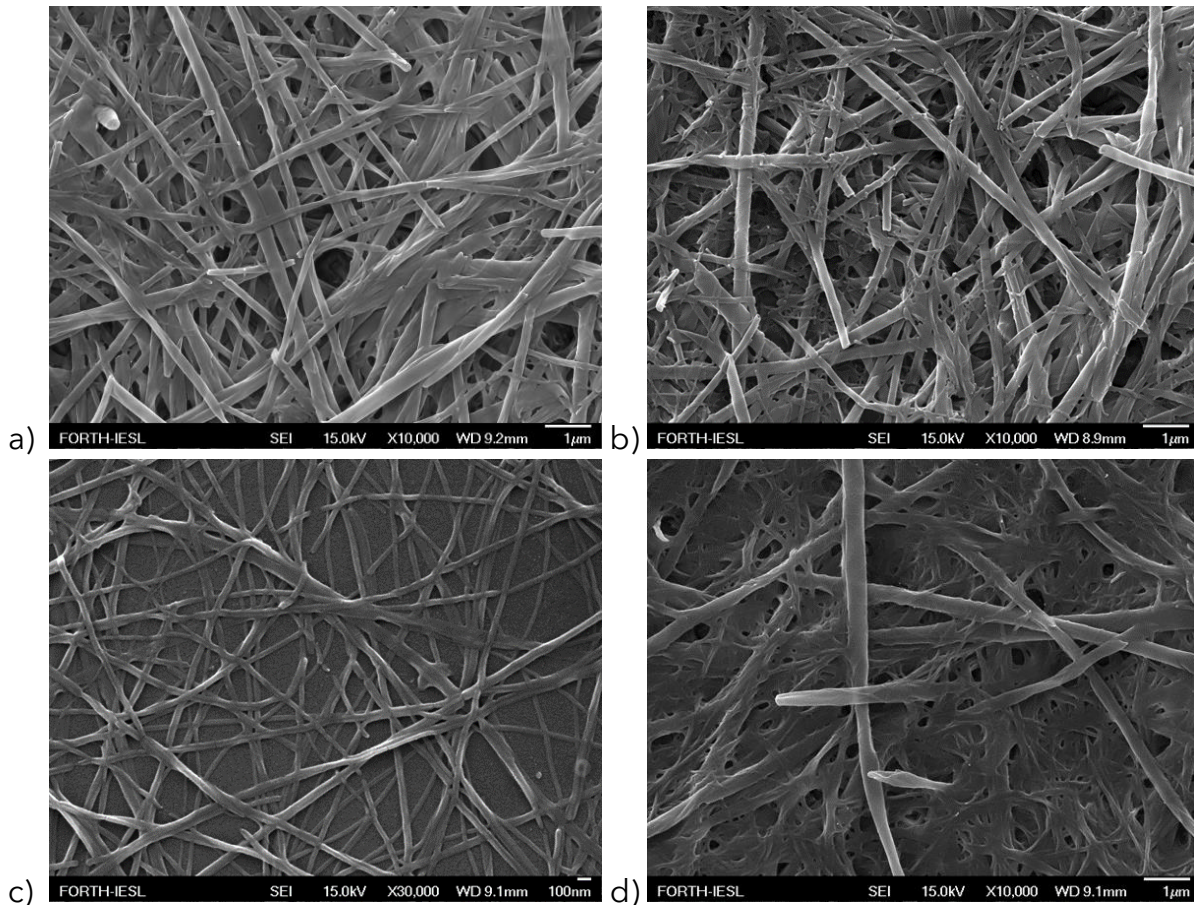
- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=0.5\text{mg/ml}$ σε Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): H_2O αναλογίας 2:8

Πρώτα διαλύουμε 0,25mg από το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 100μl EtOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο με την πεπτιδική σκόνη και την αιθανόλη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στην αιθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο vial 400μl H_2O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Έπειτα από 2 ώρες παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα της υδρογέλης από διαυγής σε γαλακτερή και περαιτέρω αύξηση του ιξώδους της. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο, αλλά δεν είχαμε τον σχηματισμό μιας αρκετά σταθερής υδρογέλης.



Εικόνα 40: Χαλαρή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=0,5\text{mg/ml}$ σε EtOH: H_2O 2:8

Η διαδικασία ξήρανσης που ακολουθήθηκε και για αυτό το δείγμα ήταν η ίδια όπως και με τα προηγούμενα δείγματα στο σύστημα διαλυτών HFIP: H_2O και πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών.



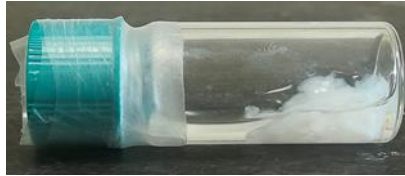
Εικόνα 41: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=0.5\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 2:8
 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O 2:8 και συγκέντρωση $c=0.5\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε δίκτυο ινιδίων τα οποία έχουν μεγάλη διάμετρο. Ακόμη ήδη από τις πρώτες 15 μέρες βλέπουμε ότι αυτό το δίκτυο έχει περιπλεχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό έτσι ώστε μόνο τα πιο μεγάλα ινίδια να καταφέρνουν να ξεχωρίζουν.

➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ σε Ethanol (C₂H₅OH): H₂O αναλογίας 3:7

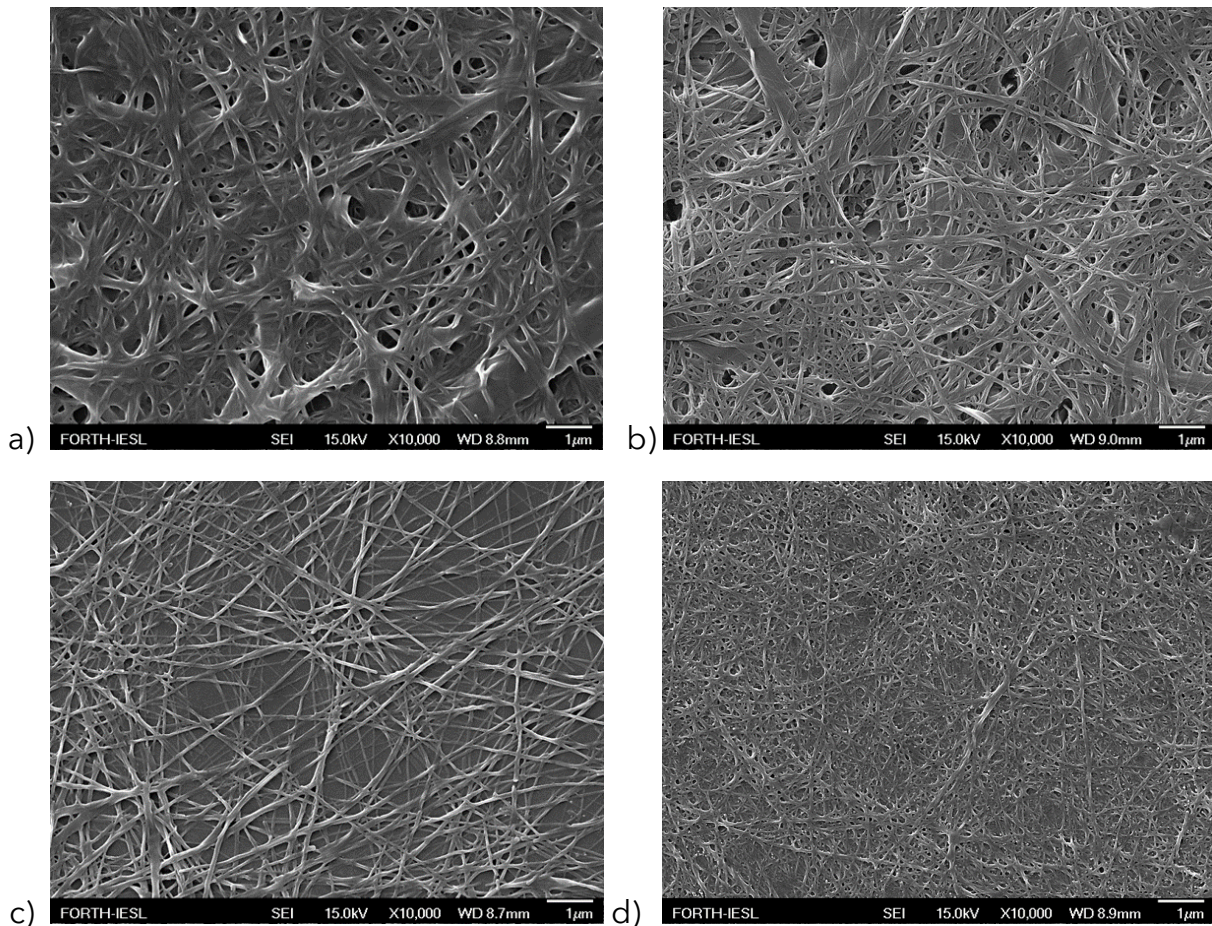
Πρώτα διαλύουμε 0,5mg από το πεπτίδιο μας σε 150μl EtOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και τον «καλό» διαλύτη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στην αιθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο vial 350μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Έπειτα από 2 ώρες παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα της υδρογέλης από διαυγής σε γαλακτερή

και περαιτέρω αύξηση του ιζώδους της. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιζώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο, αλλά δεν είχαμε τον σχηματισμό μιας αρκετά σταθερής υδρογέλης.



Εικόνα 42: Χαλαρή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 3:7

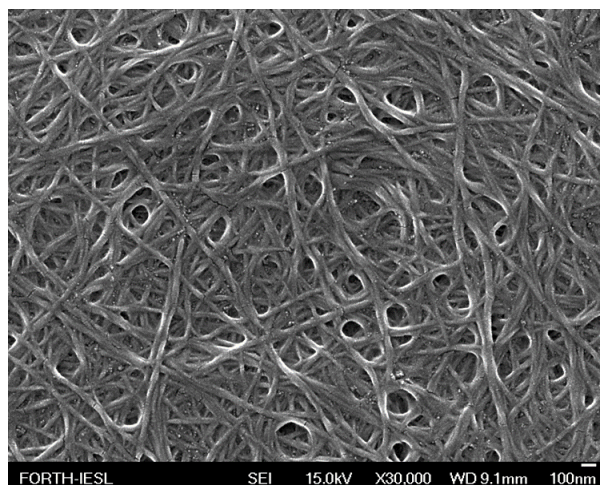
Η διαδικασία ξήρανσης που ακολουθήθηκε και για αυτό το δείγμα ήταν η ίδια όπως και με το προηγούμενο δείγμα συγκέντρωσης $c=0.5\text{mg/ml}$ και πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 43: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 3:7 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας καταλήγουμε στο ότι το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O 3:7 και συγκέντρωση $c=1\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε πυκνό δίκτυο ινιδίων τα οποία ήδη από την πρώτη ημέρα είναι τόσο πυκνά που είναι

δύσκολο να εντοπιστούν περιοχές με μεμονωμένες ίνες. Αυτό το φαινόμενο συνεχίζεται με την πάροδο του χρόνου αφού και σε μεγάλες μεγενθύνσεις το δίκτυο των ινιδίων φαίνεται να υπάρχει σε όλο το πλακίδιο παρατήρησης. Ακόμη πρέπει να σημειωθεί ότι με την πάροδο 2 μηνών το δείγμα μας παρατηρήσαμε ότι είχε δημιουργήσει μια πιο σταθερή υδρογέλη σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε αρχικά για αυτό τον λόγο λάβαμε και πάλι δείγμα για το χρονικό διάστημα 2 μηνών έτσι ώστε να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε αν έχει αλλάξει κάτι στην αυτοοργάνωση του πεπτιδίου μας το οποίο οδήγησε στην σταθεροποίηση του gel.

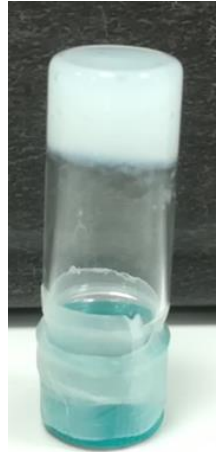


Εικόνα 44: Φωτογραφία Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 3:7 Δείγμα 2 μηνών

Όπως βλέπουμε από την οπτική παρατήρηση η δομή του δείγματος μας δεν έχει αλλοιωθεί παραμένει ένα πολύ πεπλεγμένο δίκτυο ινών, που με την πάροδο των 2 μηνών οι ίνες έχουν αρχίσει να συσσωματώνονται πολύ περισσότερο σε σχέση με τα πρώτα μας δείγματα.

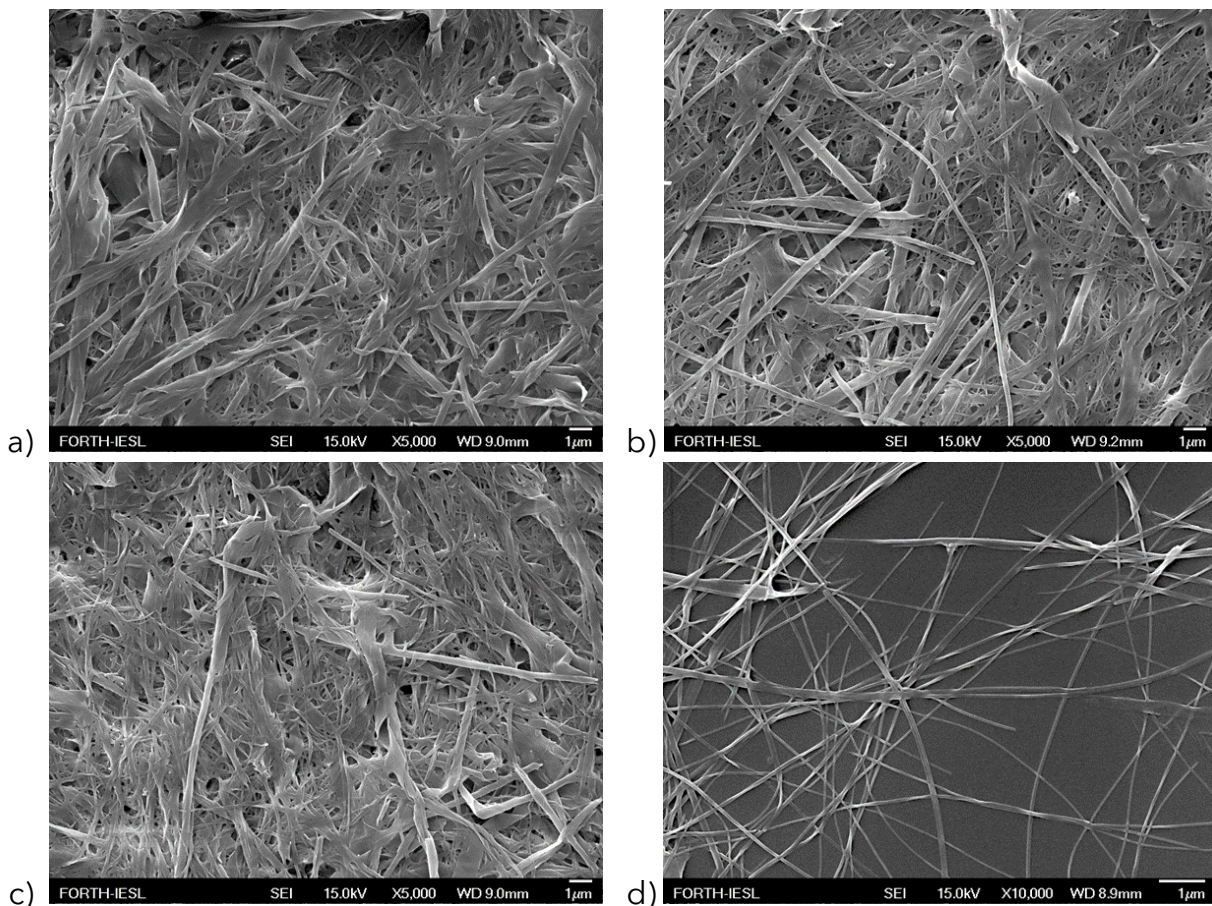
- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=3\text{mg/ml}$ σε Ethanol (C₂H₅OH): H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά διαλύουμε 1,5mg από το πεπτίδιο μας σε 100μl EtOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και τον «καλό» διαλύτη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στην αιθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο vial 400μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Έπειτα από 2 ώρες παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα της υδρογέλης από διαυγής σε γαλακτώδη και περαιτέρω αύξηση του ιξώδους της. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο προς τον σχηματισμό μιας σταθερής υδρογέλης.



Εικόνα 45: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=3\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 2:8

Ακολουθήσαμε και πάλι την ίδια διαδικασία ξήρασης όπως και στα προηγούμενα δείγματα στο σύστημα διαλυτών και συγκεντρώσεων και πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 46: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=3\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O 2:8 και συγκέντρωσης c=3mg/ml αυτοοργανώνεται σε πυκνότερο δίκτυο ινιδίων σε σχέση με τις δύο προηγούμενες συγκεντρώσεις που έχουμε ήδη μελετήσει, τα ινίδια του συγκεκριμένου δικτύου όπως φαίνεται και από την οπτική παρατήρηση έχουν αρκετά μεγάλη διάμετρο ήδη από τις πρώτες 24 ώρες δημιουργίας τους.

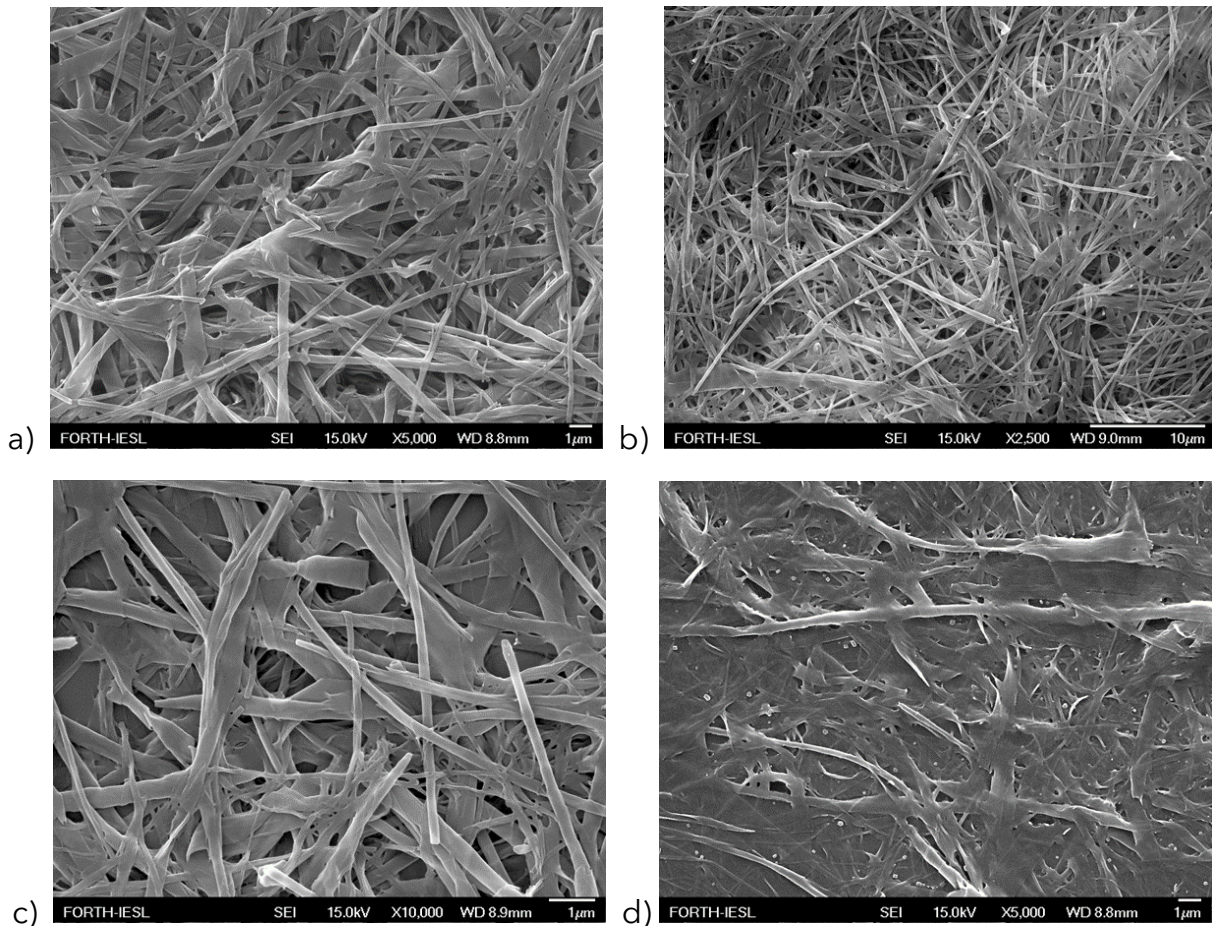
➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης c=2mg/ml σε Ethanol (C₂H₅OH): H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά προσθέτουμε 1mg από την πεπτιδική σκόνη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 100μl EtOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φυαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και τον «καλό» διαλύτη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στην αιθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο vial 400μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Έπειτα από 2 ώρες παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα της υδρογέλης από διαυγής σε γαλακτερή και περαιτέρω αύξηση του ιξώδους της. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο προς τον σχηματισμό μιας σταθερής υδρογέλης.



Εικόνα 47: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH c=2mg/ml σε EtOH:H₂O 2:8

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ξήρανσης όπως και στα προηγούμενα δείγματα στο σύστημα διαλυτών και συγκεντρώσεων και πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών.



Εικόνα 48: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Όπως παρατηρούμε από τις παραπάνω εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O 2:8 και σε συγκέντρωση $c=2\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ένα αρκετά πυκνό δίκτυο ινιδίων. Τα ινίδια αυτά έχουν μεγάλη διάμετρο και αυξητική τάση συσσωμάτωσης ήδη από τις πρώτες μέρες με αποτέλεσμα στις 15 μέρες το δίκτυο να είναι τόσο πυκνό που να ξεχωρίζει με δυσκολία και μπορούν να παρατηρηθούν μονάχα οι ίνες μεγαλύτερου μεγέθους και διαμέτρου.

➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε Ethanol (C₂H₅OH): H₂O αναλογίας 1:9

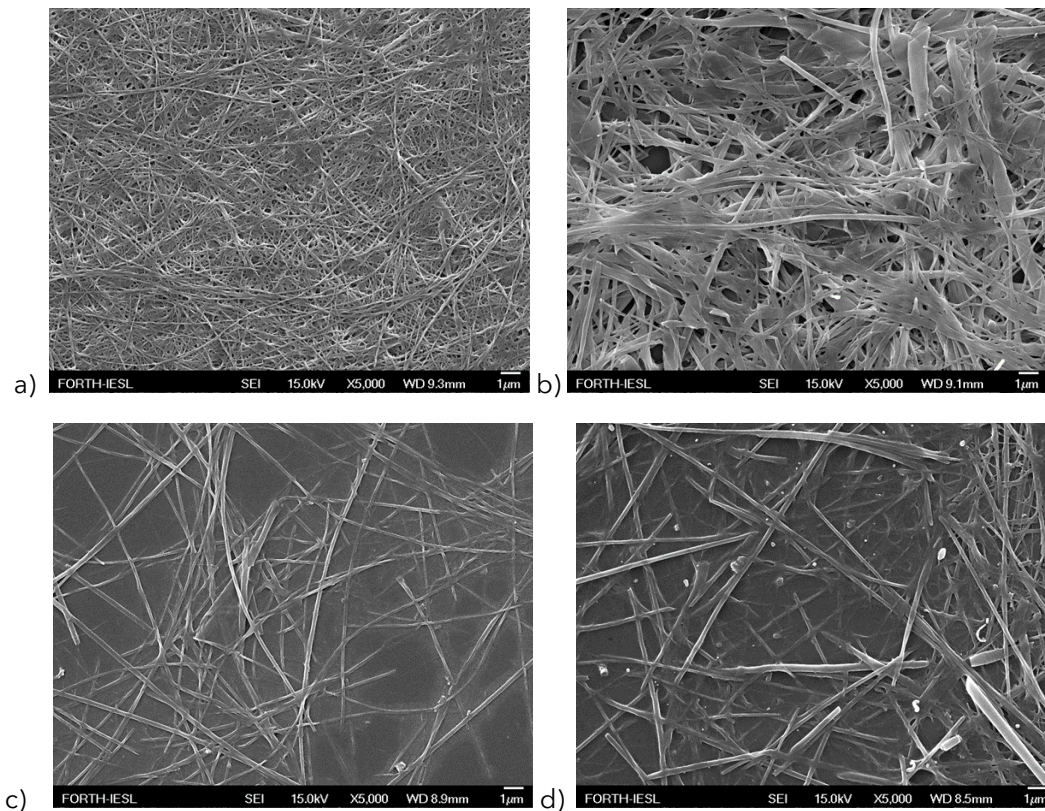
Αρχικά προσθέτουμε 2mg από την πεπτιδική σκόνη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 100µl EtOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και τον «καλό» διαλύτη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτιδίο μας στην αιθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο vial 900µl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 1000µl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η

δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Έπειτα από 2 ώρες παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα της υδρογέλης από διαυγής σε γαλακτερή και περαιτέρω αύξηση του ιξώδους της. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας σταθερής υδρογέλης.



Εικόνα 49: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 1:9

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ξήρανσης όπως και στα προηγούμενα δείγματα στο σύστημα διαλυτών και συγκεντρώσεων και πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών.

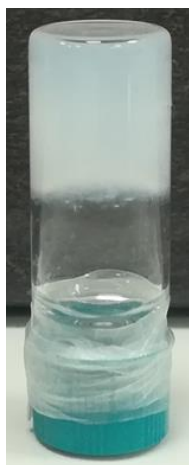


Εικόνα 50: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 1:9 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Όπως παρατηρούμε από τις παραπάνω εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O 1:9 και σε συγκέντρωση $c=2\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ένα πολύ πυκνό δίκτυο ινιδίων. Τα ινίδια αυτά έχουν μεγάλη διάμετρο και με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται έντονη συσσωμάτωση με αποτέλεσμα στις 15 μέρες τα ινίδια που είναι ευδιάκριτα είναι αυτά μεγαλύτερου μεγέθους και διαμέτρου. Επίσης το συγκεκριμένο δείγμα από ότι φαίνεται από το gel που έχει δημιουργηθεί είναι από τα πιο ισχυρά gel που δημιουργήσαμε διαλύοντας το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O, ένα σύστημα διαλυτών αρκετά βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο.

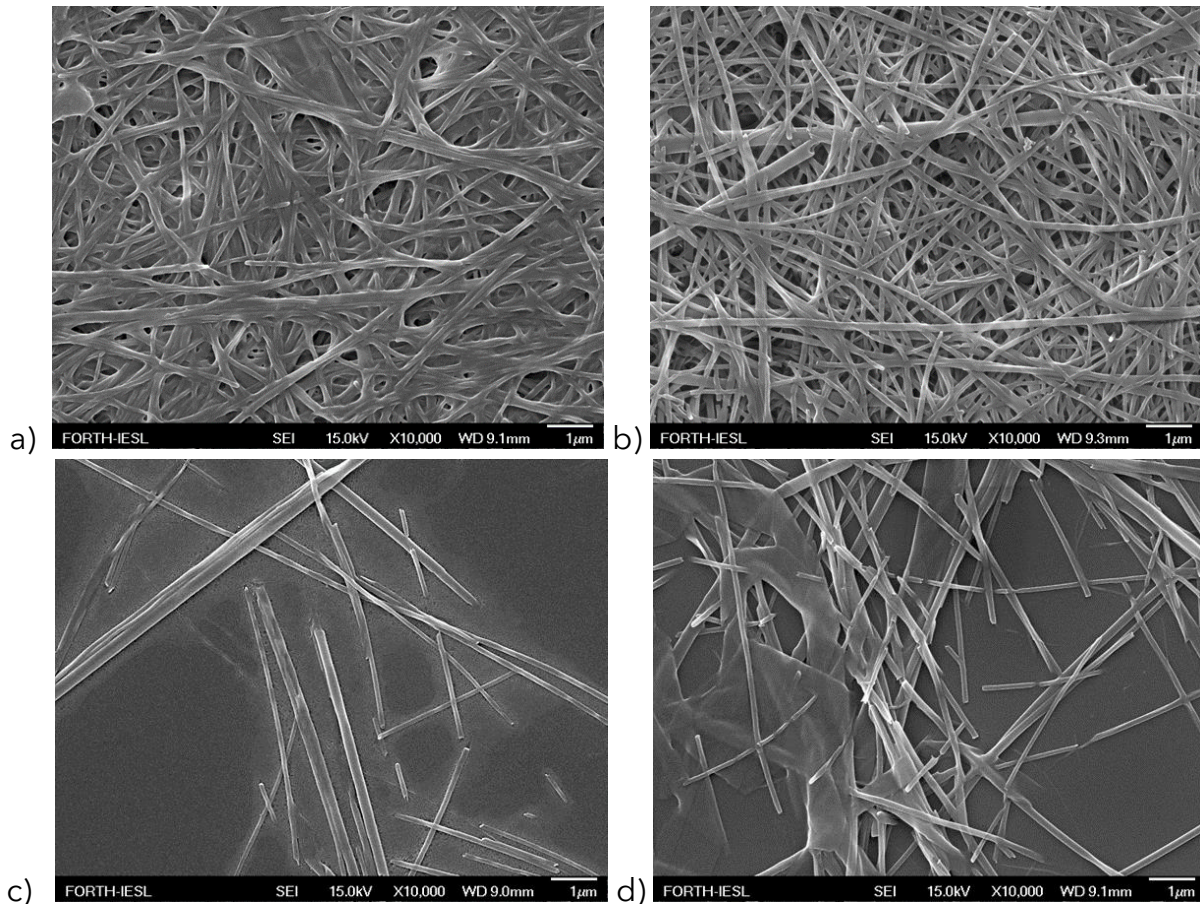
➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ σε Ethanol (C₂H₅OH): H₂O αναλογίας 1:9

Αρχικά προσθέτουμε 1mg από την πεπτιδική σκόνη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 100μl EtOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φυαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και τον «καλό» διαλύτη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτιδίο μας στην αιθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο vial 900μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 1000μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Έπειτα από 2 ώρες παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα της υδρογέλης από διαυγής σε γαλακτώδη και περαιτέρω αύξηση του ιξώδους της. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας σταθερής, πιο διαυγούς υδρογέλης σε σχέση με την υδρογέλη που σχηματίστηκε στην συγκέντρωση $c=2\text{mg/ml}$.



Εικόνα 51: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 1:9

Ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία ξήρανσης όπως και στα προηγούμενα δείγματα στο σύστημα διαλυτών και συγκεντρώσεων και πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών

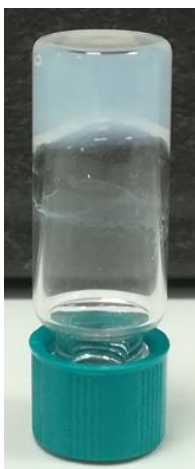


Εικόνα 52: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O 1:9 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Όπως παρατηρούμε από τις παραπάνω εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O 1:9 και σε συγκέντρωση $c=2\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ένα πολύ πυκνό δίκτυο ινιδίων. Τα ινίδια αυτά έχουν μεγάλη διάμετρο και με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται έντονη συσσωμάτωση με αποτέλεσμα στις 15 μέρες να έχουν δημιουργηθεί φύλλα από τα ινίδια όπως διαπιστώνουμε από την αντίστοιχη εικόνα. Επίσης το συγκεκριμένο δείγμα από ότι φαίνεται από το gel που έχει δημιουργηθεί είναι από τα πιο ισχυρά gel και πιο διαυγή που δημιουργήσαμε διαλύοντας το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O γεγονός που το θέτει ως το καταλληλότερο υλικό για τον έλεγχο εγκαψυλίωσης και απελευθέρωσης φαρμάκου και για περαιτέρω μελλοντικές εφαρμογές.

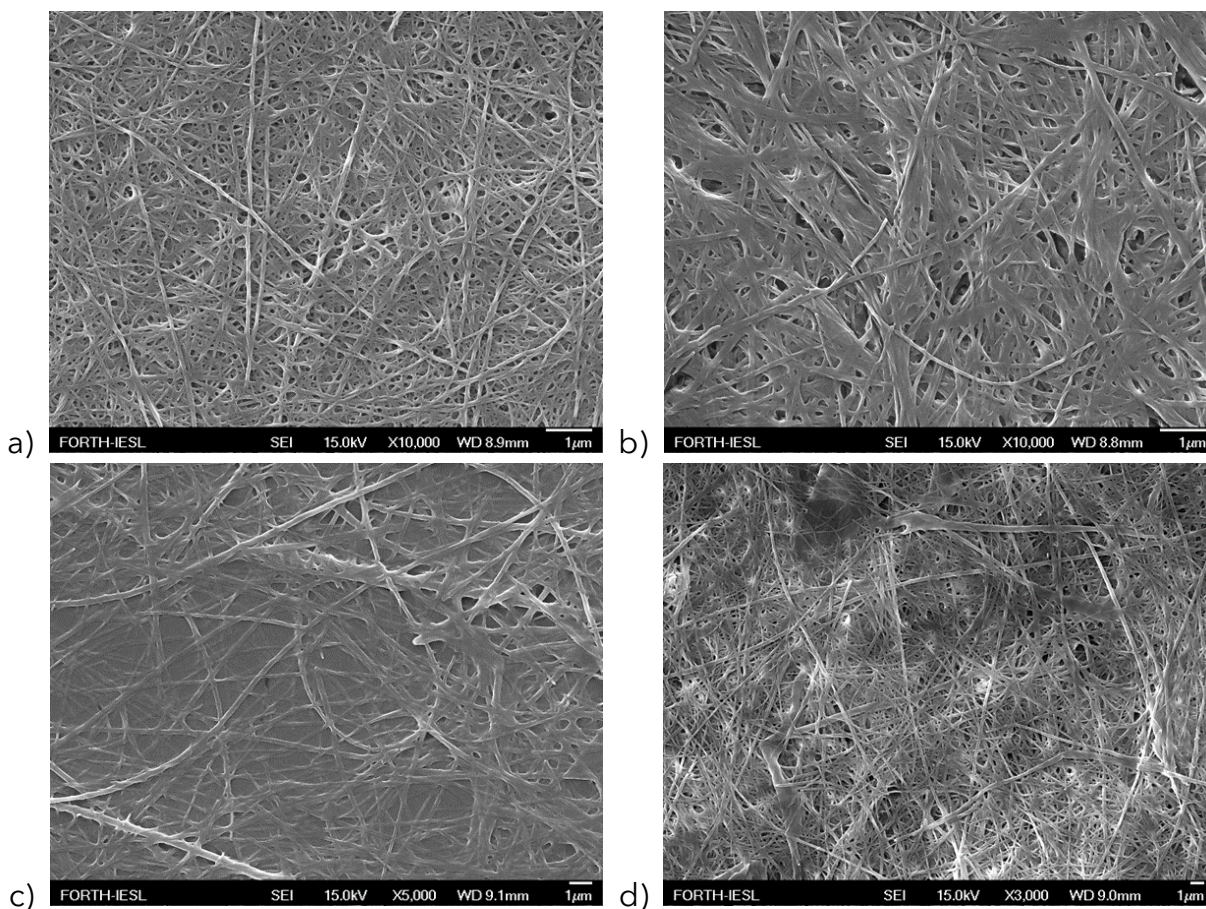
- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε Methanol (CH_3OH): H_2O αναλογίας 2:8

Αρχικά προσθέτουμε 1mg από την πεπτιδική σκόνη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 100μl MeOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και την μεθανόλη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και το δείγμα τίθεται σε θερμική επεξεργασία υπερήχων για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στην μεθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο vial 400μl H_2O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας σταθερής υδρογέλης, γαλακτερού χρώματος αλλά με την παρουσία μικρής ποσότητας υγρασίας από τους διαλύτες.



Εικόνα 53: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε MeOH: H_2O 2:8

Ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία ξήρανσης όπως και στα προηγούμενα δείγματα στο σύστημα διαλυτών και συγκεντρώσεων η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 54: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O 2:8
 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Με την βοήθεια της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM φτάνουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε MeOH:H₂O 2:8 και σε συγκέντρωση $c=2\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ένα πολύ πυκνό δίκτυο ινιδίων, η ύπαρξη του οποίου είναι εμφανής ήδη από τις πρώτες 24 ώρες. Τα ινίδια έχουν μεγάλη διάμετρο όπως και στα προηγούμενα δείγματα που έχουν αναφερθεί και στο δείγμα των 15 ημερών παρατηρείται αυξημένη συσσωμάτωση των ινιδίων και δημιουργία ενός πεπλεγμένου δικτύου ινών.

➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε Methanol (CH₃OH): H₂O αναλογίας 3:7

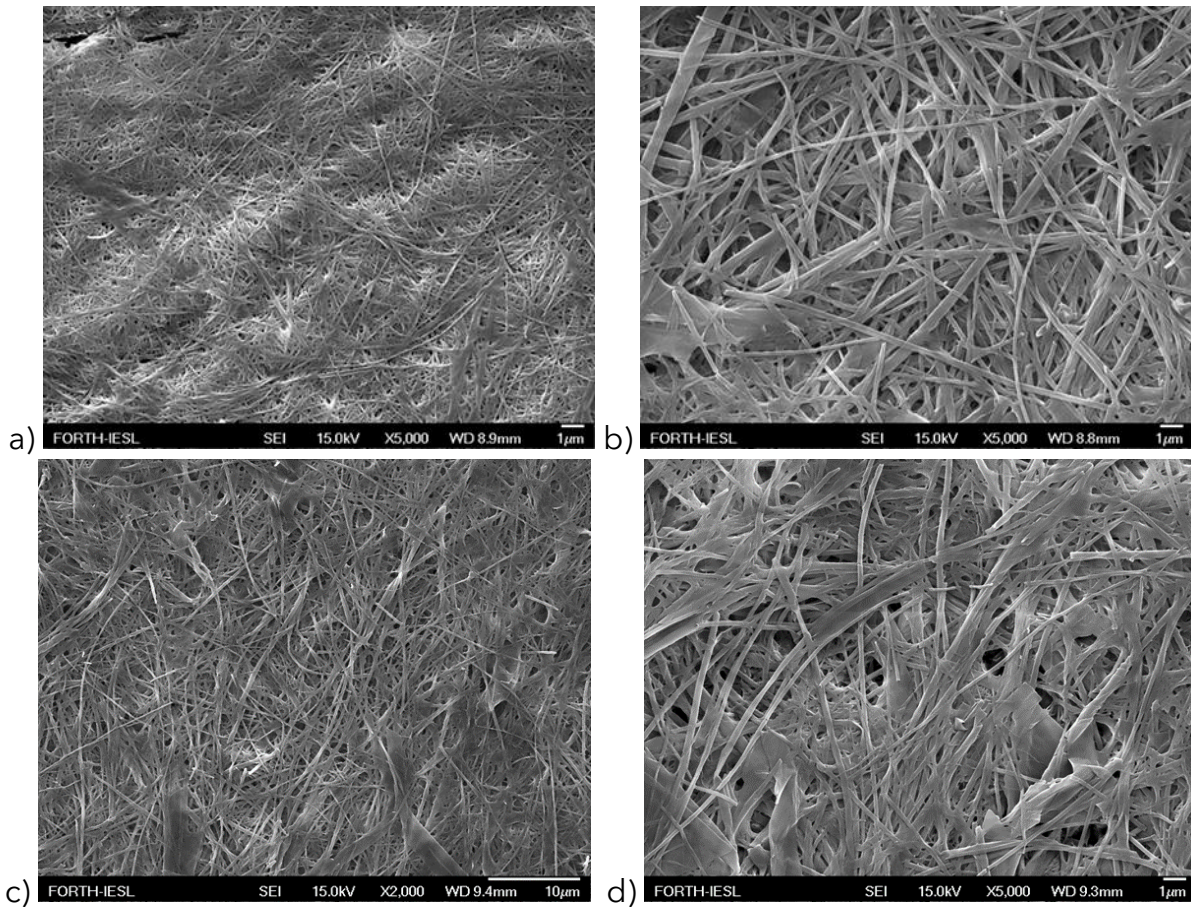
Ως πρώτο μας βήμα για την δημιουργία του συγκεκριμένου δείγματος είναι η προσθήκη 1mg από την πεπτιδική σκόνη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 150μl MeOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και την μεθανόλη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτιδίο μας στην μεθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο γυάλινο φιαλίδο 350μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του

ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας σταθερής υδρογέλης, γαλακτώδους όψης και πιο σταθερή από την υδρογέλη που δημιουργήθηκε στο προηγούμενο σύστημα διαλυτών.



Εικόνα 55: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O 3:7

Το δείγμα μας τέθηκε σε διαδικασία ξήρανσης κατά την οποία ακολουθήσαμε τα ίδια βήματα με τα προηγούμενα δείγματα στο σύστημα διαλυτών και συγκεντρώσεων η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 56: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O 3:7
 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Με την βοήθεια των εικόνων από την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία FE-SEM καταλήγουμε στο ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε MeOH:H₂O 3:7 και σε συγκέντρωση $c=2\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ένα πολύ πυκνό δίκτυο ινιδίων, η ύπαρξη του οποίου είναι εμφανής ήδη από τις πρώτες 24 ώρες. Τα ινίδια αυτά έχουν μεγάλη διάμετρο και με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται έντονη συσσωμάτωση με αποτέλεσμα στις 15 μέρες να έχουν δημιουργηθεί φύλλα από τα ινίδια όπως διαπιστώνουμε από τις εικόνες.

➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=4\text{mg/ml}$ σε Methanol (CH₃OH): H₂O αναλογίας 2:8

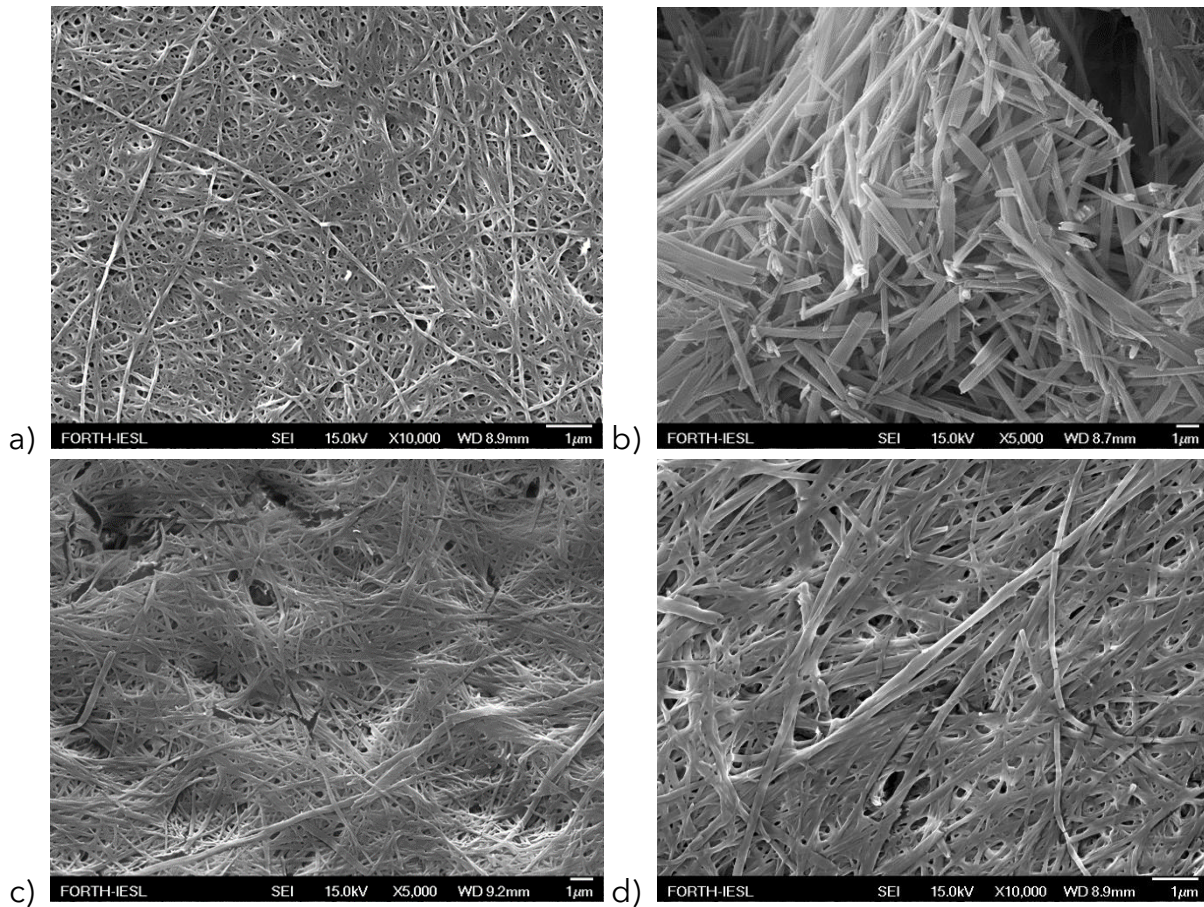
Αρχικά προσθέτουμε 2mg από την πεπτιδική σκόνη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 100μl MeOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Επομένως τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και τον «καλό» μας διαλύτη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στην μεθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο γυάλινο φιαλίδο 400μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η

δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας πολύ σταθερής υδρογέλης,γαλακτώδους όψης..



Εικόνα 57: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH c=4mg/ml σε MeOH:H₂O 2:8

Το δείγμα μας τέθηκε σε διαδικασία ξήρανσης κατά την οποία ακολουθήσαμε τα ίδια βήματα με τα προηγούμενα δείγματα η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών, όπως φαίνεται και στις ακόλουθες φωτογραφίες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.



Εικόνα 58: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=4\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O 2:8
 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Όπως διαπιστώνουμε και από τις εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε MeOH:H₂O 2:8 και σε συγκέντρωση $c=4\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ένα πυκνό δίκτυο ινιδίων. Τα ινίδια αυτά έχουν μεγάλη διάμετρο και με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται έντονη συσσωμάτωση με αποτέλεσμα στις 15 μέρες να έχουν δημιουργηθεί φύλλα από τα ινίδια όπως διαπιστώνουμε από τις εικόνες. Ακόμη στο δείγμα της 3^{ης} μέρας παρατηρείται η δημιουργία νανοσωληνίσκων, δομής την οποία δεν έχουμε ξανασυναντήσει σε κανένα σύστημα διαλυτών από αυτά που έχουμε ελέγξει.

➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ σε Methanol (CH₃OH): H₂O αναλογίας 1:9

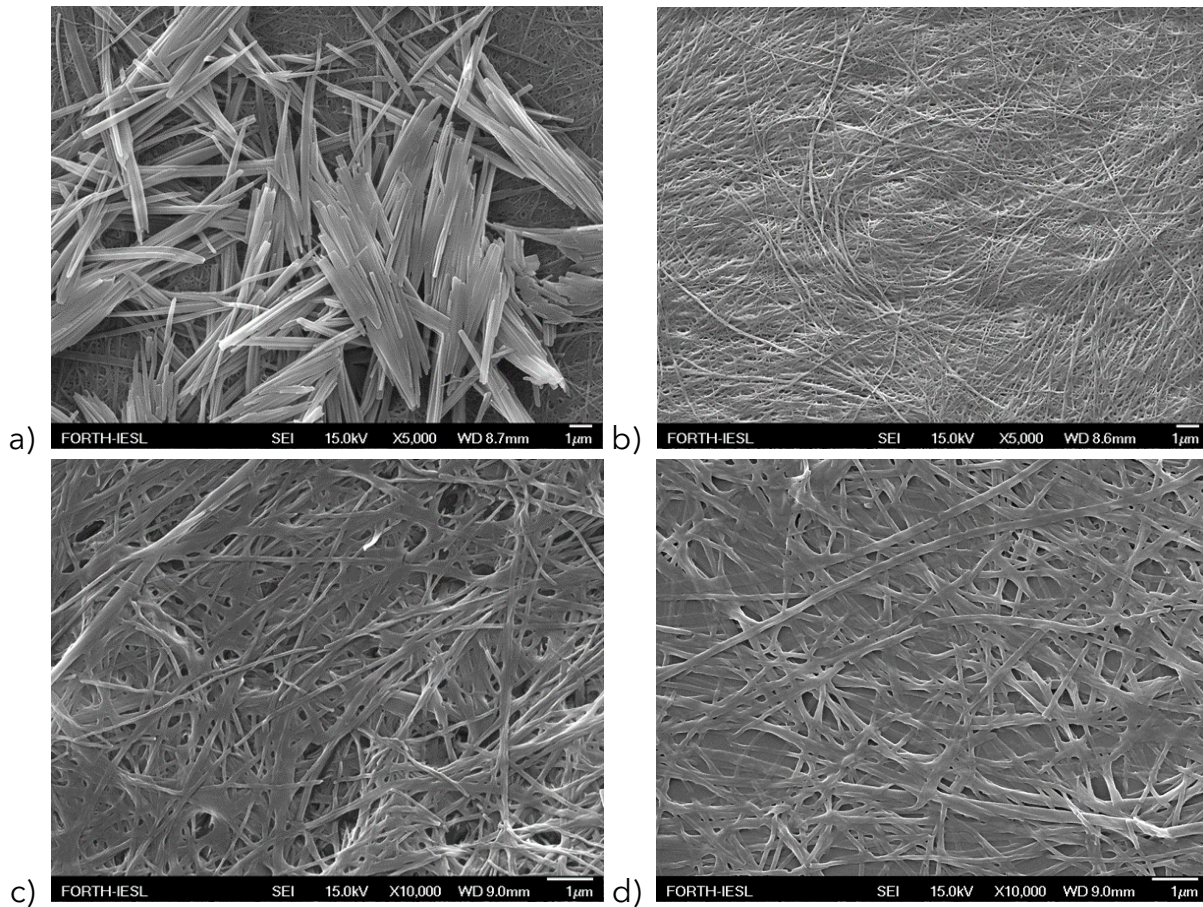
Αρχικά προσθέτουμε 1mg του πεπτιδίου Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 100μl MeOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Επομένως τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και τον «καλό» μας διαλύτη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτιδίο μας στην μεθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο γυάλινο φιαλίδιο 900μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 1000μl. Με την προσθήκη του νερού

παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας αρκετά σταθερής υδρογέλης πιο διαυγούς όψης σε σχέση με τα υπόλοιπα gel που έχουμε κατασκευάσει στην συγκεκριμένη εργασία.



Εικόνα 59: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O 1:9

Για το δείγμα μας ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία ξήρανσης την οποία ακολουθήσαμε και με τα προηγούμενα δείγματα η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών, όπως φαίνεται και στις ακόλουθες φωτογραφίες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.



Εικόνα 60: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O 1:9
 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM φτάνουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε MeOH:H₂O 1:9 και σε συγκέντρωση $c=1\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ένα πυκνό δίκτυο ινιδίων. Την πρώτη ημέρα παρατηρούνται δύο δομές και το δίκτυο των ινιδίων αλλά και συστάδες νανοσωληνίσκων πάνω από το δίκτυο. Τα ινίδια έχουν μεγάλη διάμετρο και με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται έντονη συσσωμάτωση με αποτέλεσμα στις 15 μέρες να παρατηρείται πυκνό και πεπλεγμένο δίκτυο ινιδίων.

➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=4\text{mg/ml}$ σε Methanol (CH₃OH): H₂O αναλογίας 3:7

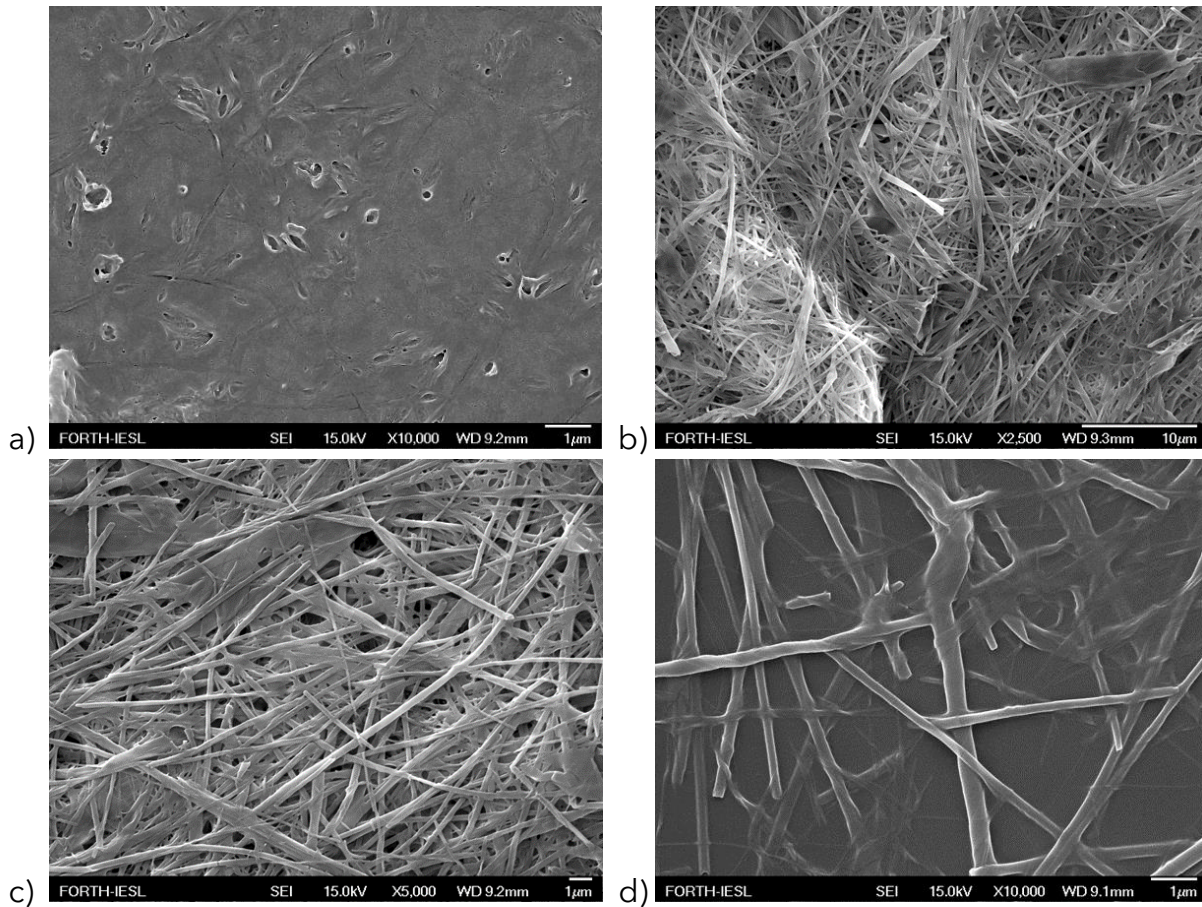
Ως πρώτο μας βήμα για την δημιουργία του συγκεκριμένου δείγματος είναι η προσθήκη 2mg από την πεπτιδική σκόνη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε 150ml MeOH και παρατηρήσαμε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν. Για αυτό το λόγο τοποθετούμε το γυάλινο φιαλίδο, στο οποίο έχουμε τοποθετήσει την πεπτιδική σκόνη και την μεθανόλη σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και εφαρμόζουμε υπερήχους για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτιδίο μας στην μεθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε στο γυάλινο φιαλίδο 350ml H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500ml. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε αύξηση του

ιξώδους του τελικού διαλύματος και σε χρόνο 10 λεπτών η δημιουργία μιας χαλαρής διαυγούς υδρογέλης. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και το επόμενο πρωί παρατηρήσαμε ότι το ιξώδες του διαλύματος μας είχε αυξηθεί και άλλο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας σταθερής υδρογέλης, γαλακτώδους όψης χρώματος η οποία εμπεριέχει και κάποια συσσωματώματα πεπτιδικής σκόνης.



Εικόνα 61: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=4\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O 3:7

Για το δείγμα μας ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία ξήρανσης την οποία ακολουθήσαμε και με τα προηγούμενα δείγματα η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15ημερών, όπως φαίνεται και στις ακόλουθες φωτογραφίες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.



Εικόνα 62: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=4\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O 3:7 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM διαπιστώνουμε ότι το συγκεκριμένο σε MeOH:H₂O 3:7 και σε συγκέντρωση $c=4\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε ένα πυκνό δίκτυο ινιδίων. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα μας δείγματα όμως αυτό το δίκτυο δεν μπορεί να παρατηρηθεί από την πρώτη μέρα παρά μόνο μετά από χρόνο επώασης 3 ημερών.

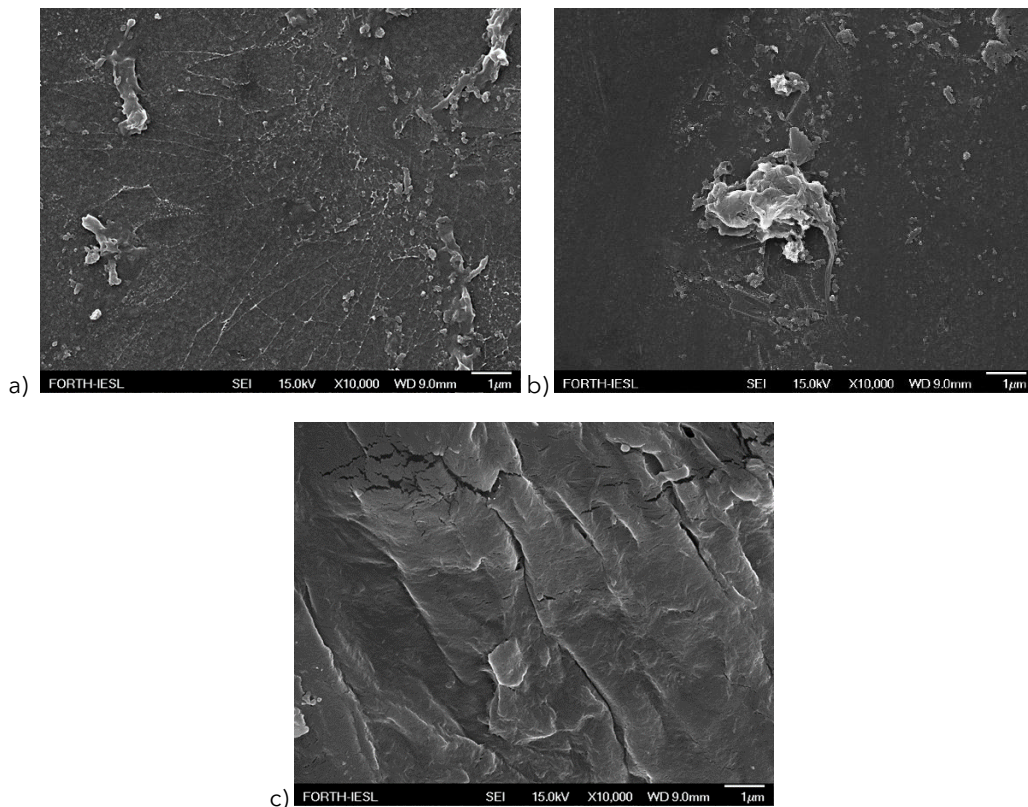
➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε Tetrahydrofuran (THF): H₂O αναλογίας 2:8

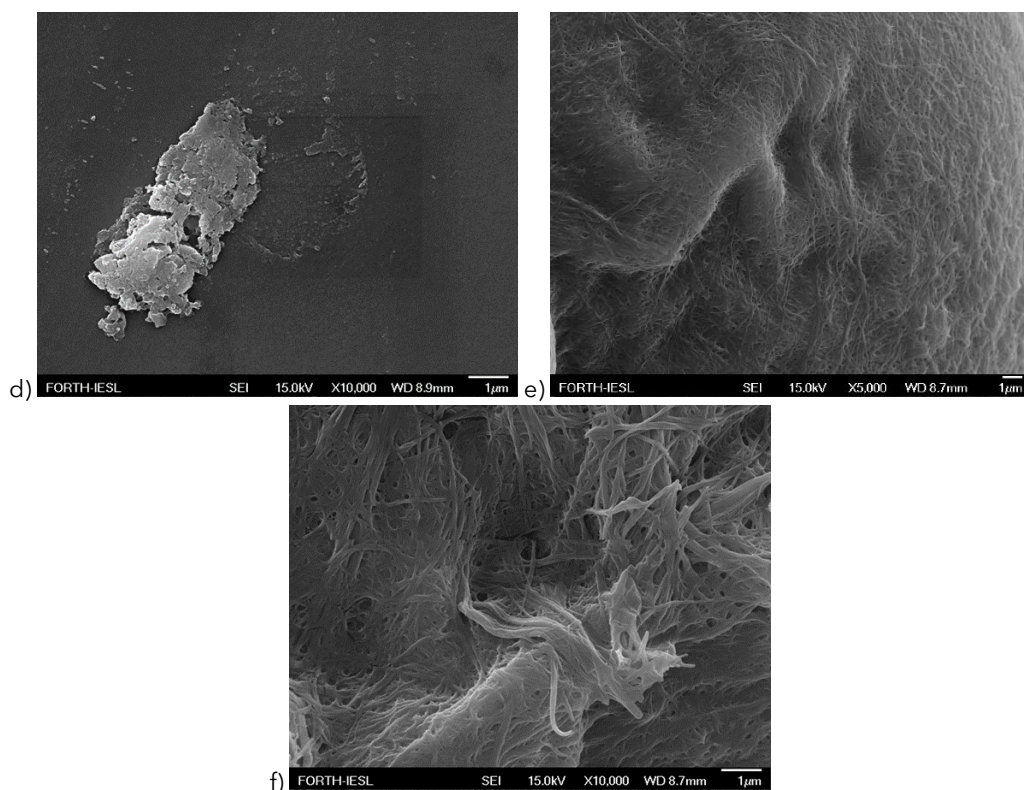
Αρχικά προσθέτουμε 1mg της πεπτιδικής μας σκόνη σε 100µl THF και παρατηρήσαμε ότι διαλύεται απευθείας. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε 400µl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500µl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε ότι το διάλυμα μας έγινε ένα γαλακτερό εναιώρημα ενώ με το πέρασ μιας ώρας διαπιστώθηκε η αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του με αποτέλεσμα την δημιουργία διαυγών υδρογελών τα οποία όμως εμπεριείχαν και μια μικρή ποσότητα υγρασίας πάνω από το σχηματισμένο gel.



Εικόνα 63: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε THF:H₂O 2:8

Για το δείγμα μας ακολουθήθηκε η γνωστή διαδικασία ξήρανσης η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών. Να σημειωθεί ότι για το συγκεκριμένο δείγμα λάβαμε υλικό και από την τζελώδη φάση του δείγματος αλλά και από την υγρή φάση.





Εικόνα 64: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε THF:H₂O 2:8 α) Δείγμα 1 ημέρας β) Δείγμα 3 ημερών γ) Δείγμα 7 ημερών από την υγρή φάση του δείγματος δ) Δείγμα 1 ημέρας ε) Δείγμα 3 ημερών φ) Δείγμα 7 ημερών από την τζελώδη φάση του δείγματος

Από τις εικόνες που πάρθηκαν με την βοήθεια της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM διαπιστώνουμε ότι το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε THF:H₂O 2:8 συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ στην υγρή φάση του δεν έχει δημιουργήσει κάποια μορφή αυτοοργάνωσης επειδή τα δείγματά μας είναι άμορφα. Στην τζελώδη του φάση πάλι παρατηρείται αυτοοργάνωση σε ινίδια από την 3 ημέρα επώασης του δείγματος. Τα ινίδια που δημιουργούνται είναι αρκετά μεγάλα σε μέγεθος και φτιάχνουν ένα αρκετά πυκνό δίκτυο.

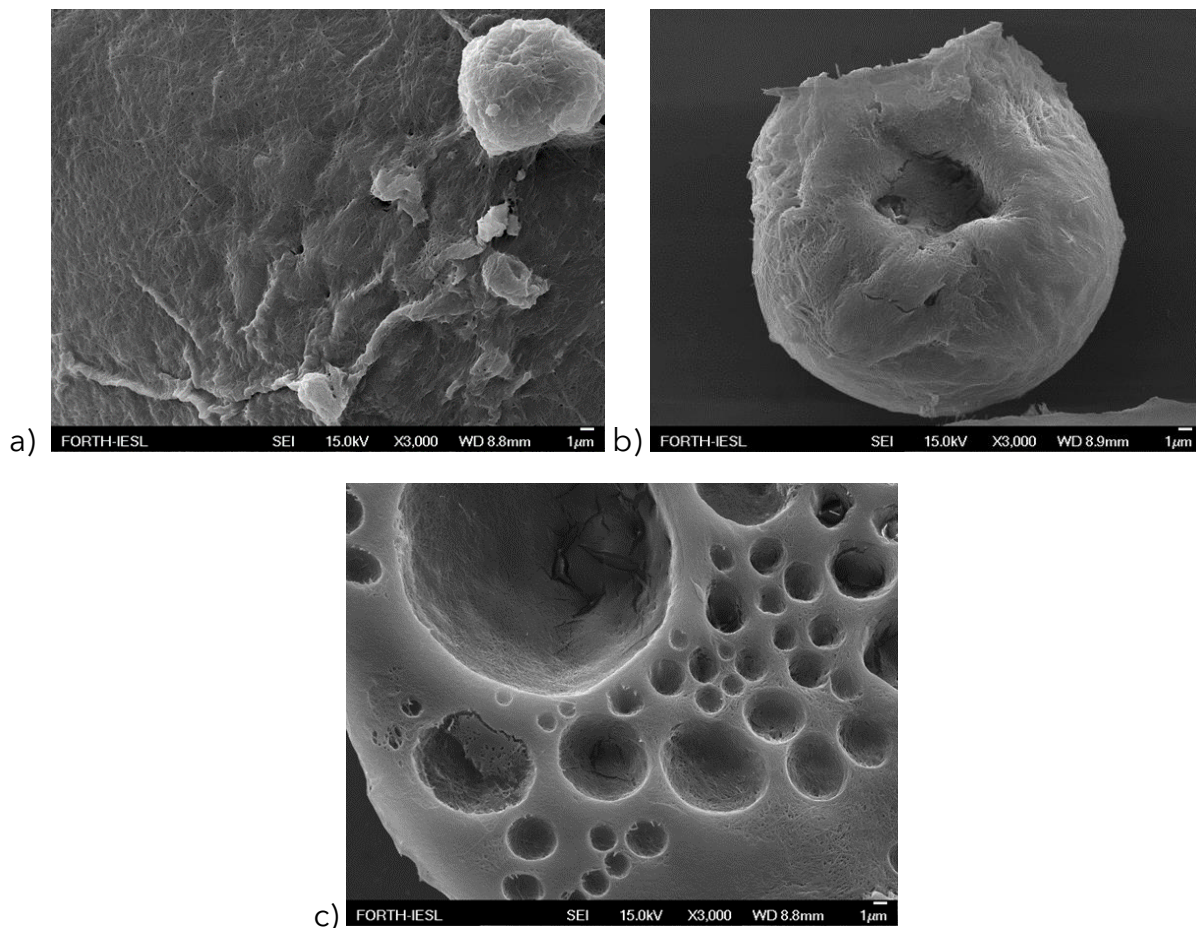
➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=5\text{mg/ml}$ σε Tetrahydrofuran (THF): H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά προσθέτουμε 2,5mg της πεπτιδικής μας σκόνη σε 100ml THF και παρατηρήσαμε ότι διαλύεται απευθείας. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε 400ml H₂O έτσι ώστε το διάλυμα μας να αποκτήσει τελικό όγκο 500ml. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε ότι το διάλυμα μας έγινε ένα γαλακτερό εναιώρημα ενώ με το πέρας μιας ώρας διαπιστώθηκε η αύξηση του ιξώδους του τελικού διαλύματος. Τέλος αφήσαμε το δείγμα μας overnight και παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του με αποτέλεσμα την δημιουργία διαυγών υδρογελών τα οποία όμως εμπεριείχαν και μια μικρή ποσότητα υγρασίας πάνω από το σχηματισμένο gel.



Εικόνα 65: Σταθερή υδρογέλη του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=5\text{mg/ml}$ σε THF:H₂O 2:8

Η διαδικασία ξήρανσης πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών. Να σημειωθεί ότι για το συγκεκριμένο δείγμα λάβαμε υλικό και από την τζελώδη φάση του δείγματος αλλά και από την υγρή φάση, αλλά καταφέραμε να λάβουμε εικόνες μέσω της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας μόνο για τα δείγματα της τζελώδους φάσης επειδή το υλικό μας στα δείγματα της υγρής φάσης καιγόταν από την δέσμη του Μικροσκοπίου.



Εικόνα 66: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=5\text{mg/ml}$ σε THF:H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών τα οποία έχουν ληφθεί από την τζελώδη φάση του δείγματος

Από τις παραπάνω εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM διαπιστώνουμε ότι το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε THF:H₂O 2:8 συγκέντρωσης c=5mg/ml στην τζελώδη του φάση αυτοοργανώνεται σε ινίδια τα οποία από την 3 ημέρα επώασης δημιουργούν σφαιρικές δομές οι οποίες αποτελούνται από τα ινίδια αυτά.

3. Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP

Το τρίτο πεπτίδιο που μελετήσαμε χαρακτηρίστηκε δομικά για πέντε συστήματα διαλυτών, όπως αναφέρθηκε σε παραπάνω κεφάλαιο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, τα οποία είναι τα CHCl₂: Methanol (CH₃OH), CHCl₂: Heptane (C₇H₁₆), Tetrahydrofuran (THF): Heptane (C₇H₁₆), Tetrahydrofuran (THF): Methanol (CH₃OH) και Tetrahydrofuran (THF):H₂O και η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιγράφηκε εκτενώς παραπάνω. Για το πρώτο σύστημα οι αναλογίες και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

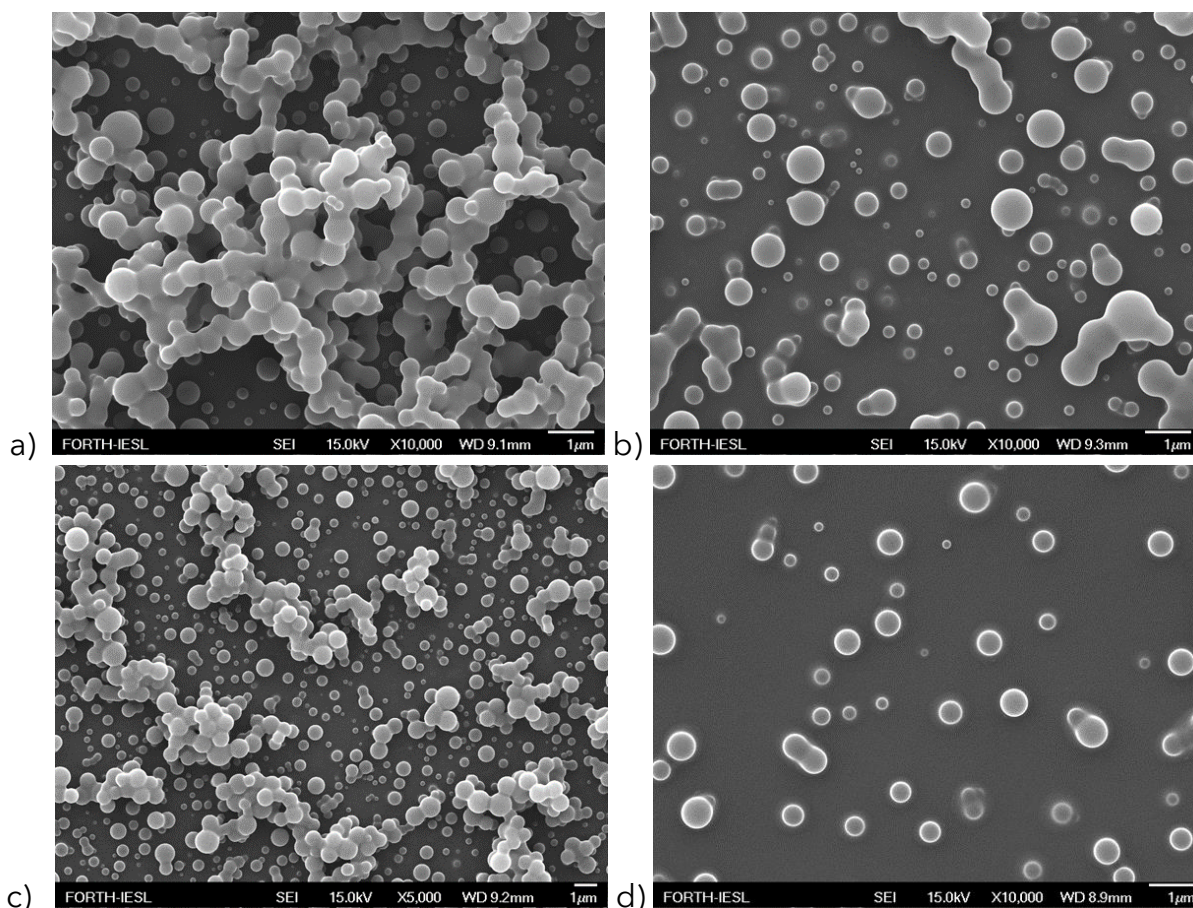
- Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP συγκέντρωσης c=2mg/ml σε CHCl₂:Methanol (CH₃OH) αναλογίας 2:8

Αρχικά ζυγίσαμε και διαλύσαμε 1mg Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP σε 100μl CHCl₂ και παρατηρήθηκε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν, επομένως το διάλυμα μας τοποθετείται σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και το δείγμα τίθεται σε θερμική επεξεργασία υπερήχων για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στο διχλωρομεθάνιο. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε στο vial 400μl μεθανόλης (MeOH) για να αποκτήσει το τελικό μας διάλυμα όγκο 500μl. Με την προσθήκη της MeOH παρατηρήθηκε θόλωμα του τελικού διαλύματος. Αφήσαμε το δείγμα μας overnight και την επόμενη ημέρα παρατηρήθηκε ότι με το πέρασμα των ωρών δημιουργήθηκαν μερικά ιζήματα στο κάτω μέρος του γύλινου ενώ το τελικό μας διάλυμα παρέμενε θολό και σε υγρή κατάσταση.



Εικόνα 67: Θολό σκούρο πορφυρό διάλυμα Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP c=2mg/ml σε CHCl₂:MeOH 2:8

Για το δείγμα μας ακολουθήθηκε η γνωστή διαδικασία ξήρανσης, η οποία ακολουθηθηκε για όλα τα δείγματα μας και η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 68: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε $\text{CHCl}_2:\text{MeOH}$ 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Με την βοήθεια της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM παρατηρούμε στα δείγματα μας τα οποία προέρχονται από το Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP σε $\text{CHCl}_2:\text{MeOH}$ 2:8 συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ ότι το υβριδικό μας πια πεπτίδιο, το οποίο μετά από χημική κατεργασία ενώθηκε με την πορφυρίνη TPP-NH₂, δεν αυτοοργανώνεται πια σε δίκτυο ινιδίων αλλά σε συστάδες σφαιρικών δομών διαμέτρου περίπου 1 μm η κάθε μια.

➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε $\text{CHCl}_2:\text{Heptane}$ (C_7H_{16}) αναλογίας 2:8

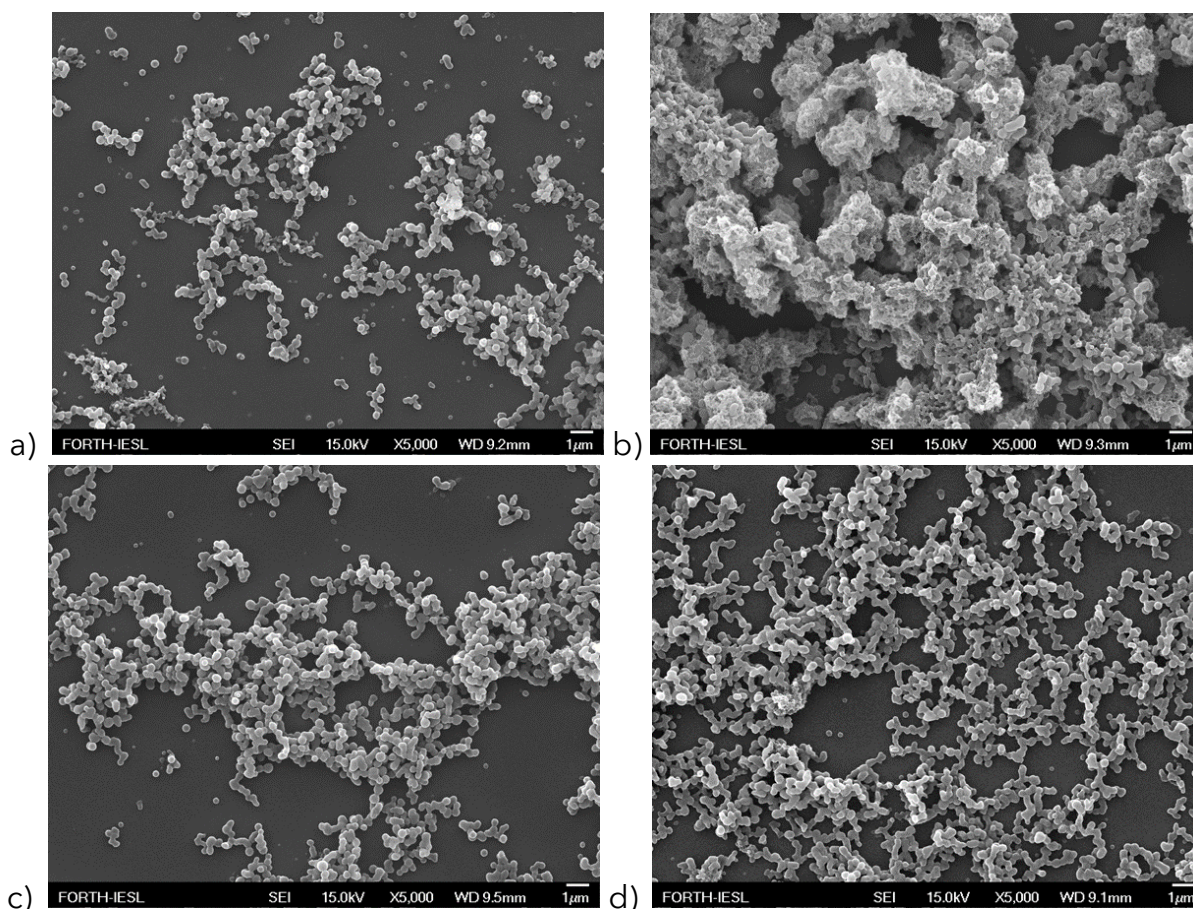
Αρχικά ζυγίσαμε και διαλύσαμε 1mg Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP σε 100 μl CHCl_2 και παρατηρήθηκε ότι απαιτείται θερμική επεξεργασία του δείγματος παρουσία υπερήχων για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στο διχλωρομεθάνιο. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε στο vial 400 μl επτανίου για να αποκτήσει το τελικό μας διάλυμα όγκο 500 μl . Με την προσθήκη του επτανίου παρατηρήθηκε θόλωμα του τελικού διαλύματος. Αφήνοντας το

δείγμα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρας των ωρών ο αριθμός των ιζημάτων της ένωσης είχε αυξηθεί, το διάλυμα μας παρέμενε σε υγρή κατάσταση και είχε ένα αρκετά διαυγές σκούρο ροζ χρώμα.



Εικόνα 69: Θολό σκούρο πορφυρό διάλυμα παρουσία ιζημάτων Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε $\text{CHCl}_2:\text{C}_7\text{H}_{16}$ 2:8

Για το δείγμα μας ακολουθήθηκε η γνωστή διαδικασία ξήρανσης, η οποία ακολουθηθηκε για όλα τα δείγματα μας και η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 70: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε $\text{CHCl}_2:\text{C}_7\text{H}_{16}$ 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις εικόνες της οπτικής παρατήρησης διαπιστώνουμε ότι και σε αυτά τα δείγματα μας τα οποία προέρχονται από το Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP σε σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_2:\text{C}_7\text{H}_{16}$ 2:8 συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ η διαμόρφωση που επικρατεί είναι οι σφαιρικές δομές ενωμένες μεταξύ τους. Επομένως η πορφυρίνη μόλις ενώθηκε με το αρχικό μας πεπτιδίω ως προς τον σχηματισμό του νέου υβριδικού μορίου, ώθησε στην αλλαγή της διαμόρφωσης του πεπτιδίου μας από ινίδια σε σφαιρικές δομές.

➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε Tetrahydrofuran (THF): Heptane (C_7H_{16}) αναλογίας 2:8

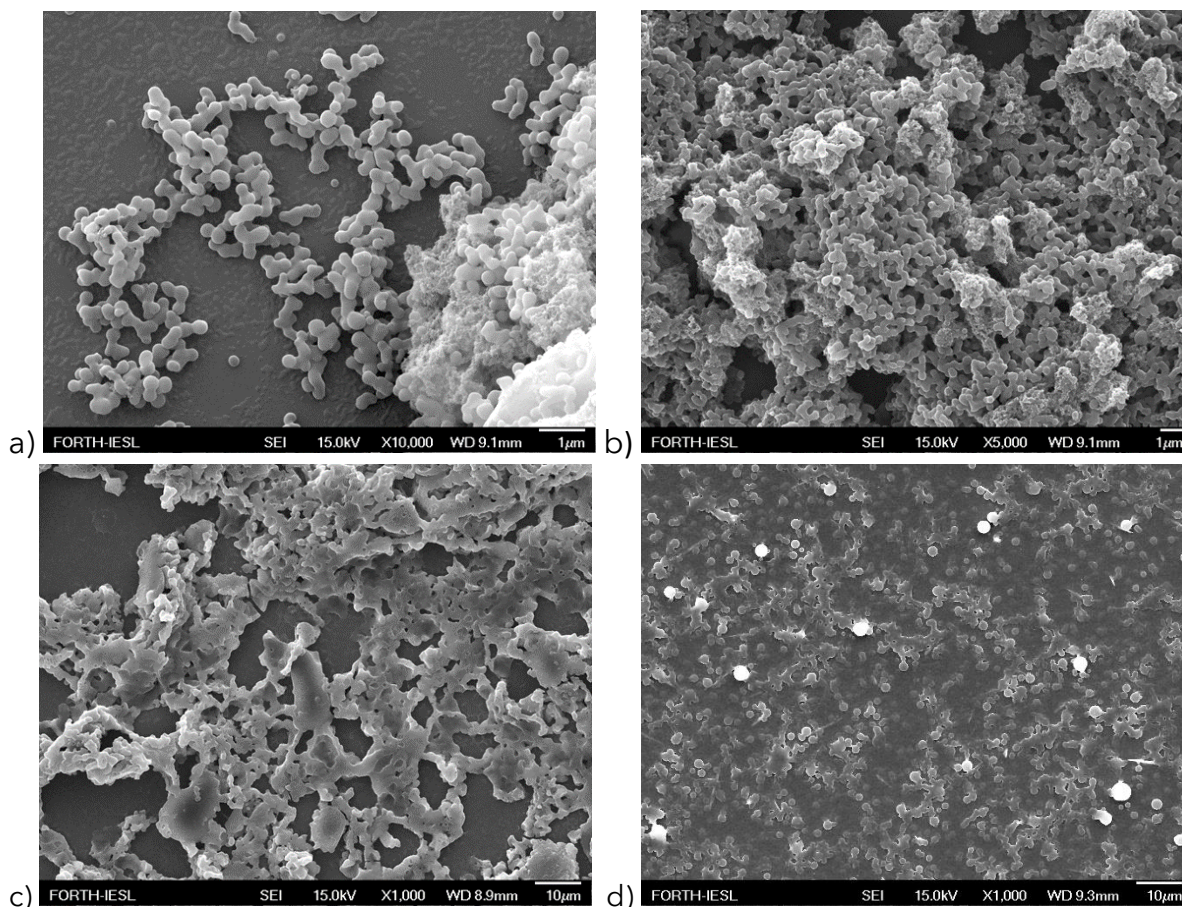
Για την δημιουργία του δείγματός μας απαιτούνταν μάζα 1mg από το πεπτιδίω Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP να διαλυθεί σε 100μl THF. Παρατηρήθηκε ότι πεπτιδίω μας δεν διαλύεται άρα απαιτείται θερμική επεξεργασία του δείγματος παρουσία υπερήχων για 2 λεπτά περίπου σε θερμό υδατόλουτρο (40°C) έως ότου να διαλυθεί το πεπτιδίω μας στο τετραϋδροφουράνιο. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε στο vial 400μl επτανίου για να αποκτήσει το τελικό μας διάλυμα όγκο 500μl. Αφήνοντας το δείγμα μας overnight παρατηρήθηκε ότι με το πέρασ των ωρών ο αριθμός των ιζημάτων της ένωσης είχε αυξηθεί

κατα πολύ, το διάλυμα μας παρέμενε διαυγές, και συγκεκριμένα το πιο διαυγές από όσα διαλύματα κάναμε για την ένωση Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP, σε υγρή κατάσταση και με έντονο σκούρο ροζ χρώμα.



Εικόνα 71: Διαυγές σκούρο πορφυρό διάλυμα παρουσία ιζημάτων Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε THF:C₇H₁₆ 2:8

Για το δείγμα μας ακολουθήθηκε η γνωστή διαδικασία ξήρανσης, η οποία ακολουθηθηκε για όλα τα δείγματα μας και η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 72: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε THF:C₇H₁₆ 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από τις παραπάνω εικόνες παρατηρούμε για ακόμη μια φορά για το συγκεκριμένο υβριδικό πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP παρουσία THF:C₇H₁₆ 2:8 συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ ότι αυτοοργανώνεται σε συσσωματώματα σφαιρικών δομών οι οποίες όπως παρατηρούμε με την πάροδο των ημερών συσσωματώνονται τόσο πολύ που τείνουν να μην είναι τόσο ευδιάκριτες.

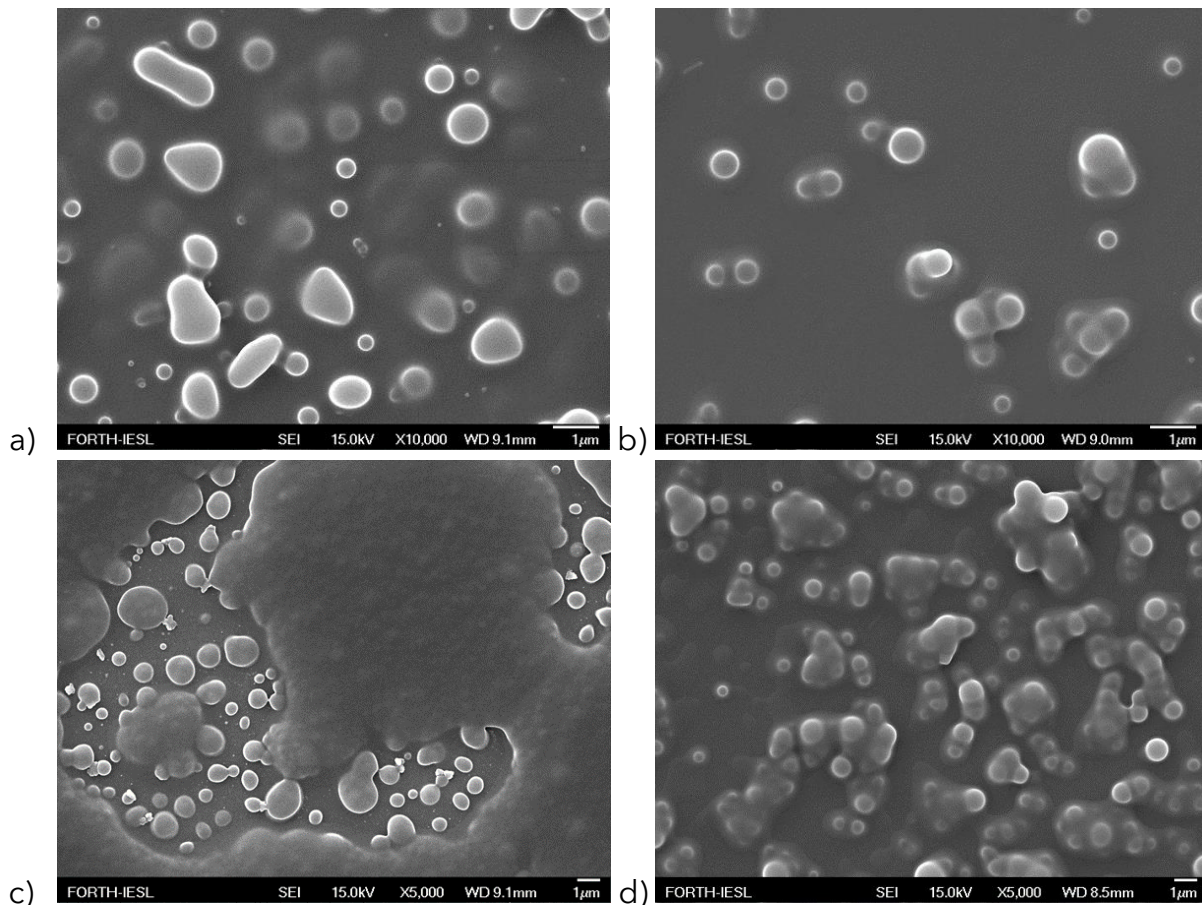
➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε Tetrahydrofuran (THF):Methanol (CH₃OH) αναλογίας 2:8

Αρχικά προσθέσαμε 1 mg Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP σε 100 μl THF και παρατηρήθηκε ότι δεν διαλύεται κατευθείαν, επομένως το διάλυμα μας τοποθετείται σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C και το δείγμα τίθεται σε θερμική επεξεργασία υπερήχων για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτιδίο μας στο THF. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε στο vial 400 μl μεθανόλης (MeOH) για να αποκτήσει το τελικό μας διάλυμα όγκο 500 μl. Με την προσθήκη της MeOH παρατηρήθηκε θόλωμα του τελικού διαλύματος. Το δείγμα μας το αφήσαμε να επωαστεί overnight και παρατηρήσαμε ότι με το πέρασμα των ωρών το τελικό μας διάλυμα παρέμενε θολό, σκούρο ροζ και σε υγρή κατάσταση.



Εικόνα 73: Θολό σκούρο πορφυρό διάλυμα παρουσία ιζημάτων Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε THF:MeOH 2:8

Για το δείγμα μας ακολουθήθηκε η γνωστή διαδικασία ξήρανσης, η οποία ακολουθηθηκε για όλα τα δείγματα μας και η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 74: Φωτογραφίες ΗΛ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε THF:MeOH 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Στις εικόνες της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας FE-SEM για τα δείγματα από το υβριδικό μας πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP παρουσία THF:MeOH 2:8 συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ είναι ευδιάκριτη η αυτοοργάνωση του πεπτιδίου σε σφαιρικές δομές αλλά και σε συσσωματώματα αυτών των δομών. Στα δείγματα όμως για την 7^η και 15^η μέρα παρατηρούμε ότι τα δείγματα στο μεγαλύτερο μέρος του γυάλινου πλακιδίου αποτελούνται από τα συσσωματώματα των σφαιρικών δομών.

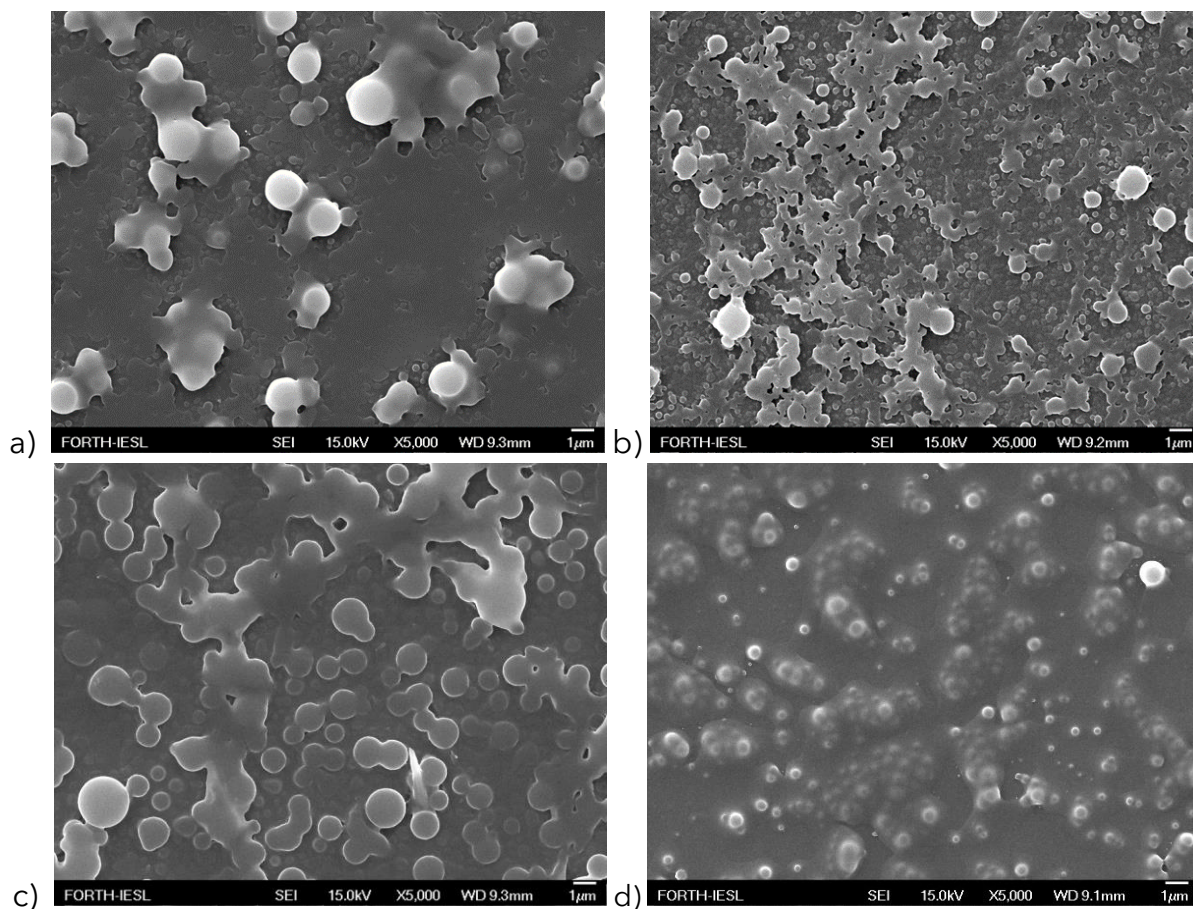
➤ Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε Tetrahydrofuran (THF):H₂O αναλογίας 2:8

Αρχικά τοποθετούμε 1mg Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP μαζί με 100μl THF σε γυάλινο φυαλίδιο ως προς διάλυση, γεγονός που δεν παρατηρείται απευθείας και για αυτό τοποθετούμε το γυάλινο φυαλίδιο σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C παρουσία υπερήχων για 2 λεπτά περίπου έως ότου να διαλυθεί το πεπτίδιο μας στο THF. Αφού διαλυθεί προσθέτουμε στο vial 400μl νερό (H₂O) για να αποκτήσει το τελικό μας διάλυμα όγκο 500μl. Με την προσθήκη του νερού παρατηρήθηκε άμεση κατακρήμνιση της πεπτιδικής σκόνης και δημιουργία ενός ανομοιογενούς μίγματος. Αφήνοντας το δείγμα μας overnight δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στην σύσταση του δείγματος μας αφού παρέμενε ανομοιογενές, ο αριθμός των ιζημάτων της ένωσης ήταν αυξημένος, το διάλυμα μας είχε θολώσει και είχε ένα αχνό ροζ χρώμα ενώ βρισκόταν ακόμη σε υγρή φάση.



Εικόνα 75: Θολό ανοιχτό πορφυρό διάλυμα παρουσία ιζημάτων Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε THF:H₂O 2:8

Και για αυτό το δείγμα μας ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ξήρανσης, η οποία ακολουθηθηκε για όλα τα δείγματα μας και η οποία πραγματοποιήθηκε για time course δείγματα, δηλαδή λαμβάναμε δείγμα για χρόνο 1 μέρας, 3 ημερών, 7 ημερών και 15 ημερών.



Εικόνα 76: Φωτογραφίες Ηλ.Μικροσκοπίου FE-SEM Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP $c=2\text{mg/ml}$ σε THF:H₂O 2:8 a) Δείγμα 1 ημέρας b) Δείγμα 3 ημερών c) Δείγμα 7 ημερών d) Δείγμα 15 ημερών

Από την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία FE-SEM παρατηρούμε ότι το υβριδικό πεπτιδίο που συντέθηκε Fmoc-Lys(palmitoyl)-NH-TPP παρουσία THF:H₂O 2:8 συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ αυτοοργανώνεται σε σφαιρικές δομές που ενώνονται μεταξύ τους και ήδη από τις πρώτες 24 ώρες έχουν αυξημένο αριθμό με αποτέλεσμα να δημιουργούν ένα «χαλί» από το οποίο να είναι ευδιάκριτες όσες καταφέρνουν να «ξεπροβάλλουν». Το φαινόμενο αυτό συνεχίζεται με την πάροδο των ημερών επομένως είναι όλο και πιο δύσκολο να διακρίνουμε με ευκρίνεια τα συσσωματώματα των σφαιρικών δομών.

Προετοιμασία Δειγμάτων και Αποτελέσματα Απελευθέρωσης Φαρμάκων (Drug Release):

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι ιδανικό σύστημα για να ελέγξουμε την εγκαψυλίωση καθώς και την απελευθέρωση φαρμάκων αποτελεί το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH, επειδή σε όλα τα συστήματα διαλυτών που το υποβάλαμε είχαμε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία υδρογελών. Συγκρίνοντας όλες τις υδρογέλες, στις οποίες καταλήξαμε, αρχικά ως προς την σταθερότητα των gel και έπειτα με βάση τα συστατικά τους (ποιούς διαλύτες χρησιμοποιήσαμε σε κάθε σύστημα, πόσο βιοσυμβατοί είναι), τις συγκεντρώσεις του πεπτιδίου Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH που χρησιμοποιήσαμε κάθε φορά και την αναλογία των διαλυτών καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το καταλληλότερο δείγμα για τον έλεγχο της εγκαψυλίωσης αποτελεί το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ το οποίο διαλύθηκε σε Ethanol:H₂O σε αναλογία διαλυτών 1:9. Το gel αυτό κρίθηκε κατάλληλο γιατί σχημάτιζε το πιο σταθερό gel σε φύση και αναλογία διαλυτών που είναι ευνοϊκοί καθώς και η αιθανόλη και το νερό βρίσκονται σε αφθονία σε κάθε βιολογικό περιβάλλον.

Αρχικά υπολογίστηκε η συγκέντρωση του πεπτιδίου για το δείγμα Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH παρουσία Ethanol:H₂O 1:9 και βρήκαμε ότι ήταν:

$$m = C * Mr_{peptide} * V \leftrightarrow C = \frac{m}{Mr_{peptide} * V} \leftrightarrow C = \frac{1\text{mg}}{606.85 * 1000\mu\text{l}} \leftrightarrow C = 1.6\text{mM}$$

Έπειτα αποφασίσαμε να εγκαψυλώσουμε στο gel μας ως πρώτη ένωση την φλουορεσίνη (Fluorescein). Η φλουορεσίνη είναι μια οργανική ένωση και βαφή. Διατίθεται ως σκούρα πορτοκαλί /κόκκινη σκόνη ελαφρώς διαλυτή στο νερό και το αλκοόλ. Χρησιμοποιείται ευρέως ως ιχνηθέτης φθορισμού για πολλές εφαρμογές. Έχει μέγιστη απορρόφηση στα 494 nm και μέγιστη εκπομπή 512 nm (σε νερό). Το χρώμα του υδατικού διαλύματος ποικίλλει από πράσινο σε πορτοκαλί. Πιο συμπυκνωμένα διαλύματα φλουορεσίνης μπορεί ακόμη και να φαίνονται κόκκινα. Βρίσκει εφαρμογές στην κυτταρική βιολογία καθώς χρησιμοποιείται συχνά για την επισήμανση και την παρακολούθηση των κυττάρων με την βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού. Επιπρόσθετα βιολογικά ενεργά μόρια, όπως για παράδειγμα αντισώματα μπορούν επίσης να προσκολληθούν στη φλουορεσίνη, επιτρέποντας στους ερευνητές να στοχεύουν το φθοροφόρο σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή δομές εντός των κυττάρων.

Πραγματοποιήσαμε δύο πειράματα. Στο πρώτο ελέγξαμε την δημιουργία gel, την εγκαψυλίωση αλλά και την απελευθέρωση της φλουορεσίνης σε αναλογία 1:50 με το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH ενώ στο δεύτερο ελέγξαμε την αναλογία 1:100.

Πρώτο μας βήμα ήταν να φτιάξουμε διάλυμα stock της Fluorescein συγκέντρωσης 1mM. Ζυγίσαμε 0.33mg Fluorescein, τα οποία διαλύθηκαν σε 1000μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα stock μας να έχει τελικό όγκο $V=1000\mu\text{l}$. Γνωρίζοντας από τα παραπάνω βήματα ότι η τελική συγκέντρωση του πεπτιδίου είναι 1.6mM, η συγκέντρωση του πεπτιδίου για την αναλογία 1:50 είναι $c=0.032\text{mM}$ ενώ για την αναλογία 1:100 η συγκέντρωση είναι τελικά $c=0.016\text{mM}$. Άρα

γνωρίζοντας αυτές τις συγκεντρώσεις μπορούμε να υπολογίσουμε την ποσότητα της Fluorescein που θα τοποθετήσουμε στο δείγμα κάθε αναλογίας.

Για την αναλογία 1:50 ισχύει:

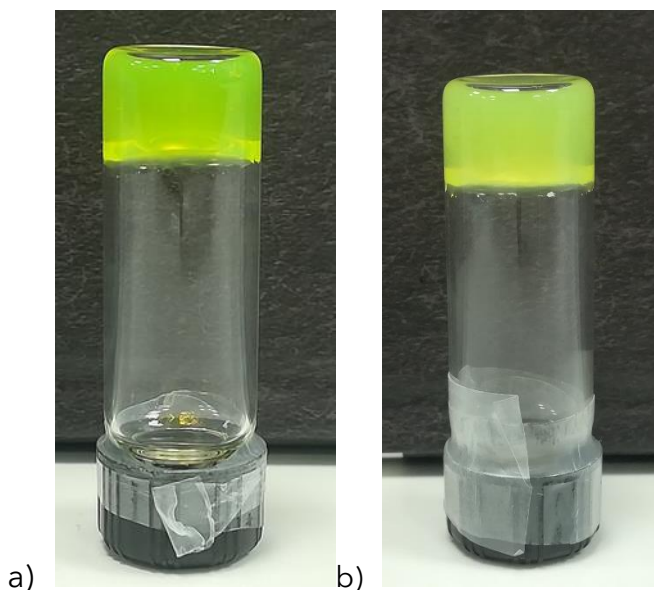
$$c_1V_1 = c_2V_2 \leftrightarrow 1mM * x = 0.032mM * 1000\mu l \leftrightarrow x = 32\mu l \text{ Fluorescein}$$

Στα 32μl αυτά θα προσθέσουμε 868μl H₂O και αυτό το διάλυμα με τελικό όγκο 900μl θα αποτελεί ο «κακός» διαλύτης για το πεπίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH το οποίο αρχικά θα έχουμε διαλύσει σε 100μl EtOH σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C παρουσία υπερήχων για 2 λεπτά. Την επόμενη μέρα παρατηρούμε την δημιουργία ενός έντονου πράσινου ισχυρού gel. Το gel αυτό το αφήνουμε να επωαστεί για χρονικό διάστημα 3 ημερών πριν πραγματοποιήσουμε τα πειράματα απελευθέρωσης φαρμάκου.

Για την αναλογία 1:100 ισχύει:

$$c_1V_1 = c_2V_2 \leftrightarrow 1mM * x = 0.016mM * 1000\mu l \leftrightarrow x = 16\mu l \text{ Fluorescein}$$

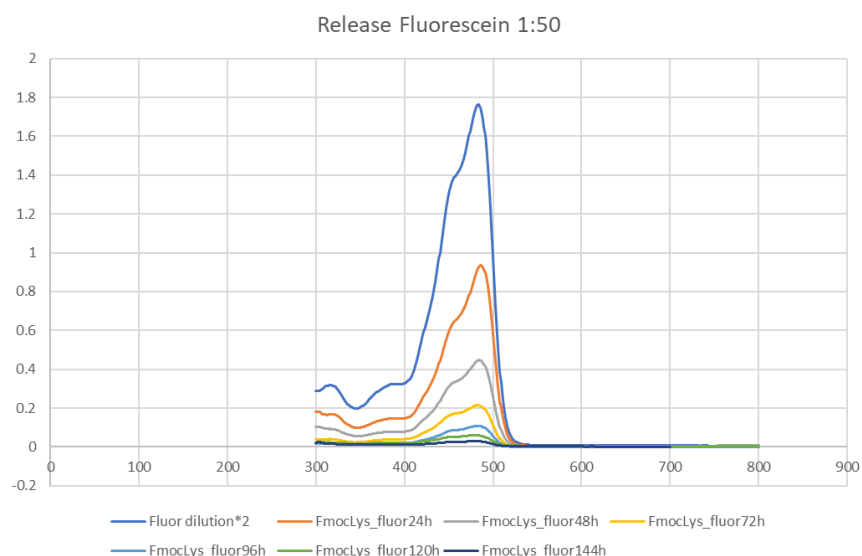
Στα 16μl αυτά θα προσθέσουμε 884μl H₂O και αυτό το διάλυμα με τελικό όγκο 900μl θα αποτελεί ο «κακός» διαλύτης για το πεπίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH το οποίο αρχικά θα έχουμε διαλύσει σε 100μl EtOH σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C παρουσία υπερήχων για 2 λεπτά. Την επόμενη μέρα παρατηρούμε την δημιουργία ενός έντονου πράσινου ισχυρού gel. Το gel αυτό το αφήνουμε να επωαστεί για χρονικό διάστημα 3 ημερών πριν πραγματοποιήσουμε τα πειράματα απελευθέρωσης φαρμάκου.



Εικόνα 77: a) Gel Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH με φλουρεσείνη σε αναλογία 1:50 b) Gel Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH με φλουρεσείνη σε αναλογία 1:100

Για να ελέγξουμε την απελευθέρωση-release της Fluorescein από το gel στο οποίο την εγκαψυλώσαμε προσθέσαμε στο γυάλινο φυαλίδιο της κάθε αναλογίας από 1ml H₂O για 6 ημέρες, δηλαδή για 144 ώρες. Μόλις πέρασαν οι πρώτες 24 ώρες συλλέξαμε το νερό, το οποίο υπήρχε πάνω από το gel μας, και τοποθετούσαμε εκ νέου 1ml H₂O. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 6 φορές. Το νερό που συλλέγαμε κάθε φορά τοποθετούνταν σε κυψελίδα την οποία τοποθετούσαμε σε φασματοφωτόμετρο ορατού φάσματος έτσι ώστε να μπορέσουμε να μετρήσουμε την απορρόφηση του δειγματός μας. Να σημειωθεί ότι πριν μετρήσουμε την απορρόφηση για τις πρώτες 24 ώρες είχαμε δημιουργήσει διάλυμα stock της Fluorescein και είχαμε λάβει το φάσμα απορρόφησης αυτού του διαλύματος το οποίο θα μας χρησίμευε ως διάλυμα control για τις απορροφήσεις που θα συλλέγαμε. Το συγκεκριμένο πείραμα για κάθε αναλογία το επαναλάβαμε 3 φορές έτσι ώστε να ελέγξουμε την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μας.

Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων για την αναλογία 1:50 μπορούμε να τα δούμε αναλυτικά στο ακόλουθο διάγραμμα:

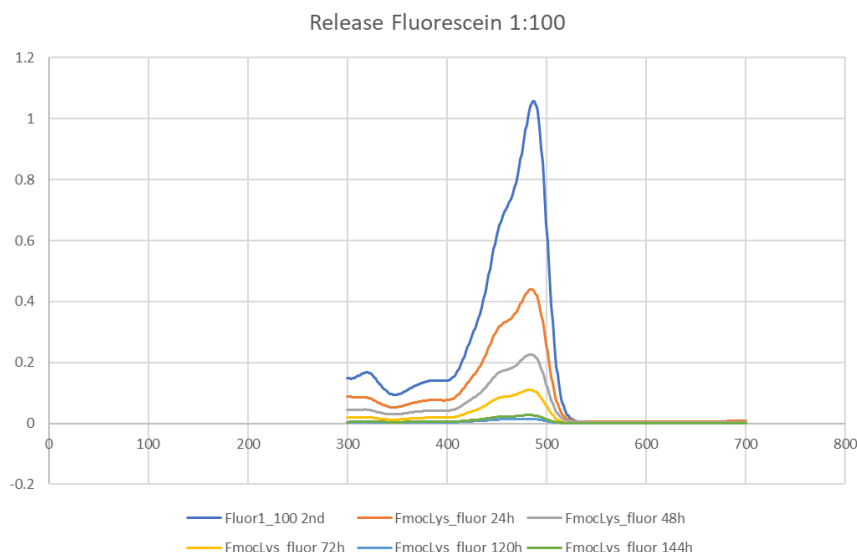


Εικόνα 78: Διάγραμμα απελευρώσεως (release) Fluorescein από το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε αναλογία 1:50 στο οποίο παρουσιάζεται η απορρόφηση του διαλύματος stock αραιωμένου κατά 2 φορές και οι απορροφήσεις που πάρθηκαν για τις μέρες 1^η-6^η.

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι ήδη από τις πρώτες 24 ώρες το gel στο οποίο είχαμε εγκαψυλώσει την Fluorescein, απελευθερώνει μεγάλη ποσότητα της εγκαψυλιωμένης ένωσης, λόγω της μεγάλης τιμής της απορρόφησης που παρατηρούμε. Ακόμη και μέχρι τις 3 πρώτες ημέρες του πειράματος το σύστημα εγκαψυλίωσης δίνει υψηλά ποσοστά απορροφήσεων άρα απελευθερώνει μεγάλη ποσότητα φλουορεσίνης. Αυτό είχε διαπιστωθεί και με γυμνό μάτι αφού το νερό που συλλέγαμε κάθε μέρα μετά από 24 ώρες επώασης είχε ένα ελαφρύ πράσινο χρώμα. Με το πέρασ των ημερών ακόμη παρατηρούσαμε ότι το gel μας αποχρωματιζόταν σιγά σιγά, οπότε και καταλήγαμε όσο φορές και αν επαναλάβαμε το πείραμα

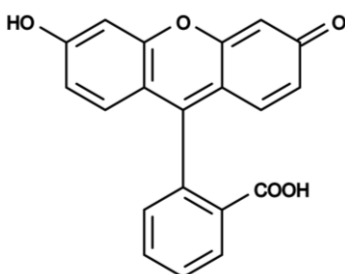
με ένα gel γαλακτώδους όψεως, όπως αυτά που δημιουργούσε το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O

Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων για την αναλογία 1:100 μπορούμε να τα δούμε αναλυτικά στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 79: Διάγραμμα απελευρώσεως (release) Fluorescein από το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε αναλογία 1:100 στο οποίο παρουσιάζεται η απορρόφηση του διαλύματος stock αραιωμένου κατά 2 φορές και οι απορροφήσεις που πάρθηκαν για τις μέρες 1^η-6^η.

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι και σε αυτή την αναλογία πεπτιδίου-Fluorescein ήδη από τις πρώτες 24 ώρες το gel στο οποίο είχαμε εγκαψυλιώσει την Fluorescein, απελευθέρωνει σε αρκετά μεγάλο ποσοστό την ένωση που έχουμε εγκαψυλιώσει, λόγω της μεγάλης τιμής της απορρόφησης που παρατηρούμε. Επίσης και εδώ οι τιμές απορρόφησης για τις 3 πρώτες ημέρες του πειράματος είναι υψηλές άρα το σύστημα απελευθερώνει μεγάλη ποσότητα φλουορεσίνης. Όσο αφορά την οπτική παρατήρηση και σε αυτή την αναλογία το νερό μας είχε αποκτήσει ελαφρύ πράσινο χρώμα αλλά και με την πάροδο του χρόνου καταλήγαμε με ένα αποχρωματισμένο γαλακτώδες gel, το οποίο όμως είχε μερικώς αποσυντεθεί, επομένως είχε χάσει μεγάλο ποσοστό από τον όγκο του.



Εικόνα 80: Χημικός τύπος φλουορεσίνης (Fluorescein)

Στην συνέχεια θέλαμε να εγκαψυλώσουμε την πορφυρίνη TPP. Η τετραφαιτυλοπορφυρίνη, ή αλλιώς TPP, είναι μια συνθετική ετεροκυκλική ένωση που μοιάζει με τις πορφυρίνες που συναντάμε στην φύση. Οι πορφυρίνες είναι βαφές και συμπράγοντες ενζύμων που βρίσκονται στην αιμοσφαιρίνη και τα κυτοχρώματα και τις συναντάμε κυρίως στη χλωροφύλλη και στη βιταμίνη B12. Η μελέτη των φυσικών πορφυρινών περιπλέκεται από τη χαμηλή συμμετρία τους και την παρουσία πολικών υποκαταστατών. Η τετραφαιτυλοπορφυρίνη είναι υδρόφοβη, συμμετρικά υποκατεστημένη και συντίθεται εύκολα. Η ένωση είναι ένα σκούρο μοβ στερεό που διαλύεται σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο και το βενζόλιο.

Ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία που ακολουθήσαμε και με την Fluorescein. Πραγματοποιήσαμε και αυτή την φορά δύο πειράματα για να ελεγχουμε την δημιουργία gel, την εγκαψυλίωση αλλά και την απελευθέρωση της πορφυρίνης TPP σε αναλογία 1:50 με το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH ενώ στο δεύτερο ελέγξαμε την αναλογία 1:100.

Αρχικά φτιάξαμε διάλυμα stock της TPP συγκέντρωσης 1mM, ζυγίζοντας 1,18 mg TPP, τα οποία διαλύθηκαν σε 1000μl H₂O έτσι ώστε το διάλυμα stock μας να έχει τελικό όγκο V=1000μl. Γνωρίζοντας από τα παραπάνω βήματα ότι η τελική συγκέντρωση του πεπτιδίου είναι 1.6mM, η συγκέντρωση του πεπτιδίου για την αναλογία 1:50 είναι c=0.032mM ενώ για την αναλογία 1:100 η συγκέντρωση είναι τελικά c=0.016mM. Άρα γνωρίζοντας αυτές τις συγκεντρώσεις μπορούμε να υπολογίσουμε την ποσότητα της TPP που θα τοποθετήσουμε στο δείγμα κάθε αναλογίας.

Για την αναλογία 1:50 οι υπολογισμοί μας διαμορφώνονται ως εξής:

$$c_1V_1 = c_2V_2 \leftrightarrow 1mM * x = 0.032mM * 1000\mu l \leftrightarrow x = 32\mu l TPP$$

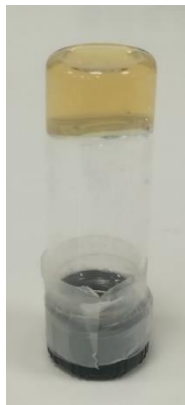
Στα 32μl αυτά θα προσθέσουμε 868μl H₂O και αυτό το διάλυμα με τελικό όγκο 900μl θα αποτελεί ο «κακός» διαλύτης για το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH το οποίο αρχικά θα έχουμε διαλύσει σε 100μl EtOH σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C παρουσία υπερήχων για 2 λεπτά. Την επόμενη μέρα παρατηρούμε την δημιουργία ενός πορτοκαλί διαλύματος το οποίο περιέχει συσσωματώματα, γεγονός που μας υποδεικνύει ότι η συγκέντρωση της πορφυρίνης είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που μπορεί να εγκαψυλώσει το πεπτιδίο μας. Επομένως αυτή η αναλογία πορφυρίνης-πεπτιδίου απορρίφθηκε για τον έλεγχο της εγκαψυλίωσης.

Για την αναλογία 1:100 ισχύει:

$$c_1V_1 = c_2V_2 \leftrightarrow 1mM * x = 0.016mM * 1000\mu l \leftrightarrow x = 16\mu l TPP$$

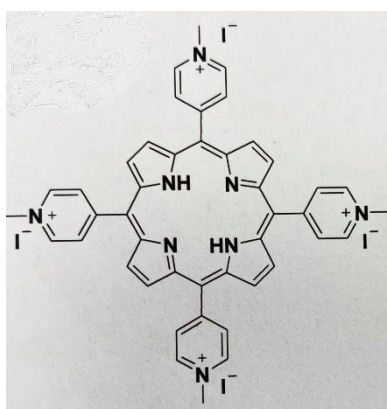
Στα 16μl αυτά θα προσθέσουμε 884μl H₂O και αυτό το διάλυμα με τελικό όγκο 900μl θα αποτελεί ο «κακός» διαλύτης για το πεπτιδίο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH το οποίο αρχικά θα έχουμε διαλύσει σε 100μl EtOH σε θερμό υδατόλουτρο στους 40° C παρουσία υπερήχων για 2 λεπτά. Την επόμενη μέρα παρατηρούμε την δημιουργία ενός πορτοκαλί-καφέ ισχυρού gel. Το gel αυτό το αφήνουμε να επωαστεί για χρονικό διάστημα 3 ημερών πριν πραγματοποιήσουμε

τα πειράματα απελευθέρωσης φαρμάκου. Επομένως η συγκεκριμένη αναλογία κρίθηκε η καταλληλότερη για τον έλεγχο εγκαψυλίωσης της πορφυρίνης TPP αφού στην αναλογία 1:100 έχουμε την δημιουργία ισχυρού gel στο οποίο παρατηρήθηκε και αλλαγή χρώματος, γεγονός που μας υποδικνύει ότι η εγκαψυλίωση πραγματοποιήθηκε επιτυχώς.



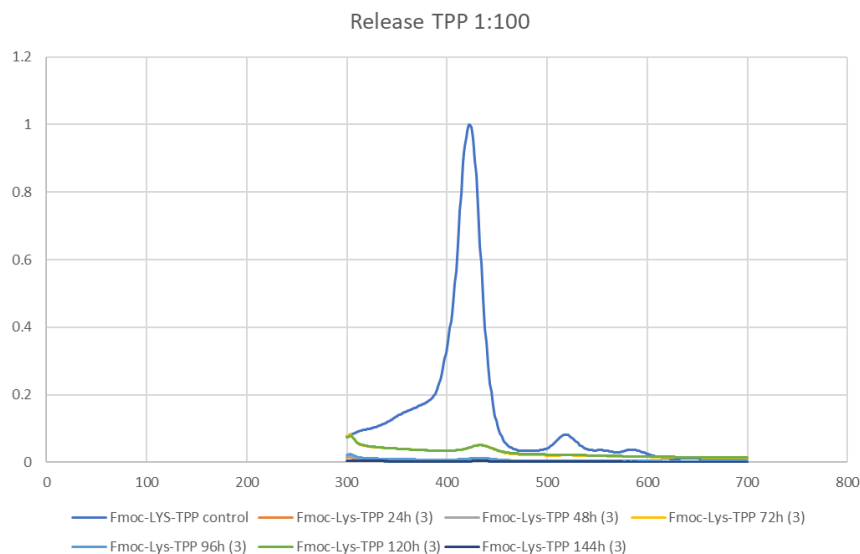
Εικόνα 81: Gel Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH με TPP σε αναλογία 1:100

Για να ελέγξουμε την απελευθέρωση-release της πορφυρίνης TPP από το gel στο οποίο την εγκαψυλίωσαμε προσθέσαμε στο γυάλινο φυαλίδιο του gel από 1ml H₂O για 6 ημέρες, δηλαδή για 144 ώρες και ακολουθήσαμε ακριβώς την ίδια διαδικασία η οποία περιγράφηκε για την εγκαψυλίωση της φλουορεσίνης. Όπως και προηγουμένως δημιουργήσαμε διάλυμα stock της TPP και χρησιμοποιήσαμε το φάσμα απορρόφησης της ως διάλυμα control για τις απορροφήσεις που συλλέξαμε. Τέλος και αυτό το πείραμα διεξήχθη 3 φορές έτσι ώστε να ελέγξουμε την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μας.



Εικόνα 82: Χημικός Τύπος υδατοδιαλυτής πορφυρίνης TPP C₄₄H₃₈I₄N₈ με Mr=1185,9398

Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων για την αναλογία 1:100 μπορούμε να τα δούμε αναλυτικά στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 83: Διάγραμμα απελευρώσεως (release) της υδατοδιαλυτής πορφυρίνης TPP από το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε αναλογία 1:100 στο οποίο παρουσιάζεται η απορρόφηση του διαλύματος stock αραιωμένου κατά 2 φορές και οι απορροφήσεις που πάρθηκαν για τις μέρες 1^η-6^η.

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι το gel στο οποίο είχαμε εγκαψυλιώσει την πορφυρίνη TPP, απελευθέρωνει ποσότητα πορφυρίνης με χαμηλό ρυθμό τις πρώτες ημέρες ελέγχου σε σχέση με την μέγιστη απορρόφηση του διαλύματος control της TPP. Η μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης, που λαμβάνουμε από την εγκαψυλιωμένη TPP στο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH εντοπίζεται μετά από 4 ημέρες ελέγχου. Παρόλ' αυτά με γυμνό μάτι εντοπίστηκε το νερό που συλλέγαμε κάθε μέρα μετά από 24 ώρες επώασης είχε αποκτήσει ένα ελαφρύ πορτοκαλί χρώμα. Σε αντίθεση με το προηγούμενο σύστημα εγκαψυλίωσης, εδώ δεν παρατηρήθηκε κανένας αποχρωματισμός της υδρογέλης και επίσης η υδρογέλη μας παρέμενε ισχυρή μετά την διεξαγωγή κάθε πειράματος.

Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH αποτελεί ένα αρκετά καλό σύστημα εγκαψυλίωσης και απελευθέρωσης φαρμάκων (drug release) καθώς είδαμε ότι εγκαψυλιώνει με επιτυχία τις 2 ενώσεις, τις οποίες εξετάσαμε και την Fluorescein καθώς και την TPP πορφυρίνη. Στην πρώτη ένωση παρατηρήθηκε εύκολη απελευθέρωση της φλουορεσίνης ήδη από τις πρώτες 24 ώρες ενώ η TPP απελευθερώνεται με μεγαλύτερη δυσκολία, γεγονός που δεν αποτελεί όμως μειονέκτημα καθώς σε πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών το ζητούμενο είναι η ελεγχόμενος ρυθμός και ποσότητα διάχυσης του φαρμάκου.

Αποτελέσματα Χρώσης Congo Red:

Η διαδικασία προετοιμασία της χρώσης Congo Red έχει περιγραφεί στις Τεχνικές Χαρακτηρισμού (σελ.29). Πριν από τη διαδικασία της χρώσης με το Congo Red, τα δείγματα μας ξηράθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες διαμέτρου 12-13 mm, σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα και θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ξήρανση τους, στα δείγματα προς παρατήρηση, εναποτέθηκε μία σταγόνα 8-10 μL του διαλύματος Congo Red και αμέσως έγινε η παρατήρησή τους σε στερεοσκοπικό μικροσκόπιο, με τη χρήση διασταυρωμένου πολωτή.

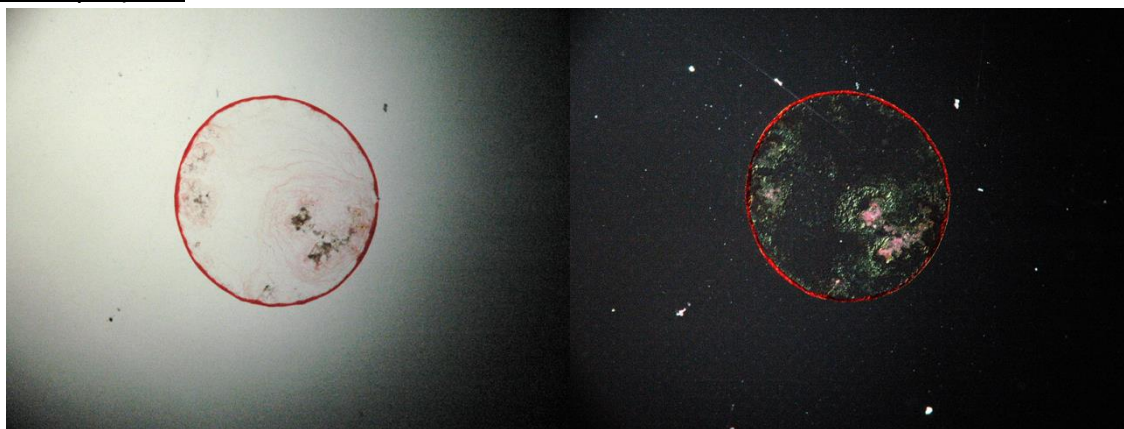
Οι εικόνες που συλλέξαμε με την βοήθεια του στερεοσκοπίου και του διασταυρωμένου πολωτή παρατίθενται παρακάτω:

- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ σε Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): H_2O αναλογίας 1:9



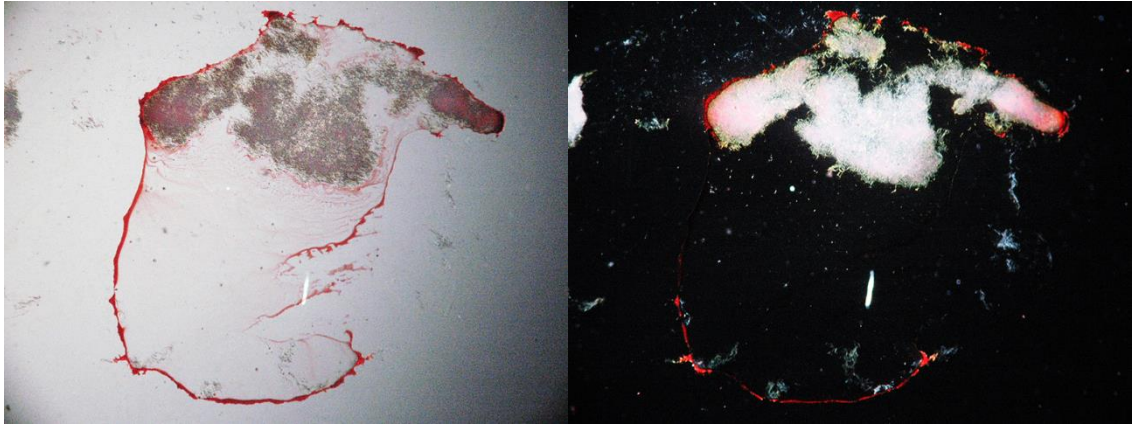
Εικόνα 84: Εικόνες του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O σε οπτικό μικροσκόπιο και κάτω από διασταυρωμένο πολωτή

- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=0.5\text{mg/ml}$ σε Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): H_2O αναλογίας 2:8



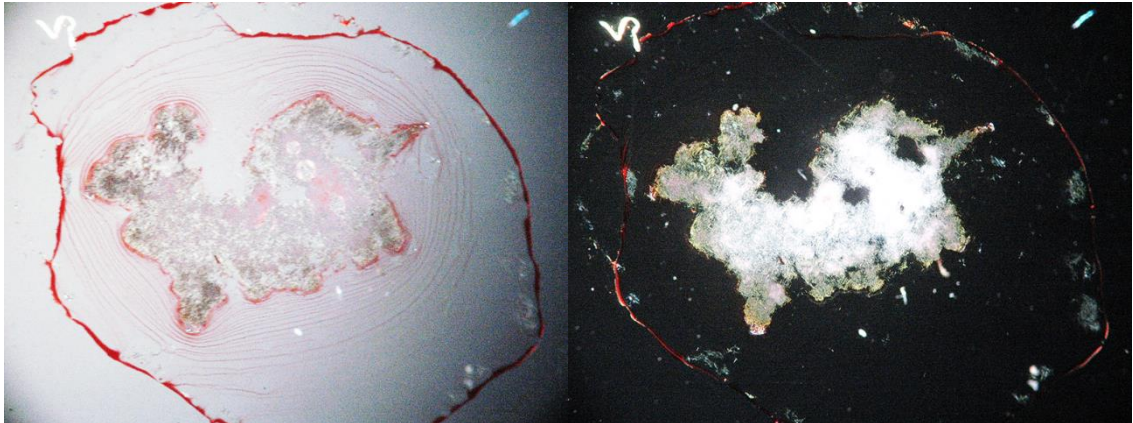
Εικόνα 85: Εικόνες του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=0,5\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O σε οπτικό μικροσκόπιο και κάτω από διασταυρωμένο πολωτή

- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=2\text{mg/ml}$ σε Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): H_2O αναλογίας 2:8



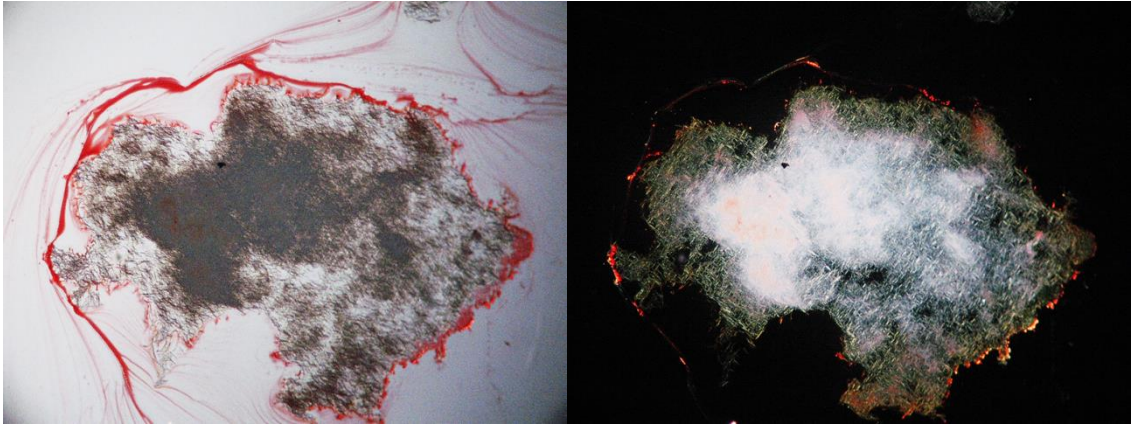
Εικόνα 86: Εικόνες του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=2\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O σε οπτικό μικροσκόπιο και κάτω από διασταυρωμένο πολωτή

- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=3\text{mg/ml}$ σε Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): H_2O αναλογίας 2:8



Εικόνα 87: Εικόνες του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=3\text{mg/ml}$ σε EtOH:H₂O σε οπτικό μικροσκόπιο και κάτω από διασταυρωμένο πολωτή

- Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH συγκέντρωσης $c=1\text{mg/ml}$ σε Methanol (CH_3OH): H_2O αναλογίας 1:9



Εικόνα 88: Εικόνες του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH $c=1\text{mg/ml}$ σε MeOH:H₂O σε οπτικό μικροσκόπιο και κάτω από διασταυρωμένο πολωτή

Όπως μπορούμε να καταλάβουμε από τις εικόνες του στερεοσκοπίου όσα διαλύματα εξετάσαμε χρησιμοποιώντας χρώση Congo Red κάτω από διασταυρωμένο πολωτή εμφάνισαν την χαρακτηριστική κιτρινό-πράσινη διπλοθλαστικότητα. Επομένως μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ότι οι χαρακτηριστικές ινώδεις δομές που παρατηρήσαμε με την βοήθεια της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας στα δείγματα του πεπτιδίου Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH είναι αμυλοειδούς τύπου.

E. Συζήτηση:

Τα πεπτίδια, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή έχουν την ικανότητα να αυτο-οργανώνονται με αποτέλεσμα να σχηματίζουν πλήθος πολύπλοκων δομών, οι οποίες φτάνουν σε μέγεθος τα μερικά μm. Για αυτό τον λόγο τα πεπτίδια μπορούν να αποτελέσουν τους δομικούς λίθους για τα φυσικά βιοϋλικά. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των πεπτιδίων είναι ότι με την βοήθεια των σύγχρονων μεθόδων παραγωγής τους είναι πολύ εύκολο να ελέγξουμε αλλά και να επιλέξουμε την αλληλουχία τους επομένως τις ιδιότητες τους καθώς και τα χαρακτηριστικά τους με βάση την εφαρμογή που θέλουμε να τα χρησιμοποιήσουμε, γεγονός που τα καθιστά περισσότερο ευέλικτα από τις πρωτεΐνες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν αμφίφιλα πεπτιδικά μόρια τα οποία περιέχουν την προστατευτική ομάδα Fmoc και λιπαρά οξέα. Το σκεπτικό της χρήσης των συγκεκριμένων πεπτιδικών υλικών είχε ως εξής: (α) η προστατευτική ομάδα Fmoc σύμφωνα με μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι προωθεί τον σχηματισμό υλικών, τα οποία χαρακτηρίζουμε ως υδρογέλες και συνεισφέρει στην υδροφοβικότητα, (β) τα λιπαρά οξέα αυξάνουν τον αντιμικροβιακό χαρακτήρα των υλικών στα οποία χρησιμοποιούνται καθώς και ευνοούν την μεταφορά μορίων και (γ) το ένα πεπτίδιο από αυτά που μελετήθηκαν εμπεριέχει το αμινοξύ της λυσίνης (Lys), η οποία συνεισφέρει στην πρωτεϊνοσύνθεση και το crosslinking σε πλήθος πρωτεϊνών.

Επιπλέον, δημιουργήθηκε από το Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας ένα υβριδικό πεπτίδιο με την πορφυρίνη TPP μέσω του οποίου καταφέραμε να επιβεβαιώσουμε ότι συνδυάζοντας βιολογικά μόρια με διαφορετικές ιδιότητες μπορούν να προκύψουν σύνθετες νανοδομές με πιθανές βιοϊατρικές εφαρμογές.

Τα πεπτίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή είναι τα ολιγοπεπτίδια Fmoc-8-aminoocctanoic acid και Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH για τα οποία διερευνήθηκε η ικανότητα τους για αυτο-οργάνωση σε διάφορα συστήματα και αναλογίες διαλυτών καθώς και συγκεντρώσεις των πεπτιδίων μας. Αρχικά να σημειωθεί ότι το Fmoc-8-aminoocctanoic acid σε όλα τα συστήματα που εξετάστηκε μετά από 24 ώρες επώσης παρατηρήθηκε η κατακρήμνηση πεπτιδικής σκόνης μέσα στο διάλυμα μας, ενώ για το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH παρατηρήθηκε η δημιουργία υδρογελών με το ισχυρότερο gel να είναι αυτό στο οποίο διαλύσαμε το συγκεκριμένο πεπτίδιο συγκέντρωσης 1mg/ml σε EtOH:H₂O 1:9. Άρα μπορούμε να φτάσουμε στο συμπέρασμα ότι η παραπάνω υδρογέλη μπορεί να θεωρηθεί το καταλληλότερο υλικό για τον έλεγχο εγκαψυλίωσης και απελευθέρωσης φαρμάκου από τα συστήματα τα οποία ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία.

Από τα αποτελέσματα που λάβαμε με την βοήθεια της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι:

(α) το Fmoc-8-aminoocctanoic acid αυτοοργανώνεται σε ορθογώνιες πλάκες (flakes) ποικίλων μεγεθών σε όλα τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήσαμε.

(β) το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH αυτοοργανώνεται κυρίως σε ινώδεις δομές με μοναδική εξαίρεση το σύστημα διαλυτών THF:H₂O, στο οποίο το πεπτίδιο μας αυτοοργανώνεται σε σφαιρικές δομές, οι οποίες όμως από όσο παρατηρήσαμε αποτελούνται από ινίδια. Επίσης το συγκεκριμένο δείγμα από ότι φαίνεται από το gel που έχει δημιουργηθεί είναι από τα πιο ισχυρά gel και πιο διαυγή που δημιουργήσαμε διαλύοντας το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε EtOH:H₂O γεγονός που το θέτει ως το καταλληλότερο υλικό για τον έλεγχο εγκαψυλίωσης και απελευθέρωσης φαρμάκου και για περαιτέρω μελλοντικές εφαρμογές.

Ακόμη, επειδή η κύρια δομή στην οποία αυτοοργανώνεται το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH είναι τα ινίδια κάνοντας χρήση της χρωστικής Congo Red σκοπός μας ήταν να επιβεβαιώσουμε αν τα ινίδια αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως αμυλοειδή. Τα δείγματα αυτά όταν παρατηρήθηκαν κάτω από διασταυρωμένο πολωτή μας έδωσαν την χαρακτηριστική κίτρινο-πράσινη διπλοθλαστικότητα, επομένως οι ινώδεις δομές που παρατηρήθηκαν για το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH μπορούν να χαρακτηριστούν ως αμυλοειδείς.

Επίσης δομικά χαρακτηρίστηκε και το υβριδικό μόριο που δημιουργήκε από την ένωση του Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH με την πορφυρίνη TPP-NH₂, το οποίο ελέγχθηκε και αυτό σε διάφορα συστήματα και αναλογίες διαλυτών. Με την βοήθεια της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας παρατηρούμε ότι το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH χάνει την αρχική του ινώδη διαμόρφωση μόλις ενωθεί με την πορφυρίνη. Η τελική διαμόρφωση του νέου υβριδικού μας μορίου παρατηρήθηκε ότι αποτελείται από συστάδες σφαιρικών δομών.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκαν πειράματα απελευθέρωσης φαρμάκων (drug release) για το πεπτίδιο Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH στο οποίο εισάγαμε 2 ουσίες, την φλουορεσίνη (Fluorescein) και της πορφυρίνης TPP. Από αυτά τα πειράματα και μέσω των διαγραμμάτων απορρόφησης καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο αποτελεί ένα αρκετά καλό σύστημα απελευθέρωσης φαρμάκων γεγονός που στηρίζεται στο ότι όσο αφορά την ένωση της φλουορεσίνης παρατηρήθηκε αρκετά εύκολη και γρήγορη απελευθέρωση της από το gel μας ενώ για την πορφυρίνη παρατηρήσαμε ότι απελευθερώνεται με μεγαλύτερη δυσκολία από την φλουορεσίνη. Παρόλα αυτά η δυσκολία αυτή μπορεί να μην αποτελεί μειονέκτημα καθώς σε πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών το ζητούμενο είναι η ελεγχόμενος ρυθμός και ποσότητα διάχυσης του φαρμάκου.

Συμπερασματικά, όλα τα πεπτίδια τα οποία ερευνήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία έχουν την ικανότητα αυτό-οργάνωσης, το Fmoc-8-aminooctanoic acid σε ορθογώνιες πλάκες, το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH σε αμυλοειδή ινίδια και το υβριδικό πεπτίδιο σε σφαιρικές δομές. Επίσης το Fmoc-Lys(palmitoyl)-OH δημιουργεί σταθερές υδρογέλες οι οποίες αποτελούν πολλά υποσχόμενο σύστημα με πιθανές εφαρμογές στον χώρο της νανοτεχνολογίας και της βιοϊατρικής. Ακόμη σε αυτές τις υδρογέλες μπορούμε να εισάγουμε ενώσεις με διάφορες ιδιότητες, όπως π.χ. οι αντιμικροβιακές πορφυρίνες, οι οποίες θα καταστήσουν το σύστημα της υδρογέλης μας κατάλληλο για απελευθέρωση αυτών των ενώσεων. Επομένως τα υλικά αυτά

μπορούν να βρουν εφαρμογή στην βιοϊατρική επιστήμη στην νανοτεχνολογία ως ικρίωματα, στην φαρμακοβιομηχανία και στην βιομηχανία των καλλυντικών.

ΣΤ. Βιβλιογραφία:

1. Mitraki, A. Plenty of Room for Biology at the Bottom. *Amyloid* **15**, 140–141 (2008).
2. Gagneux, P. Protein Structure and Function. *J. Hered.* **95**, (2004).
3. Berg, J. M., Stryer, L. & Tymoczko, J. L. *Biochemistry. 5th edition.* (W. H. Freeman 2002, 2002).
4. Vella, F. Introduction to protein structure. By C Branden and J Tooze. pp 302. garland publishing, New York. 1991 ISBN 0–8513–0270–3 (pbk). *Biochem. Educ.* **20**, 121–122 (1992).
5. Herczenik, E. & Gebbink, M. F. B. G. Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *FASEB J.* **22**, 2115–2133 (2008).
6. Zhang, W. *et al.* Protein-mimetic peptide nanofibers: Motif design, self-assembly synthesis, and sequence-specific biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **80**, 94–124 (2018).
7. Mitraki, A. Protein aggregation from inclusion bodies to amyloid and biomaterials. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **79**, 89–125 (2010).
8. Rambaran, R. N. & Serpell, L. C. Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion* **2**, 112–117 (2008).
9. Vázquez, E. *et al.* Functional inclusion bodies produced in bacteria as naturally occurring nanopills for advanced cell therapies. *Adv. Mater.* **24**, 1742–1747 (2012).
10. Tycko, R. Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils. *Protein Sci.* **23**, 1528–1539 (2014).
11. Hatters, D. M. Protein misfolding inside cells: The case of huntingtin and Huntington's disease. *IUBMB Life* **60**, 724–728 (2008).
12. Stefanis, L. α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a009399–a009399 (2012).
13. Labbadia, J. & Morimoto, R. I. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 378–385 (2013).
14. Gilead, S. & Gazit, E. Self-organization of Short Peptide Fragments: From Amyloid Fibrils to Nanoscale Supramolecular Assemblies. *Supramol. Chem.* **17**, 87–92 (2005).
15. Iconomidou, V. A., Vriend, G. & Hamodrakas, S. J. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS Lett.* **479**, 141–145 (2000).
16. Yang, J., Yoon, M.-C., Yoo, H., Kim, P. & Kim, D. Excitation energy transfer in multiporphyrin arrays with cyclic architectures: towards artificial light-harvesting antenna complexes. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4808–4826 (2012).

17. Pagona, G. *et al.* Covalent functionalization of carbon nanohorns with porphyrins: Nanohybrid formation and photoinduced electron and energy transfer. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 1705–1711 (2007).
18. Vinodh, M., Alipour, F. H., Mohamod, A. A. & Al-Azemi, T. F. Molecular Assemblies of Porphyrins and Macrocyclic Receptors: Recent Developments in Their Synthesis and Applications. *Molecules* vol. 17 (2012).
19. Ethirajan, M., Chen, Y., Joshi, P. & Pandey, R. K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 340–362 (2011).
20. Pan, D. *et al.* Meso-substituted porphyrin photosensitizers with enhanced near-infrared absorption: Synthesis, characterization and biological evaluation for photodynamic therapy. *Tetrahedron* **74**, 2677–2683 (2018).
21. Purrello, R., Gurrieri, S. & Lauceri, R. Porphyrin assemblies as chemical sensors. *Coord. Chem. Rev.* **190–192**, 683–706 (1999).
22. Stojiljkovic, I., Evavold, B. D. & Kumar, V. Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin. Investig. Drugs* **10**, 309–320 (2001).
23. Birel, Ö., Nadeem, S. & Duman, H. Porphyrin-Based Dye-Sensitized Solar Cells (DSSCs). *J. Fluoresc.* **27**, (2017).
24. Chu-Kung, A. F. *et al.* Promotion of peptide antimicrobial activity by fatty acid conjugation. *Bioconjug. Chem.* **15**, 530–535 (2004).
25. Zhong, C. *et al.* Antimicrobial peptides conjugated with fatty acids on the side chain of D-amino acid promises antimicrobial potency against multidrug-resistant bacteria. *Eur. J. Pharm. Sci.* **141**, 105123 (2020).
26. Li, Y. *et al.* Variant fatty acid-like molecules Conjugation, novel approaches for extending the stability of therapeutic peptides. *Sci. Rep.* **5**, 1–9 (2015).
27. Lehto, T. *et al.* Saturated Fatty Acid Analogues of Cell-Penetrating Peptide PepFect14: Role of Fatty Acid Modification in Complexation and Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* **28**, 782–792 (2017).
28. Lehto, T. *Characterization of nucleic acid delivery with fatty acid modified cell-penetrating peptide nanoparticle formulations.* (2018).
29. Castelletto, V. *et al.* Self-assembly of palmitoyl lipopeptides used in skin care products. *Langmuir* **29**, 9149–9155 (2013).
30. Zhao, X. *et al.* Molecular self-assembly and applications of designer peptide amphiphiles. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 3480–3498 (2010).
31. Matson, J. B., Zha, R. H. & Stupp, S. I. Peptide self-assembly for crafting functional biological materials. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **15**, 225–235 (2011).
32. Matson, J. B. & Stupp, S. I. Self-assembling peptide scaffolds for regenerative medicine.

- Chem. Commun. (Camb)*. **48**, 26–33 (2012).
33. Bhak, G., Lee, S., Park, J., Cho, S. & Paik, S. Amyloid hydrogel derived from curly protein fibrils of ??-synuclein. *Biomaterials* **31**, 5986–5995 (2010).
 34. Adler-Abramovich, L. & Gazit, E. The physical properties of supramolecular peptide assemblies: from building block association to technological applications. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 6881–6893 (2014).
 35. Fichman, G. & Gazit, E. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: Design of building blocks, physical properties and technological applications. *Acta Biomater.* **10**, 1671–1682 (2014).
 36. Malmsten, M. Antimicrobial and antiviral hydrogels. *Soft Matter* **7**, 8725–8736 (2011).
 37. Sawyer, L. C., Grubb, D. & Meyers, G. Polymer microscopy: Third edition. *Polym. Microsc. Third Ed.* 1–540 (2008) doi:10.1007/978-0-387-72628-1.
 38. Wu, C., Scott, J. & Shea, J.-E. Binding of Congo red to amyloid protofibrils of the Alzheimer A β (9-40) peptide probed by molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **103**, 550–557 (2012).
 39. Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L. & Fink, A. L. Is Congo Red an Amyloid-specific Dye? *. *J. Biol. Chem.* **276**, 22715–22721 (2001).
 40. Howie, A. J. & Brewer, D. B. Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Micron* **40**, 285–301 (2009).
 41. Nikoloudakis, E. *et al.* Self-assembly of aliphatic dipeptides coupled with porphyrin and BODIPY chromophores. *Chem. Commun.* **55**, 14103–14106 (2019).