

# Karakterizacija potencijalnih markera neuroloških poremećaja spektrometrijom masa

---

Šoić, Ružica

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:721505>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Ružica Šoić

# **KARAKTERIZACIJA POTENCIJALNIH MARKERA NEUROLOŠKIH POREMEĆAJA SPEKTROMETRIJOM MASA**

## **Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra(e) kemije

Zagreb, 2020. godina.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju pod mentorstvom dr. sc. Renate Kobetić, v. zn. sur. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević.

Diplomski rad izrađen je u okviru HrZZ projekta IP-2018-01-4694 pod nazivom “Molekularno prepoznavanje DNA:RNA hibridnih i višelančanih struktura u bioanalitičkim i in vitro sustavima“ (voditelj projekta dr. sc. Marijana Radić-Stojković, v. zn. sur.).



## Zahvale

Hvala ti dragi Bože na svim darovanim ljudima, talentima, mogućnostima i uslišanim molitvama!

Hvala svima koji su dali svoje živote te tako i meni pružili mogućnost živjeti i diplomirati u Lijepoj našoj.

Puno hvala mojoj mentorici dr. sc. Renati Kobetić na pomoći i podršci, na svim savjetima i prenesenom znanju. Hvala za nove mogućnosti, svaki susret lokalno, brižnost, životne mudrosti, za svaku šalicu čaja i ispravljanje diplomskog u svako doba dana i noći. Hvala i svima iz Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju na pomoći.

Hvala i izv. prof. dr. sc. Sandi Rončević na svim savjetima i pomoći, na jednostavnosti i brzom rješavanju svakog zadatka i problema.

Hvala dr. sc. Ireni Đapić i cijeloj ekipi na velikodušnoj pomoći te prenesenom znanju, na svim idejama, srdačnosti i susretljivosti.

Hvala dr. sc. Jasni Jurasović, dr. sc. Tatjani Orci i ekipi s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada na pomoći u izradi diplomskog rada, na ugodnom druženju i darovanom vremenu i znanju.

Hvala dr. sc. Lidiji Brkljačić na pomoći u izradi diplomskog rada. Hvala za sve savjete i iskazano povjerenje tijekom eksperimentalnog rada.

Hvala svim onim profesorima i profesoricama koji nisu samo odrađivali posao, nego su dali sebe i svoje znanje, uložili veliki trud da budu motivacija i koji su uvijek bili spremni pomoći.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri i bratu na svakoj žrtvi, pomoći, odricanju i primjeru truda i marljivosti.

Želim zahvaliti i svim životnim i PMF-ovskim prijateljima što ste uvijek tu i što ste strpljivo čekali da prođu moji bezbrojni ispiti.

HVALA mom Nikoli na bezuvjetnoj podršci, strpljivosti, zajedničkom iščekivanju, tješnju, na svim motivacijama i iznenađenjima, preuzimanju obaveza... Hvala ti što si toliko divan. Hvala za sve!



# Sadržaj

|   |            |
|---|------------|
| <b>SAŽETAK.....</b>   | <b>X</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>XII</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>   | <b>3</b>   |
| <b>2.1. Bolesti mozga .....</b>   | <b>3</b>   |
| 2.1.1. <i>Barijere mozga, cerebrospinalni likvor i rano otkrivanje bolesti.....</i>   | <i>3</i>   |
| 2.1.2. <i>Tumori mozga .....</i>  | <i>5</i>   |
| 2.1.3. <i>Amiloidne bolesti.....</i>  | <i>5</i>   |
| 2.1.4. <i>Alzheimerova bolest.....</i>  | <i>6</i>   |
| 2.1.5. <i>Parkinsonova bolest.....</i>  | <i>8</i>   |
| <b>2.2. Uloga metala kao dijela biološke matrice .....</b>                            | <b>8</b>   |
| 2.2.1. <i>Cink.....</i>   | <i>9</i>   |
| 2.2.2. <i>Bakar.....</i>  | <i>10</i>  |
| 2.2.3. <i>Željezo.....</i>  | <i>10</i>  |
| 2.2.4. <i>Mangan.....</i>   | <i>11</i>  |
| <b>2.3. Markeri .....</b>   | <b>11</b>  |
| 2.3.1. <i>Cijaninske boje.....</i>  | <i>11</i>  |
| 2.3.2. <i>Fenilalanil-fenilalanil-alanin (FFA).....</i>                               | <i>14</i>  |
| <b>2.4. Protein IbpA .....</b>  | <b>15</b>  |
| <b>2.5. Spektrometrija masa.....</b>  | <b>15</b>  |
| 2.5.1. <i>Metoda ESI-MS.....</i>  | <i>16</i>  |
| 2.5.2. <i>Metoda ICP-MS.....</i>  | <i>17</i>  |
| <b>§ 3. MATERIJALI I METODE.....</b>  | <b>18</b>  |
| <b>3.1. Materijali .....</b>  | <b>18</b>  |
| 3.1.1. <i>Standardne kemikalije.....</i>  | <i>18</i>  |
| 3.1.2. <i>Ostale kemikalije i materijali.....</i>                                     | <i>18</i>  |
| <b>3.2. Instrumenti .....</b>   | <b>19</b>  |
| 3.2.1. <i>Spektrometar masa Agilent 7500cx uz induktivno spregnutu plazmu.....</i>    | <i>19</i>  |
| 3.2.2. <i>Spektrometar masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom.....</i> | <i>19</i>  |
| 3.2.3. <i>Spektrometar masa Agilent 6420 s trostrukim kvadrupolom.....</i>            | <i>20</i>  |
| <b>3.3. Metode.....</b>   | <b>20</b>  |



|   |              |
|---|--------------|
| 3.3.1. Analiza cerebrospinalnog likvora spektrometrom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS).....   | 20           |
| 3.3.2. Analiza cijaninskih boja spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS) .....  | 22           |
| 3.3.3. Analiza proteina IbpA i vezanja cijaninskih boja spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS).....   | 25           |
| 3.3.4. Analiza tripeptida FFA i vezanja s $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{Zn}^{2+}$ spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS).....                             | 27           |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>29</b>    |
| <b>4.1. Analiza cerebrospinalnog likvora spektrometrom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS).....</b>  | <b>29</b>    |
| <b>4.2. Analiza cijaninskih boja spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS) .....</b>   | <b>32</b>    |
| 4.2.1. Marker 1.....  | 32           |
| 4.2.2. Marker 3.....  | 38           |
| 4.2.3. Analiza proteina IbpA i potencijalnog vezanja s markerima 1 i 3 pomoću spektrometra masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS) .....                             | 40           |
| <b>4.3. Analiza tripeptida FFA te vezanja s <math>\text{Cu}^{2+}</math> i <math>\text{Zn}^{2+}</math> spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS).....</b> | <b>46</b>    |
| 4.3.1. Interakcija FFA s $\text{Cu}^{2+}$ .....   | 50           |
| 4.3.2. Interakcija FFA s $\text{Zn}^{2+}$ .....   | 52           |
| 4.3.3. Analiza tripeptida FFA u deuteriranom etanolu.....   | 55           |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>57</b>    |
| <b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>   | <b>LVIII</b> |
| <b>§ 7. DODATAK.....</b>  | <b>LXII</b>  |
| <b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>   | <b>LXX</b>   |





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### KARAKTERIZACIJA POTENCIJALNIH MARKERA NEUROLOŠKIH POREMEĆAJA SPEKTROMETRIJOM MASA

Ružica Šoić

U svrhu pronalaska potencijalnih markera za rano otkrivanje neuroloških poremećaja provedena je karakterizacija cijaninskih boja, kao i analiza njihovog vezanja s proteinom IbpA te nisu pronađeni uvjeti i radni parametri pogodni za vezanje. Okarakteriziran je i tripeptid fenilalanil-fenilalanil-alanin (FFA) te je ispitivan utjecaj biološke matrice odnosno, pokazano je da se FFA s  $\text{Cu}^{2+}$  veže u molarnim omjerima 1:1 i 2:1 dok su za kompleks FFA- $\text{Zn}^{2+}$  ti omjeri: 1:1, 2:1, 3:1, 4:1. Analiza sastava metala cerebrospinalnog likvora ukazuje na to da su smanjene vrijednosti ukupnog željeza potencijalni indikator demijelinizirajućih bolesti.

Spektrometrija masa (MS) odabrana je kao metoda za karakterizaciju potencijalnih markera neuroloških poremećaja i analizu sastava metala cerebrospinalnog likvora s obzirom da se primjenom raznih MS tehnika može brzo i efikasno okarakterizirati veliki broj različitih analita. Spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS) odabrana je za karakterizaciju cijaninskih boja i tripeptida FFA, dok je analiza udjela metala u cerebrospinalnom likvoru provedena spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS).

(83 stranica, 42 slike, 3 sheme, 16 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: cerebrospinalni likvor, cijaninske boje, fenilalanil-fenilalanil-alanin, metali, MS, neurološki poremećaji.

Mentor: dr. sc. Renata Kobetić, v. zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
3. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Zamjena: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Datum diplomskog ispita: 27.11.2020.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF POTENTIAL MARKERS FOR NEUROLOGICAL DISORDERS BY MASS SPECTROMETRY

Ružica Šoić

In order to find potential markers for early detection of neurological disorders, cyanine dyes were characterized. Suitable conditions and operating parameters for analysis of cyanine dye-IbpA protein interactions were not found. Also, tripeptide phenylalanine-phenylalanine-alanine (FFA) was characterized and analysis of the influence of biological matrix shows that FFA binds to  $\text{Cu}^{2+}$  in molar ratios: 1:1 and 2:1, while these ratios for complex FFA- $\text{Zn}^{2+}$  are: 1:1, 2:1, 3:1 and 4:1. Furthermore, analysis of total metal concentrations in cerebrospinal fluid (CSF) shows that lower concentrations of iron can be an indicator for demyelinating diseases.

Mass spectrometry (MS) is selected as a method for the characterization of potential markers for neurological disorders and analysis of selected metals in CSF, because different MS techniques are suitable for the fast and efficient characterization of a large number of analytes. Cyanine dyes and tripeptide FFA were characterized by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The content of metals in CSF was analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

(83 pages, 42 figures, 3 schemes, 16 tables, 53 references, original in Croatian)

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

Keywords: cerebrospinal fluid, cyanine dyes, phenylalanine-phenylalanine-alanine, metals, MS, neurological disorders.

Mentor: Dr. Renata Kobetić, Senior Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Sanda Rončević, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. Sanda Rončević, Associate Professor
  2. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
  3. Dr. Ivica Đilović, Associate Professor
- Substitute: Dr. Iva Juranović Čindrić, Professor

Date of exam: 27.11.2020.



## § 1. UVOD

Razni neurološki poremećaji i tumori mozga veliki su izazov današnje medicine. Unatoč nemalom broju istraživanja na ovom području, još uvijek ne postoji prigodan način ranog otkrivanja bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti ili glioblastoma multiforme (GBM). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije do 2030. godine broj oboljelih od nekog oblika demencije iznositi će oko 82 milijuna.<sup>1</sup> Gledajući pak tumore mozga, glioblastom multiforme je iznimno agresivan oblik tumora mozga, a vjerojatnost preživljavanja još 5 godina nakon otkrivanja ove bolesti je vrlo mala te iznosi svega 5,1%.<sup>2</sup> Budući da je mozak dobro zaštićen krvno-moždanom barijerom (BBB, eng. *the blood-brain barrier*) do sada je bilo od iznimne važnosti pronaći markere koji mogu proći tu barijeru i doći do ciljanog tkiva. Isto tako, uglavnom su ti markeri imali svojstvo fluorescencije jer na taj način mogu pomoći u efikasnijem označavanju tumorskih stanica mozga što je izuzetno važno tijekom resekcije tumora. Stoga je važno naći markere koji mogu poslužiti kao pokazatelji rane detekcije raznih neuroloških poremećaja pa možda čak i kao potencijalni lijekovi.

Za analizu markera i matrice mozga potrebna je brza, učinkovita i osjetljiva metoda. Spektrometrija masa (MS), kao instrumentalna tehnika, kojom se proučavaju ioni nastali ionizacijom atoma ili molekula i njihove reakcije u vakuumu instrumenta, nudi se kao iznimno korisna metoda za ovo područje istraživanja.<sup>3</sup> Nativna ESI-MS (spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem) odlična je metoda budući da je nedestruktivna te je moguće proučavati nekovalentne veze između markera i proteina (pokazano je da nekovalentne interakcije mogu biti očuvane u plinovitoj fazi metode ESI-MS).<sup>4</sup> S druge strane, za omjere metala u cerebrospinalnom likvoru ili nekom drugom tjelesnom fluidu najčešće se koristi metoda ICP-MS (spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu) zbog mogućnosti multielementne analize. Prednost ove metode je i osjetljivost do koncentracija u  $\text{ng L}^{-1}$  i  $\text{pg L}^{-1}$  što je nužan uvjet za analizu elemenata u tragovima.<sup>5</sup>

Cilj je ovog rada okarakterizirati potencijalne markere za neurološke bolesti i tumore mozga. Spektrometrijom masa (ESI-MS)<sup>6</sup> okarakterizirat će se cijaninske boje i njihovi novosintetizirani konjugati koji imaju svojstvo prepoznavanja različitih konformacija proteina

( $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -nabranih ploča). Pokazano je da su cijaninske boje pogodne kako za fluorescentno oslikavanje tumorskih stanica tako i za apoptozu tih stanica.<sup>7</sup> Osim karakterizacije, ispitat će se i vezanje cijaninskih boja na proteine, točnije na protein IbpA (derivat iz bakterije *Escherichia coli*, budući da masa ovog proteina iznosi oko 16 kDa pa je pogodan za analizu spektrometrijom masa te kao modelni protein ima 7  $\beta$ -lanaca koji čine  $\beta$ -nabrane ploče). Nadalje, analitičkom metodom ESI-MS okarakterizirat će se i tripeptid FFA (fenilalanil-fenilalanil-alanin) budući da je ustanovljeno da mali peptidi mogu poslužiti kao modeli za amiloidnu agregaciju, a također su i potencijalni inhibitori potonje.<sup>8</sup> S obzirom na to da je poznato da su razne bolesti mozga (poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti) povezane s različitim masenim omjerima metala (poput masenog omjera bakra i cinka) u odnosu na masene omjere metala u slučaju zdravih osoba<sup>9</sup>, ispitat će se omjeri metala u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata metodom ICP-MS i usporediti dobivene vrijednosti s kontrolnim te povezati rezultate s anamnezom pacijenata.



## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Bolesti mozga

Kod bolesti mozga velike probleme predstavljaju kako liječenje tako i sama dijagnoza. Otkrivanje pojedinih bolesti mozga i dalje je slučaj tek u uznapredovaloj fazi što uvelike smanjuje mogućnost izlječenja te samim time i povećava stopu smrtnosti. Bolesti mozga na koje je fokusiran ovaj rad jesu neurološki poremećaji poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, multiple skleroze te tumori mozga poput glioblastoma multiforme (GBM).

#### 2.1.1. Barijere mozga, cerebrospinalni likvor i rano otkrivanje bolesti

Zbog krvno-moždane barijere (BBB) i krvno-likvorske barijere (eng. *the blood-cerebrospinal fluid barrier*, BCSFB) ljudski je mozak izvrsno zaštićen od utjecaja toksičnih agensa te su ove barijere zaslužne za održavanje homeostaze elemenata u tragovima na području mozga (barijere mozga su prikazane na slici 1). Barijera BBB je visokoselektivna semipermeabilna membrana koja dozvoljava prolazak do mozga jedino nepolarnim spojevima male molekulske mase (< 400 Da) te esencijalnim elementima i metabolitima.<sup>10</sup> Barijera BCSFB je membrana koja sprječava ulazak lijekova, toksina i mikroba do cerebrospinalnog likvora.<sup>10</sup> S druge strane, kod terapije lijekovima te barijere često predstavljaju problem zbog otežanog pristupa lijeka određenom dijelu mozga.<sup>10</sup> Dakle, potrebno je razviti učinkovit način prijenosa lijeka do mozga. Cijaninske boje pokazale su se kao odlično rješenje budući da mogu poslužiti kao nosači lijeka (uz to mogu smanjiti dozu lijeka potrebnu za antitumorsko djelovanje čak za 2/3 iznosa doze samog lijeka) te je pokazano da mogu proći vanjsku i unutarnju membranu mitohondrija.<sup>2</sup> Također, cijaninske boje se proučavaju kao potencijalni markeri koji bi mogli poslužiti u ranijem otkrivanju već spomenutih bolesti na način da prepoznaju i vežu se na specifične biomarkere koje je moguće pronaći u cerebrospinalnom likvoru ili serumu kao posljedica razvoja pojedine bolesti mozga.



liječenja neke od bolesti mozga.<sup>13</sup> Također, uzorci cerebrospinalnog likvora koji se koriste kao referentni obično su uzorci pacijenata za koje se sumnjalo da imaju neku od neurodegenerativnih bolesti, a analizom se razaznalo da je pacijent zdrav.<sup>13</sup>

### 2.1.2. Tumori mozga

Najčešći i najagresivniji oblik tumora mozga jest glioblastom multiforme (GBM), tumor gradusa IV, odnosno stupnja najveće agresivnosti. Raste i širi se vrlo brzo. Može se javiti u bilo kojoj životnoj dobi, a najčešće se pojavljuje od četrdesete godine nadalje.<sup>14</sup> Liječenje glioblastoma multiforme sastoji se od kirurške resekcije, zatim radijacije i kemoterapije. Za resekciju tumorskih stanica, koja može značajno doprinijeti produžetku života oboljelih pacijenata, potrebno je poznavati lokaciju tumorskog tkiva u mozgu. U tu svrhu najčešće se koriste magnetska rezonancija, MRI (eng. *magnetic resonance imaging*) i pozitronska emisijska tomografija, PET (eng. *positron emission tomography*) koje često nisu dostatne za praćenje točnih položaja i za određivanje granice tumorskog tkiva, odnosno za odjeljivanje tumorskog od zdravog tkiva. Zbog toga je bitno pronaći pogodne fluorescentne boje koje mogu pomoći u rješavanju navedenih problema i omogućiti potpuniju resekciju.<sup>15</sup> Ako je tumor nedostupan kirurškom liječenju, pristupa se kemoterapijskom liječenju (pri čemu su trenutno samo četiri lijeka za tumore mozga odobrena od FDA (eng. *Food and drug administration*)).<sup>2</sup> Osim glioblastoma multiforme, ostali oblici tumora su astrocitom, oligodendrogliom i meningeom (najčešće benigne naravi). Rano otkrivanje i dijagnoza tumora, prije metastaziranja, uvelike povećava šansu izlječenja. Budući da se analiza tumorskog tkiva vrši tek posmrtno, potrebno je naći nove načine za analizu i rano otkrivanje bolesti. Primjerice, mikrookruženje tumora obilježeno je kiselim pH i hipoksijom koji mogu poslužiti kao indikatori za tumore.<sup>16</sup> Također, razvojem tumora mozga, u cerebrospinalni likvor (koji preslikava stanje u mozgu) se ispuštaju biomarkeri, poput mikroRNA (miRNA), koji mogu poslužiti kao mete za sintetizirane markere, poput cijaninskih boja te se na taj način potencijalno može unaprijediti proces ranog otkrivanja tumora mozga.<sup>17</sup>

### 2.1.3. Amiloidne bolesti

Amiloidne bolesti ili amiloidoze su skupina ljudskih bolesti koje nastaju kao posljedica pogrešnog smatanja proteina i neprirodnog povezivanja proteina u amiloidna vlakna i

oligomere.<sup>18</sup> U ovom procesu dolazi do stvaranja izvanstaničnih amiloidnih vlakana ili unutarstaničnih inkluzija s križnom  $\beta$ -nabranom strukturom te se nastali plakovi najčešće pojavljuju u blizini neurona i neurološki povezanih stanica.<sup>18,19</sup> Zbog nastanka reaktivnih specija kisika dolazi do pojačane agregacije proteina, koja pak izaziva oštećenje mitohondrija.<sup>20</sup> Amiloidne bolesti uključuju neurodegenerativne poremećaje poput Alzheimerove, Parkinsonove, Creutzfeld-Jacobove i Huntingtonove bolesti, dijabetesa mellitus tipa 2, amiotrofične lateralne skleroze te još pedesetak različitih bolesti.<sup>18</sup> S obzirom na vrstu i razvoj neurodegenerativnih bolesti, može doći do nastajanja dimera, trimera, oligomera, plakova, vlakana te mnogih drugih formi proteina.<sup>19</sup> Alzheimerova i Parkinsonova bolest detaljnije su opisane u sljedećim odjeljcima.

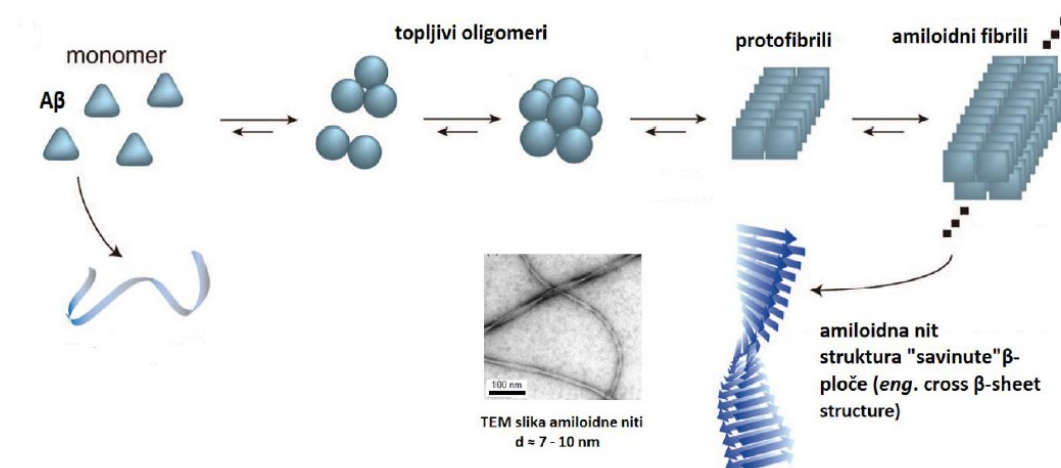
#### 2.1.4. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je oblik demencije koji pogađa 5-15% populacije u dobi najčešće iznad 65 godina.<sup>21</sup> Bolest se očituje gubitkom pamćenja i neprestanim mentalnim pogoršanjem što zatim uzrokuje nemogućnost samostalnog življenja.<sup>21</sup> Uzrok bolesti jest nastajanje amiloidnih agregata (takozvani plakovi) zbog samoorganizacije skupine  $A\beta$ -proteina ( $A\beta$ -40 i  $A\beta$ -42) u nitaste agregate (vlakna) koji izazivaju smrt stanica te gubitak sinapsi u pojedinim područjima mozga poput sfere odgovorne za učenje, ponašanje i pamćenje (proces agregacije prikazan na slici 2).<sup>8,21</sup> Drugi je razlog razvoj intra-neuronskih neurofibrilarnih čvorova (eng. *intra-neuronal neurofibrillary tangles*, NFTs) koji sadrže hiperfosforilirani tau protein.<sup>22</sup> Vlakna su građena od savinutih paralelno orijentiranih  $\beta$ -nabranih ploča u obliku traka postavljenih okomito s obzirom na os niti (eng. *cross  $\beta$ -sheet*).<sup>8</sup>

U  $A\beta$ -proteinu mozga važan je aminokiselinski slijed KLVFF (lizin-leucin-valin-fenilalanin-fenilalanin) za tvorbu amiloidnih vlakna (jer stabilizira intra- i inter-molekulske interakcije uključene u stvaranje amiloidnih niti) i kao vezno mjesto za amiloidne boje te potencijalne inhibitore amiloidne agregacije. Vodikove veze te hidrofobne i elektrostatske interakcije između  $\beta$ -nabranih ploča uzrokuju stabilnost i netopljivost agregata pa je potrebno pronaći peptidomimetike koji mogu spriječiti nastanak tih veza. Izvanstanični amiloidni plakovi nakupljaju se između neurona koji kontroliraju pamćenje te na taj način ometaju normalnu komunikaciju između živčanih stanica.<sup>8</sup>

Ne postoji specifični proteinski slijed koji se samoorganizira u vlakna što dodatno otežava istraživanje mehanizma agregacije proteina – proces koji može trajati nekoliko minuta, dana ili godina. Još uvijek ne postoji lijek koji može spriječiti razvoj ove bolesti, a broj oboljelih raste svakodnevno s obzirom na porast broja populacije starije životne dobi. Trenutno su male organske molekule i peptidi najistraživaniji potencijalni inhibitori amiloidne agregacije. Mali peptidi se vežu na središnju hidrofobnu regiju proteina koja je zaslužna za stvaranje agregata i na taj način sprječavaju nastajanje  $\beta$ -nabranih ploča koje slaganjem daju amiloidna vlakna.<sup>8</sup>

Nadalje, pokazano je da su koncentracije pojedinih metala u plakovima pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti različite u odnosu na koncentracije tih metala u zdravom tkivu mozga i to: 3,5:1 za magnezij, 3:1 za kalcij, 2:1 za željezo, 3,5:1 za bakar i 2:1 za cink.<sup>19</sup> Cink i bakar sudjeluju u reguliranju razine  $A\beta$ -proteina u cerebrospinalnom likvoru što ukazuje na to da su cink i bakar povezani s početkom i/ili napredovanjem Alzheimerove bolesti.<sup>23</sup> Skupina  $A\beta$ -proteina može vezati metale u redoks-aktivnoj formi preko aminokiselinskih ostataka koji uključuju histidine te može doći do stvaranja reaktivnih specija kisika, a što je povezano s povećanom koncentracijom željeza, bakra i cinka u blizini plakova analiziranih tkiva mozga umrlih pacijenata koji su bolovali od ove bolesti.<sup>20</sup> Povećane koncentracije bakra pronađene su unutar amiloidnih plakova i neurofibrilarnih čvorova.<sup>24</sup>



Slika 2. Prikaz nastajanja amiloidnih niti iz monomera proteina  $A\beta$ .<sup>8</sup>

### 2.1.5. Parkinsonova bolest

Parkinsonova je bolest progresivan poremećaj centralnog živčanog sustava.<sup>25</sup> Do razvoja ove bolesti dolazi zbog abnormalne akumulacije  $\alpha$ -sinukleina (malog proteina od 140 aminokiselina) u obliku oligomera u mozgu.<sup>19</sup> Do oligomerizacije dolazi zbog promjene konformacije iz nativnog nesmotanog stanja u konformaciju  $\beta$ -ploče.<sup>20</sup> Najčešće se pojavljuje kod ljudi starijih od 60 godina. Karakteristike Parkinsonove bolesti su drhtanje (tremor), ukočenost, usporenost pokreta (bradikinezija) i abnormalnosti držanja tijela.<sup>26</sup> S razvojem bolesti dolazi i do poteškoća u gutanju, disanju i govoru te do depresije i demencije.<sup>20</sup> Ti su simptomi posljedica nedostatka dopamina, to jest molekule potrebne za normalne i precizne pokrete ljudskog tijela, a razvoj ove bolesti prati gubitak dopaminergičkih neurona.<sup>25</sup> Na razvoj ove bolesti mogu utjecati mnogi faktori poput starenja, prehrambenih navika i okolišnih faktora, primjerice izloženost metalima, pesticidima i fungicidima.<sup>27</sup> Također, kompleksi  $\text{Cu}^+$ - $\alpha$ -sinuklein i  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -sinuklein mogu uzrokovati oksidativno oštećenje stanica stvaranjem reaktivnih specija kisika što pak potiče nastajanje plakova i Parkinsonove bolesti.<sup>28</sup>

## 2.2. Uloga metala kao dijela biološke matrice

Različite su uloge metala u mozgu poput esencijalne uloge u vidu pravilnog funkcioniranja mozga budući da osiguravaju zaštitu od bolesti i reaktivnih specija kisika (ROS).<sup>9</sup> Također, bitni su za pravilnu katalitičku aktivnost i transport u aktivno mjesto mnogih enzima.<sup>19</sup> Homeostaza elemenata u tragovima održavana je kroz procese apsorpcije, distribucije biotransformacije i ekskrecije.<sup>9</sup> Nakupljanje redoks-aktivnih prijelaznih metala u mozgu i poremećaj u metalnoj homeostazi povezani su s pojavom neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.<sup>9,22</sup> Kontrola prostorne raspodjele elemenata u mozgu iznimno je važna za potpuno shvaćanje njihovog biokemijskog značaja.<sup>9</sup> Pokazano je da permeabilnost BCSFB uzrokuje variranje koncentracija pojedinih metala u mozgu (primjerice mangana, željeza, bakra i cinka) pri čemu mangan u puno većem postotku prelazi barijeru u odnosu na ostale navedene metale, budući da ti metali prelaze barijeru u obliku kompleksa velikih molekulskih masa.<sup>29</sup> Nadalje, između mnogih esencijalnih elemenata, dvije trećine proteina koriste željezo, bakar, cink ili mangan za njihovo pravilno funkcioniranje.<sup>24</sup> Zbog toga su poremećaji u homeostazi ovih metala često odgovorni za razne neurološke bolesti.<sup>24</sup>

Istraživanja na tkivima mozga umrlih pacijenata koji su bolovali od Alzheimerove bolesti pokazuju da dolazi do akumulacije Cu, Fe i Zn u velikim koncentracijama unutar A $\beta$  plakova.<sup>22</sup> Prema tome, može se pretpostaviti potencijalna uloga kelatiranja metala u terapijske svrhe sprječavanja ili usporavanja razvoja neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove bolesti.<sup>22</sup> Porast koncentracije cinka i smanjenje koncentracije bakra u crnoj tvari mozga (lat. *Substantia nigra*) povećavaju podložnost stanica oksidativnom oštećenju.<sup>27</sup>

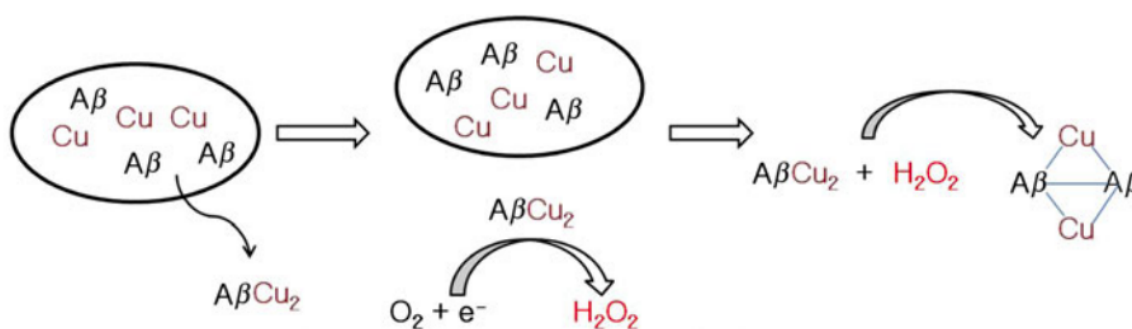
Još uvijek ne postoje ujednačena i uniformna mjerenja koja bi davala egzaktno brojke u vezi koncentracija pojedinih metala i njihovih omjera u cerebrospinalnom likvoru. Razlog tomu jesu niske koncentracije metala u likvoru, moguće kontaminacije tijekom uzimanja uzorka i analize, primjerice onečišćenje pojedinim metalom može se izazvati medicinskim postupkom lumbalne punkcije pri kojemu se koristi metalna igla ili pak onečišćenje česticama metala iz zraka tijekom analize budući da su masene koncentracije metala u likvoru najčešće u  $\mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>28</sup> Također, razlike u koncentracijama pojedinih metala u cerebrospinalnom likvoru objavljenim u različitim radovima mogu biti posljedica različite prehrane te načina života i okolišnih uvjeta u kojima pacijenti s pojedinom neurodegenerativnom bolesti žive.<sup>28</sup> Povećane koncentracije sljedećih metala: željeza, kalcija, cinka i bakra pronađene su u hipokampusu i korteksu, odnosno u dijelovima mozga gdje se najveći broj amiloidnih nakupina pojavljuje.<sup>22</sup> Pokazano je da godine i spol pacijenata nemaju značajni utjecaj na razliku u koncentracijama metala u cerebrospinalnom likvoru.<sup>12,28,30</sup>

### 2.2.1. Cink

Cink je vrlo važan element za pravilan rad više od 300 enzima te za sinaptičku neurotransmisiju i stabilizaciju struktura proteina.<sup>9</sup> U mozgu se cink nalazi najčešće kao dio metaloproteina (90 %). Do mozga se prenosi preko barijera BBB i BCSFB pomoću cink-transportera.<sup>9</sup> Važan je i u stabilizaciji strukture mijelina i zato je visoko koncentriran u bijeloj tvari mozga.<sup>9</sup> U normalnim fiziološkim uvjetima razina nevezanog cinka regulirana je metalotioneinom i superoksid dismutazom (SOD).<sup>22</sup> Za vrijeme bolesti cink može ostati nevezan kroz duži vremenski period te tako stupiti u interakciju s A $\beta$ -proteinom i pripomognuti u stvaranju amiloidnih agregata.<sup>22</sup> Povišena koncentracija cinka može uzrokovati oštećenje postsinaptičkih neurona.<sup>28</sup> Značajno niže koncentracije cinka u cerebrospinalnom likvoru pacijenata koji boluju od Parkinsonove bolesti pronađene su u odnosu na koncentraciju u likvoru zdravih osoba.<sup>27</sup>

## 2.2.2. Bakar

Bakar je kofaktor mnogih enzima koji imaju iznimnu ulogu u reakcijama sinteze neuropeptida i neurotransmitera.<sup>9</sup> Pronađene su veće koncentracije bakra u cerebrospinalnom likvoru pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti, u odnosu na koncentraciju bakra u likvoru zdravih ljudi.<sup>27</sup> Bakar se prenosi do mozga kao slobodni ion ( $\text{Cu}^+$ ) preko barijere BBB i otpušta se u cerebrospinalnom likvoru.<sup>9</sup> Zatim koroidne epitelijalne stanice apsorbiraju bakar iz likvora.<sup>9</sup> Bakar se preferencijalno veže na pravilno ili nepravilno smotane proteine, odnosno veže se na fragmente bogate histidinima.<sup>19</sup> Ako koncentracija  $\text{Cu(II)}$  u stanicama nije kontrolirana,  $\text{Cu(II)}$  se može vezati na  $\text{A}\beta$ -protein što može izazvati stvaranje vodikovog peroksida.<sup>19</sup> Zatim dolazi do redukcije u  $\text{Cu(I)}$  (primjerice pomoću nikotinamid adenin dinukleotida, NADH) te u reakciji kompleksa  $\text{A}\beta\text{-Cu(I)}$  s vodikovim peroksidom dolazi do stvaranja hidroksilnih radikala i reaktivnih specija kisika koji dalje potiču nastajanje kovalentnih veza između proteina što dovodi do nastajanja plakova, a posljedica toga jest razvoj neurodegenerativne bolesti (proces prikazana na slici 3).<sup>19</sup>



Slika 3. Prikaz nastajanja agregata iz monomera  $\text{A}\beta$  pod utjecajem nekontrolirane koncentracije bakra u stanici.<sup>19</sup>

## 2.2.3. Željezo

Željezo je kofaktor u sintezi mijelina i neurotransmitera.<sup>9</sup> Također, ima bitnu ulogu u oksidativnom metabolizmu te je važan za pravilno funkcioniranje mozga.<sup>9</sup> Nadalje, važan je i kod prijenosa kisika, u metabolizmu glukoze, replikaciji DNA te prijenosu elektrona.<sup>9</sup> Transport željeza do mozga odvija se preko barijera BBB i BCSFB, pomoću transferina.<sup>9</sup> Prekomjerno nakupljanje željeza može dovesti do razvoja reaktivnih hidroksilnih radikala, koji,



kao i u slučaju bakra, potiču agregaciju proteina i stvaranje plakova.<sup>9</sup> Pronađene su veće koncentracije željeza u cerebrospinalnom likvoru pacijenata oboljelih od Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, u odnosu na koncentraciju željeza u likvoru zdravih ljudi.<sup>20,27</sup>

Oligodendrociti (glija stanice koje izgrađuju mijelinske ovojnice aksona središnjeg živčanog sustava) za visoko-energetski proces izgradnje mijelinske ovojnice koriste željezo, čijim poremećajem homeostaze ili smanjenjem koncentracije dolazi do narušavanja održivosti ovih stanica, a što za posljedicu može imati razvoj raznih demijelinizirajućih bolesti poput multiple skleroze.<sup>31</sup>

#### 2.2.4. Mangan

Mangan je, također, bitan za pravilno funkcioniranje mnogih enzima poput transferaza, izomeraza, ligaza, hidrolaza i oksidoreduktaza.<sup>13</sup> Uključen je u regulaciju krvnog šećera, proizvodnju energije u stanicama, rast kostiju, zgrušavanje krvi, detoksifikaciju od superoksidnih slobodnih radikala te u mnoge druge funkcije. Barijeru BBB prijelazi najvećim postotkom u obliku kompleksa Mn-citrat ili kao ion  $Mn^{2+}$ .<sup>13</sup> Prevelik unos mangana uzrokuje gubitak dopamina, a time i razvoj Parkinsonove bolesti te demencije.<sup>9</sup>

### 2.3. Markeri

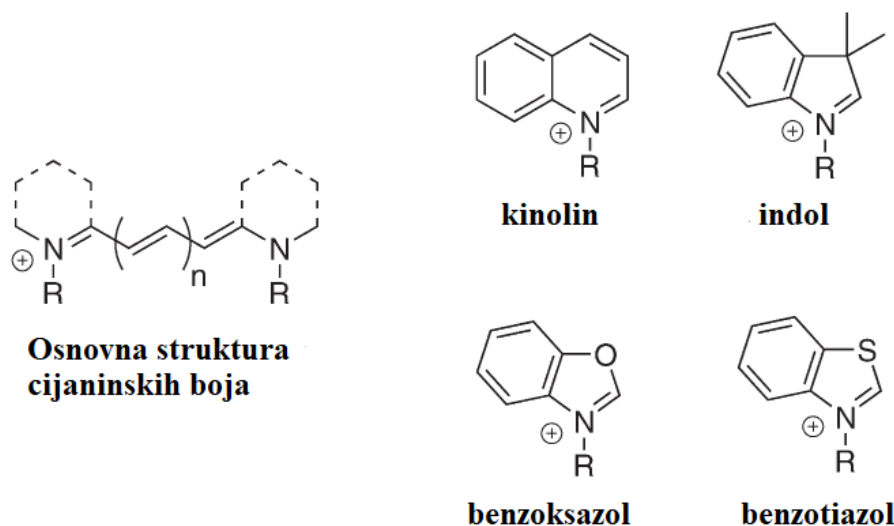
Organski ili biokemijski markeri mogu biti indikatori specifičnog biološkog stanja. Razne vrste markera, poput organskih boja i malih peptida, istražuju se u svrhu rane dijagnoze i detekcije bolesti te u svrhu oslikavanja ciljanog tkiva ili kao nosači za prijenos lijeka do željenog mjesta u organizmu. Pojedini markeri imaju potencijalnu primjenu i u apoptozi tumorskih stanica ili u usporavanju/zaustavljanju razvoja amiloidnih agregata. Veliki problem većine markera predstavlja slaba osjetljivost i specifičnost te nestabilnost u biološkoj okolini.

#### 2.3.1. Cijaninske boje

Cijaninske boje mogu biti prirodne, poput kurkumina ili sintetizirane, poput heliantina, a predstavljaju obećavajuću skupinu fluorescentnih boja i anti-tumorskih lijekova zbog citotoksičnog efekta prema malignim stanicama. Prvu cijaninsku boju sintetizirao je C. H. G.

Williams 1856. godine, a podrijetlo imena leži u intenzivnoj plavoj boji tog spoja (grč. *kyano* = plavo).<sup>32</sup> U ovih gotovo 150 godina od prve sinteze, cijaninske boje upotrebljavale su se, ili se i danas koriste, na području fotografija, lasera, solarnih ćelija, poluvodiča te u medicini, primjerice kao fluorescentne probe.<sup>32</sup> Osnovna struktura cijaninskih boja jest polimetinski most koji povezuje dva atoma dušika na koja je vezan ostatak organske strukture. Najčešće su ti dušici dio heterocikličke aromatske skupine poput indola, kinolina, benzoksazola ili benzotiazola, što u cjelini čini konjugirani sustav prikazan na slici 4.<sup>33</sup> Benzotiazolni derivati imaju planarnu strukturu koja je nužna za vezanje cijaninskih boja na nukleinske kiseline pa iz tog razloga ove boje mogu poslužiti kao efikasni biološki markeri.<sup>32</sup> Primjerice, benzotiazolni spojevi već su prije istraživani kao *in vivo* sustavi oslikavanja za Alzheimerovu bolest.<sup>32</sup> Za vezanje malih molekula poput cijaninskih boja na amiloidne peptide i proteine potreban je aromatski i anionski karakter tih boja.<sup>34</sup> Supstituenti na aromatskim prstenovima koriste se u svrhu povećanja topljivosti ili agregacije.<sup>33</sup> Boje mogu biti simetrične i asimetrične, ovisno o tome nalaze li se na krajevima polimetinskog mosta isti ili različiti supstituenti.<sup>33</sup> U otopinama dolazi do porasta agregacije cijaninskih boja s porastom duljine polimetinskog mosta.<sup>33</sup>

Cijaninske boje su potencijalni nekovalentni fluorescentni markeri za *in vivo* označavanje stanica i proteina, za praćenje agregacije proteina i nukleinskih kiselina.<sup>35</sup> Nadalje, ove boje mogu se vezati na DNA i RNA kovalentnim vezama, vodikovim vezama ili elektrostatskim i drugim nekovalentnim interakcijama, pri čemu im se povećava intenzitet fluorescencije budući da vezanjem dolazi do smanjenja torzijske mobilnosti oko polimetinskog mosta.<sup>33</sup> Ova se prednost može iskoristiti i u slučaju vezanja cijaninskih boja na mikroRNA – biomarker koji se u cerebrospinalnom likvoru javlja kao posljedica razvoja glioblastoma multiforme. Pokazano je kako cijaninske boje imaju mogućnost antiproliferativnog djelovanja na kancerogene stanice na način da inhibiraju signalizaciju receptora tirozin kinaze (RTK), pri čemu neki od njih, također, induciraju apoptozu malignih stanica.<sup>36</sup> Također je pokazano kako ove boje selektivno označuju i/ili razaraju tumorske stanice, a puno manji utjecaj imaju na zdrave stanice ljudskog organizma.<sup>36,37</sup> Karakteristike nekih cijaninskih boja su i mala citotoksičnost te izvrstan stanični unos i specifično fluorescentno označavanje mitohondrija.<sup>38</sup> Prednost cijaninskih boja je i ta što mogu poslužiti kao nosači lijekova te uz to često daju veći postotak inhibicije tumorskih stanica u odnosu na taj postotak za sami lijek.<sup>2,39</sup>



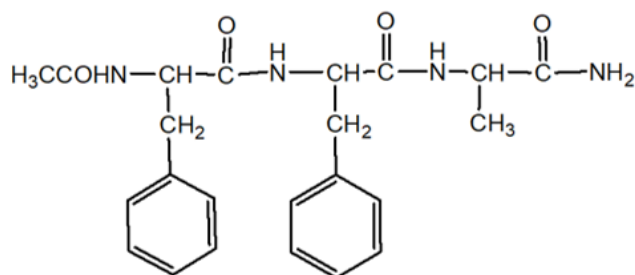
Slika 4. Osnovna struktura cijaninskih boja s najčešćim heterociklima na krajevima polimetinskog mosta.<sup>33</sup>

Ciljano dovođenje terapijskog agensa do mitohondrija je učinkovit način eliminiranja tumorskih stanica budući da lijek može djelovati u središtu stanice.<sup>40</sup> Takvo je djelovanje povezano sa značajnom ulogom mitohondrija u oksidativnom metabolizmu i apoptozi stanica.<sup>41</sup> Specifično ciljanje mitohondrija samo tumorskih stanica moguće je pomoću cijaninskih boja koje mogu selektivno „prepoznati“ viši negativni potencijal unutarnje membrane mitohondrija tumorskih stanica ( $\Delta\Psi_m \approx -220$  mV) u odnosu na potencijal unutarnje membrane mitohondrija zdravih stanica ( $\Delta\Psi_m \approx -150$  mV do  $-180$  mV) ili mogu prepoznati prekomjerno stvaranje reaktivnih specija kisika (ROS).<sup>40</sup> Tako bi cijaninske boje mogle izazvati smrt tumorskih stanica na način da oštete njihov mitohondrij.<sup>40</sup> Za prolazak membrane mitohondrija potrebno je da boje imaju lipofilni karakter, a za nakupljanje u membrani s visokim negativnim potencijalom potrebno je da imaju pozitivan naboj. Preferencijalno nakupljanje cijaninskih boja u tumorskim stanicama u odnosu na zdrave stanice povezano je sa skupinom OATP (organskim anionskim transportnim polipeptidima, koji se prekomjerno nakupljaju u tumorskim stanicama) i hipoksičnim uvjetima u slučaju tumora.<sup>39</sup> Interakcije I... $\pi$  koje se pojavljuju u cijaninskim bojama, s energijama vezanja sličnim vodikovim vezama:  $E = 20-50$  kJ mol<sup>-1</sup>, između aniona i aromatskog prstena važne su za smanjenje mogućnosti agregacije boja u otopinama.<sup>42</sup> Također, pokazano je kako neke cijaninske boje s jodidnim anionom mogu izazvati stvaranje reaktivnih specija kisika i topline u stanici te na taj način može doći do apoptoze stanica.<sup>43</sup> Uspoređujući ih s ostalim organskim NIR (blisko infracrveno područje, eng. *near infrared*) bojama,

cijaninske boje imaju veću sposobnost preferencijalnog nakupljanja u tumorskim stanicama, veću stabilnost u *in vivo* sustavima, nisku autofluorescenciju u tkivu te veće antitumorsko djelovanje.<sup>44</sup>

### 2.3.2. Fenilalanil-fenilalanil-alanin (FFA)

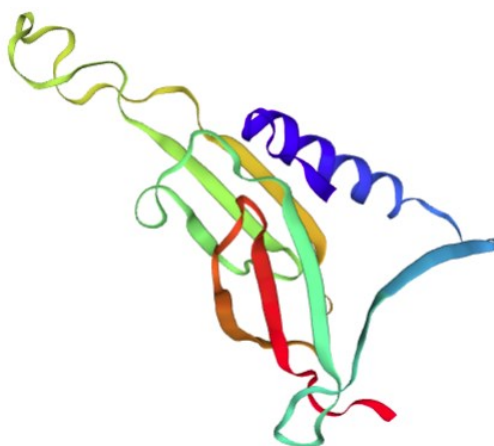
Fenilalanil-fenilalanil-alanin (FFA) je tripeptidni derivat koji je peptidomimetik. FFA korišten u ovom radu je sintetiziran tako da ima acetilnu zaštitnu skupinu (struktura prikazana na slici 5), a pokazano je da su acetilni tripeptidi s aminokiselinskim slijedom FFA dobri gelatori vode i polarnih te aromatskih otapala. Mali peptidi poput FFA sadrže sve informacije potrebne za samoorganizaciju u tipična amiloidna vlakna. Nadalje, FFA može poslužiti kao model A $\beta$ -proteina u svrhu istraživanja vezanja različitih organskih molekula na amiloidne agregate te razvoja novih inhibitora amiloidne agregacije. Proces samoudruživanja određen je elektrostatskim, van der Waalsovima i  $\pi$ - $\pi$  interakcijama te vodikovim vezama i solvofobnim efektom. Iako višestruko slabije od kovalentnih veza ( $E_{\text{dis}}$  (kovalentne veze) = 40-250 kcal/mol,  $E_{\text{dis}}$  (nekovalentne veze) = 1-40 kcal/mol)<sup>45</sup>, ove nekovalentne veze kumulativno mogu doprinijeti stvaranju samoorganiziranih sustava. Alanin kao alifatski ostatak omogućuje hidrofobne interakcije. Aromatske kiseline poput fenilalanina stvaraju aromatske  $\pi$ - $\pi$  interakcije, hidrofobne su i planarne te su sklone stvaranju  $\beta$ -nabranih ploča što sve doprinosi nastajanju amiloidnih vlakana te zbog toga kratki peptidi poput FFA mogu poslužiti kao model za istraživanje amiloidne agregacije. Kratki sintetski peptidi poput FFA nazivaju se i "lomiteljima  $\beta$ -nabrane ploče" jer se vežu na središnju hidrofobnu regiju proteina, koja je zaslužna za amiloidnu agregaciju, i tako sprječavaju stvaranje strukture  $\beta$ -nabrane ploče pa samim time i agregaciju proteina. Osim jednostavne sinteze, prednosti FFA su i mogućnost modifikacije peptidnog slijeda te biokompatibilnost i biomimetička priroda.<sup>8</sup>



Slika 5. Struktura tripeptida FFA.

## 2.4. Protein IbpA

Protein IbpA je protein koji se nalazi u vanjskoj membrani bakterije *Escherichia coli*, a koji obavlja funkciju šaperona, odnosno sudjeluje u sprječavanju ireverzibilne agregacije termički-denaturiranih proteina.<sup>46</sup> Protein IbpA je, također, protein toplinskog šoka (eng. *heat-shock protein*) te dolazi do njegovog prekomjernog stvaranja u uvjetima stresa, primjerice pri visokim temperaturama te tako IbpA ima ulogu u zaštiti bakterijske stanice.<sup>46</sup> Protein IbpA ima 137 aminokiselina, a masa iznosi 15 774 Da<sup>47</sup> zbog čega je ovaj protein pogodan za analizu spektrometrijom masa. Također, zbog strukture koja sadrži  $\beta$ -nabrane ploče (slika 6) pogodan je za istraživanje vezanja potencijalnih markera na proteine.

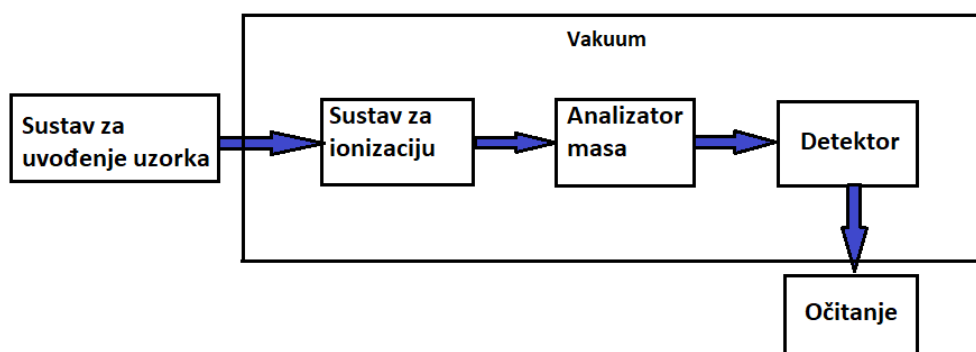


Slika 6. Trodimenzijska struktura proteina IbpA s istaknutim  $\beta$ -nabranim pločama i  $\alpha$ -uzvojnicom.<sup>47</sup>

## 2.5. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika u kojoj se molekule analita ioniziraju, a nastali se ioni u plinskoj fazi razdvajaju i detektiraju prema njihovom omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Osnovni dijelovi instrumenta su sustav za injektiranje, ionizacijski izvor (poput ESI izvora za uzorke u tekućem obliku ili MALDI (eng. *Matrix-assisted laser desorption/ionization*, matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem) izvora za krutine), analizator masa (poput trostrukog kvadrupola ili ionske stupice), detektor (najčešće ionski fotomultiplikator) te sustav za pretvorbu i očitavanje podataka. Prikaz sheme spektrometra masa nalazi se na shemi 1. Spektrometrija masa ima široku primjenu u strukturnoj analizi markera, ali i u proučavanju

nekovalentnih interakcija između markera i proteina na koji se vežu. Spektrometrija masa je vrlo osjetljiva analitička metoda za identificiranje i karakterizaciju molekula na temelju njihovog omjera mase i naboja te obrasca fragmentiranja. Tandemna spektrometrija masa vrlo je poželjna tehnika u analizi cijaninskih boja budući da dolazi do povećanja osjetljivosti kod MS/MS (tandemne spektrometrije masa) analize.



Shema 1. Shematski prikaz spektrometra masa.

### 2.5.1. Metoda ESI-MS

Metoda ESI-MS je trenutno jedna od najmoćnijih analitičkih metoda pomoću koje je moguće analizirati markere (u ovom slučaju organske boje), ali i razlikovati proteine tumorskog i zdravog tkiva te na taj način olakšati otkrivanje i razumijevanje procesa koji se događaju tijekom oboljenja.<sup>14</sup> Prednost ove metode je blaga ionizacija koja omogućuje analizu nekovalentnih interakcija između biomakromolekula i vezanog markera budući da ne dolazi do denaturacije proteina (nedestruktivna metoda) te je pokazano da su nekovalentne veze sačuvane u plinovitoj fazi spektrometra masa. Također, moguće je proučavati i različite konformacijske promjene tijekom vezanja protein-marker ili protein-ligand te mjesta vezanja markera na protein. Osim toga, ova metoda odlikuje se velikom brzinom analize i velikom osjetljivošću, pouzdanom detekcijom te su za analizu potrebne vrlo male količine uzorka (mikromolarne koncentracije), a analite je moguće određivati u pozitivnom i negativnom načinu snimanja. Također, razvojem pojedinih metoda spektrometrije masa, poput metode ESI-MS omogućeno je brzo određivanje raznih strukturnih efekata, poput utjecaja različitih supstituenata ili duljine polimetinskog mosta na svojstva cijaninskih boja.<sup>48</sup> Osim toga, ESI-MS je pogodna metoda za određivanje stehiometrije peptid-metalni ion, primjerice za određivanje broja FFA koji se veže na jedan ion cinka. Struktura željenog analita može se proučavati i izmjenom vodika deuterijem.

Kolizijom izazvana disocijacija (eng. *Collision induced dissociation*, CID) pogodna je metoda za strukturnu karakterizaciju analita. Promjenom kolizijske energije dolazi do fragmentiranja iona prekursora pri čemu nastaju ioni produkti – analiza MS/MS za primjerice kvadrupolni analizator masa. Ako se kao analizator masa koristi ionska stupica, ion prekursor se izolira u samoj stupici te je omogućena višestupanjska fragmentacijska analiza ( $MS^n$  analiza). U ovom postupku dolazi do sudaranja iona prekursora s molekulama inertnog plina, primjerice argona te pri fragmentacijskom minimumu, odnosno pri pogodnoj kolizijskoj energiji, dolazi do nastajanja iona produkta čijom je analizom moguće dobiti veliki broj informacija za proučavani analit poput strukturnih informacija, primjerice prisutnih funkcijskih skupina ili vrste cijepanja molekula.<sup>49</sup>

### 2.5.2. Metoda ICP-MS

Metoda ICP-MS je najčešća metoda za analizu koncentracija metala u uzorcima budući da je vrlo osjetljiva (za većinu elemenata analiza se može vršiti i kod koncentracija ispod 1 ppt), omogućuje multielementnu analizu većine elemenata iz periodnog sustava elemenata (dakle, višestruko skraćuje vrijeme analize), selektivna je i precizna te je potrebna mala količina uzorka za analizu. Temelji se na generiranju jednostruko nabijenih pozitivnih iona u plazmi koji se, nakon prolaska optičkog dijela, identificiraju na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) pomoću djelitelja masa i detektora. Kao separatori najčešće se koriste kvadrupolni separatori, a kao detektori ionski fotomultiplikatori.<sup>9</sup> Metodom ICP-MS mogu se analizirati uzorci u čvrstom stanju poput tumorskog tkiva, koje je prethodno potrebno razoriti, i tekući uzorci, koje je u slučaju organske ili biološke matrice potrebno razrijediti kiselinom vrlo visoke kemijske čistoće.<sup>19</sup> Kod pripreme uzoraka za analizu iznimno je bitno raditi u „čistoj“ sobi (eng. *clean room*) te je potrebno koristiti kiseline vrlo visoke čistoće.<sup>19</sup> Također, potrebno je, prije same analize, detaljno počistiti cijevi instrumenta.<sup>19</sup> Posuđe koje se koristi kod pripreme i analize najčešće je plastično (polietilen, PE i polipropilen, PP) ili od kvarca i teflona (stakleno posuđe može izazvati onečišćenje uzorka budući da može sadržavati pojedine metale).<sup>19</sup> Za ultračisto uzorkovanje i skladištenje uzoraka prije analize preporučeno je korištenje perfluoroalkoksi (PFA) viala ispranih ultračistom dušičnom kiselinom i vodikovim peroksidom u nekoliko navrata.<sup>29</sup> Svi ovi koraci izuzetno su važni za zaštitu uzoraka od onečišćenja pojedinim metalom.<sup>19,29</sup>

## § 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Standardne kemikalije

Acetonitril (*p.a.*, Merck, Deutschland), amonijev acetat (*p.a.*, WVR, Deutschland), amonijev hidrogenkarbonat (*p.a.*, Sigma-Aldrich, USA), voda pročišćena MiliQ sustavom do 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup> (Merck, Milipore), tetraetilamonij (*p.a.*, Sigma-Aldrich, USA), mravlja kiselina (*p.a.*, Sigma-Aldrich, USA), cinkov klorid (*p.a.*, Kemika, Hrvatska), bakrov (II) sulfat pentahidrat (*p.a.*, Kemika, Hrvatska), metanol (*p.a.*, BDH Prolabo, GB), etanol-d<sub>6</sub> (*p.a.*, Sigma-Aldrich, USA).

#### 3.1.2. Ostale kemikalije i materijali

- Otopina za razrjeđenje (*p.p.s.*):  $c = 0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$  etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA +  $c = 0,7 \text{ mmol dm}^{-3}$  amonijak +  $w/v = 0,07 \%$  triton X-100 +  $\gamma = 2,0 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$  interni standard (otopina germanija, rodija, lutecija i iridija)
- Cerebrospinalni likvor (pacijenata Kliničkog bolničkog centra Zagreb)
- Referentne otopine (*p.p.s.*): Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Serum Level I i Level II (SERO AS, Norway), ClinChek ® Serum Control Level I i Level II (RECIPE, Deutschland), ClinChek ® Plasma Control Level I i Level II (RECIPE, Deutschland)
- Kalibracijska otopina *Pierce LTQ ESI Positive ion* (*p.p.s.*, ThermoFisher Scientific)
- Kalibracijska otopina *Pierce ESI Negative ion* (*p.p.s.*, ThermoFisher Scientific)
- Otopina za ispiranje: 1:1 = metanol (*p.a.*, POCH S.A., Poland) : destilirana voda
- Protein IbpA (derivat iz bakterije *E. coli*)
- Marker 1: sol 5-bromo supstituirane boje tiazol-narančasto s jodidnim anionom (eng. *thiazole orange*, TO) (sintetiziran na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za



biomolekularne interakcije i spektroskopiju), IUPAC naziv: 5-bromo-3-metil-2-[(1-metil-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)-metil]-1,3-benzotiazol-3-ij jodid

- Marker 3: konjugat markera 1 i pirena - povezani triazol-peptidnim linkerom (sintetiziran na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju), IUPAC naziv: 5-bromo-2-({1-[4-(4-{3-metoksi-3-okso-2-[4-(piren-1-il)butanamido]-propil})-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)butil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden}-metil)-3-metil-1,3-benzotiazol-3-ij jodid
- Fenilalanil-fenilalanil-alanin (FFA, sintetiziran na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za supramolekularnu kemiju prema literaturnom izvoru: T. Pospišil, Doktorski rad)<sup>8</sup>

## 3.2. Instrumenti

### 3.2.1. Spektrometar masa Agilent 7500cx uz induktivno spregnutu plazmu

Mjerenja masenih koncentracija metala u cerebrospinalnom likvoru provedena su na spektrometru masa Agilent 7500cx uz induktivno spregnutu plazmu (proizvođača Agilent Technologies Inc., Japan). Glavni dijelovi ovog uređaja su: sustav za unos uzoraka (eng. *autosampler*), sustav za ionizaciju s induktivno spregnutom plazmom, kvadrupol kao analizator masa i dinodni detektor s dva načina rada. Najveća prednost ovog instrumenta je brzina analize i mogućnost mjerenja koncentracija analita u ppt.

### 3.2.2. Spektrometar masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom

Mjerenja za cijaninske boje (marker 1 i marker 3) te protein IbpA i njihovo potencijalno vezanje provedena su na spektrometru masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom uz pozitivnu i negativnu ionizaciju elektroraspršenjem (proizvođača ThermoFisher SCIENTIFIC, USA). Ovaj spektrometar masa visoke osjetljivosti sastoji se od injekcije (eng. *syringe*) za ubrizgavanje tekućih (otopljenih) uzoraka, sustava za blagu ionizaciju elektroraspršenjem (ESI), 2D linearne kvadrupolne ionske stupice kao analizatora masa i detektora s dvije konverzijske dionode te ima mogućnost MS<sup>n</sup> analize (disocijacijom izazvanom kolizijom, CID)

što uvelike pospješuje strukturnu karakterizaciju analita. Kao kolizijski plin korišten je dušik 99 %-tne čistoće, a raspon masa za ovaj instrument jest  $m/z = 15-4000$ . Osim ESI, sustav za ionizaciju ovog instrumenta može biti HESI (eng. *heated electrospray ionization*, ionizacija elektroraspršenjem uz grijanje), APCI (eng. *atmospheric pressure chemical ionization*, kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku) i APPI (eng. *atmospheric pressure photoionization*, fotoionizacija pri atmosferskom tlaku), a za strukturnu karakterizaciju osim CID može se koristiti i PQD (eng. *pulsed „q“ dissociation*). Za prikaz struktura korišten je program PerkinElmer ChemDraw Professional (inačica: 16.0.0.82 (68)).

### 3.2.3. Spektrometar masa Agilent 6420 s trostrukim kvadrupolom

Mjerenja za tripeptid FFA i vezanje metala (bakra i cinka) s FFA provedena su na spektrometru masa Agilent 6420 s trostrukim kvadrupolom uz pozitivnu i negativnu ionizaciju elektroraspršenjem (proizvođača Agilent Technologies Inc., USA). Ovaj spektrometar masa vezan je s HPLC (eng. *High performance liquid chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) Agilent 1200 Series sustavom (koji je u ovom radu poslužio za unos uzoraka u tekućem stanju), a ostali dijelovi spektrometra masa su: sustav za blagu ionizaciju elektroraspršenjem (ESI), trostruki kvadrupol kao analizator masa i detektor s visokoenergijskim konverzijskim dinodama. Osim toga, spektrometar masa Agilent 6420 ima mogućnost analize MS/MS (disocijacijom izazvanom kolizijom, CID). Kao kolizijski plin korišten je dušik 99 %-tne čistoće, a raspon masa za ovaj instrument jest  $m/z = 5-2250$ . Osim ESI sustava, sustav za ionizaciju ovog instrumenta može biti i APCI. Za prikupljanje i obradu podataka korišten je AgilentMassHunter software te OriginPro 7.5. Za prikaz struktura korišten je program PerkinElmer ChemDraw Professional (inačica: 16.0.0.82 (68)).

## 3.3. Metode

### 3.3.1. Analiza cerebrospinalnog likvora spektrometrom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS)

Za određivanje masenih koncentracija pojedinih metala u uzorcima cerebrospinalnog likvora pacijenata Kliničkog bolničkog centra Zagreb korišten je spektrometar masa Agilent 7500cx uz

induktivno spregnutu plazmu pod radnim uvjetima navedenim u tablici 1. Uzorci cerebrospinalnog likvora razrijeđeni su 20 puta na način da je  $V = 0,150$  mL cerebrospinalnog likvora pomiješano s  $V = 2,85$  mL otopine za razrjeđenje na Vortexu (prema tablici 2). Zatim su provedena mjerenja na spektrometru masa uz induktivno spregnutu plazmu. Nakon prikupljanja podataka statistička analiza provedena je koristeći *Mann-Whitney U* test (Statistica for Windows software, version 12.0; StatSoft, Inc., Tulsa, USA), a vrijednosti koncentracija metala u uzorcima cerebrospinalnog likvora prikazane su u  $\text{mg dm}^{-3}$  te  $\mu\text{g dm}^{-3}$ .

Tablica 1. Radni parametri instrumenta ICP-MS za analizu elemenata u uzorcima cerebrospinalnog likvora.

| Parametri                            | Plin   |   |                  |
|--------------------------------------|--------|---|------------------|
|                                      | argon  | helij   | vodik            |
| RF jačina                            | /      | 1550 W  | /                |
| RF poklapanje                        | /      | 1,72 V  | /                |
| Protok plina plazme                  | /      | 15 L/min  | /                |
| Protok <i>Make up</i> plina          | /      | 0,14 L/min  | /                |
| Protok plina nosioca                 | /      | 1,02 L/min  | /                |
| Pumpa raspršivača                    | /      | 0,08 rps  | /                |
| Protok kolizijskog/reakcijskog plina | /      | 3,4 mL/min  | 3,4 mL/min       |
| Napon leće 1                         | 0 V    | 0,9 V   | 0,9 V            |
| Napon leće 2                         | -131 V | -144 V  | -131 V           |
| Raspršivač (eng. <i>nebulizer</i> )  | /      | <i>MicroMist</i> , kvarc  | /                |
| Komora za sprejanje                  | /      | <i>Scott-type</i> kvarc, hladena na 2°C   | /                |
| Konus uzorka                         | /      | nikal   | /                |
| <i>Skimmer</i> konus                 | /      | nikal   | /                |
| Mjereni izotopi                      | /      | $^{24}\text{Mg}$ , $^{43}\text{Ca}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{63}\text{Cu}$ ,<br>$^{68}\text{Zn}$ | $^{54}\text{Fe}$ |

Tablica 2. Priprema otopina cerebrospinalnog likvora za analizu metodom ICP-MS.

|                                   | otopine |  |   |                                 |                                  |                                  |                                   |
|-----------------------------------|---------|--|---|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
|                                   | 1       | 2                                      | 3                                       | 4                               | 5                                | 6                                | 7                                 |
| $V$ (CSF) / mL                    | 0,125   | 0,125                                  | 0,125                                   | 0,125                           | 0,125                            | 0,125                            | 0,125                             |
| $V$ (otopine za razrjeđenje) / mL | 2,85    | 2,65                                   | 2,65                                    | 2,65                            | 2,65                             | 2,65                             | 2,65                              |
| $V$ (referentne otopine) / mL     | 0,00    | 0,20                                   | 0,20                                    | 0,20                            | 0,20                             | 0,20                             | 0,20                              |
| Referentna otopina                | /       | Seronorm™ Trace Elements Serum Level I | Seronorm™ Trace Elements Serum Level II | ClinChek® Serum Control Level I | ClinChek® Serum Control Level II | ClinChek® Plasma Control Level I | ClinChek® Plasma Control Level II |

### 3.3.2. Analiza cijaninskih boja spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS)

Prije same analize cijaninskih boja spektrometrom masa LTQ XL™ s linearnom ionskom stupicom, otopinom metanola isprane su i počišćene cjevčica za prijenos (eng. *transfer tube*) te injekcija za unos uzoraka. Sljedeći je korak kalibracija instrumenta koristeći kalibracijsku otopinu *Pierce LTQ ESI Positive ion* za pozitivan način ionizacije, uz parametre instrumenta prikazane u tablici 3. Tijekom kalibracije u prozoru *Tune Plus* sustava za očitavanje podataka potrebno je pratiti oko 80 parametara (poput napona spreja ESI izvora) do trenutka zadovoljavajućih uvjeta za rad instrumenta (u prozoru *Tune Plus* prikazane su zelene kvačice uz svaki parametar, RSD (relativna standardna devijacija, eng. *relative standard deviation*) iznosi između 2% i 10%). Kalibracija se provede za mjerenja ITMS (spektrometrija masa s ionskom stupicom, eng. *ion trap mass spectrometry*) i mjerenja FTMS (spektrometrija masa s Fourierovim transformacijama, eng. *Fourier-transform mass spectrometry*). Isti se postupak provede za kalibraciju u negativnom načinu ionizacije uz kalibracijsku otopinu *Pierce ESI Negative ion*. Nakon provedene kalibracije pohrane se svi parametri za mjerenja ITMS i FTMS.

Tablica 3. Parametri za kalibraciju pozitivnog i negativnog načina ionizacije spektrometra masa LTQ XLTM s linearnom ionskom stupicom za analizu cijaninskih boja.

| Parametri                         | Vrijednosti              |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Protok                            | 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ |
| <i>m/z</i> raspon                 | 200-2000                 |
| Izolacijska širina ( <i>m/z</i> ) | 1                        |
| Kolizijska energija (eV)          | 0                        |
| Vrijeme aktiviranja               | 30 ms                    |
| Mikroskenovi                      | 3                        |

Sljedeći je korak priprema otopina pufera za cijaninske boje (odnosno marker 1 i marker 3). Najprije se priredi otopina amonijevog acetata ( $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 0,015 \text{ mol dm}^{-3}$ ) te se u  $V(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 50 \mu\text{L}$  dodaju acetonitril ( $w/v = 5 \%$ ) i voda ( $V(\text{CH}_3\text{CN}) = 500 \mu\text{L}$  i  $V(\text{H}_2\text{O}) = 500 \mu\text{L}$ ) te se otopina pufera promiješa na Vortexu i pripreme se otopina markera 1 ( $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) i otopina markera 3 ( $c = 17,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Zatim se isperu cjevčica za prijenos te injekcija za unos uzoraka otopinom za ispiranje (1:1 = metanol : destilirana voda). Namjesti se protok na  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  te se mali dio uzorka analizira u svrhu pronalaženja radnih parametara pogodnih za dobivanje kvalitetnih spektara masa, odnosno za dobru stabilnost i intenzitete signala. Radni parametri spektrometra masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom pogodni za dobivanje kvalitetnih spektara markera 1 i 3 prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Radni parametri spektrometra masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom za analizu cijaninskih boja (vrijednosti +/- mijenjane su za pozitivan, odnosno negativan način ionizacije).

| Parametri  | Vrijednosti |
|--|-------------|
| Temperatura grijanja ( $^{\circ}\text{C}$ )                      | 60          |
| Protok plina omotača (arb) (eng. <i>Sheath gas</i> )             | 4           |
| Protok pomoćnog plina nosioca (arb) (eng. <i>Auxiliary gas</i> ) | 5           |
| Naboj spreja (kV)  | 5           |
| Temperatura kapilare ( $^{\circ}\text{C}$ )                      | 250         |
| Naboj kapilare (V)   | (+/-) 50    |
| Leće (V) (eng. <i>Tube lens</i> )                                | (+/-) 80    |

Nakon pronalaska pogodnih radnih parametara provedu se mjerenja za marker 1 i marker 3. Provedeno je čišćenje cjevčice za prijenos te injekcije za unos uzoraka otopinom za ispiranje (1:1 = metanol : destilirana voda). Zatim je otopina markera 1 stavljena u injekciju spektrometra masa te su provedena mjerenja ITMS i FTMS s postavkama instrumenta navedenim u tablici 4 i tablici 5. Provedena su mjerenja za pozitivnu ( $ES^+$ ) i negativnu ( $ES^-$ ) ionizaciju elektroraspršenjem, a prilikom fragmentiranja ( $MS^n$  analize) korištena je kolizijska energija (CE, eng. *collision energy*) u rasponu od 30 eV do 100 eV.

Nakon ispiranja i čišćenja, mjerenja ITMS i FTMS za marker 3 provedena su za pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem ( $ES^+$ ) uz parametre instrumenta navedene u tablici 4 i tablici 6. Fragmentiranje (odnosno  $MS^n$  analiza) nije provedeno za marker 3.

Tablica 5. Postavke spektrometra masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom za analizu markera 1.

| Parametri                                  | Vrijednosti |
|--|-------------|
| Aktivacijski tip                           | CID         |
| Izolacijska širina ( $m/z$ )               | 1           |
| Aktivacijski Q                             | 0,25        |
| Kolizijska energija za MS analizu (eV)     | 0,0         |
| Kolizijska energija za $MS^n$ analizu (eV) | 30-100      |
| Aktivacijsko vrijeme (ms)                  | 30          |
| Protok ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )          | 5           |
| $m/z$ raspon za MS analizu                 | 50-2000     |
| $m/z$ raspon za $MS^n$ analizu             | 75-600      |

Tablica 6. Postavke spektrometra masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom za analizu markera 3.

| Parametri                         | Vrijednosti |
|-----------------------------------|-------------|
| Aktivacijski tip                  | CID         |
| Izolacijska širina ( $m/z$ )      | 1           |
| Aktivacijski Q                    | 0,25        |
| Aktivacijsko vrijeme (ms)         | 30          |
| Protok ( $\mu\text{L min}^{-1}$ ) | 5           |
| $m/z$ raspon za MS analizu        | 50-2000     |

### 3.3.3. Analiza proteina IbpA i vezanja cijaninskih boja spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS)

Analiza proteina IbpA provedena je pomoću spektrometra masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom. Nakon ispiranja cjevčice za prijenos te injekcije za unos uzoraka otopinom za ispiranje (1:1 = metanol:destilirana voda), provede se kalibracija instrumenta prije mjerenja proteina IbpA koristeći kalibracijsku otopinu *Pierce LTQ ESI Positive ion* za pozitivan način ionizacije, uz parametre instrumenta prikazane u tablici 7. Kalibracija se provede za mjerenja ITMS i FTMS. Nakon dobivanja zadovoljavajućih parametara polu-automatske kalibracije, sprema se dobiveni parametri (statistika kalibracije) za mjerenja ITMS i FTMS.

Tablica 7. Parametri za kalibraciju pozitivnog načina ionizacije spektrometra masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom za analizu proteina IbpA.

| Parametri                         | Vrijednosti               |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Protok                            | 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ |
| <i>m/z</i> raspon                 | 150-2000                  |
| Izolacijska širina ( <i>m/z</i> ) | 1                         |
| Kolizijska energija (eV)          | 0                         |
| Vrijeme aktiviranja               | 30 ms                     |
| Mikroskenovi                      | 3                         |

Zatim se pripreme otopina proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} \approx 8$ ) i otopina proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} \approx 6$ ) prema tablici 8. Nadalje, isperu se cjevčica za prijenos te injekcija za unos uzoraka otopinom za ispiranje (1:1 = metanol : destilirana voda). Namjesti se protok na  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  te se mali dio uzorka analizira u svrhu pronalaženja radnih parametara pogodnih za dobivanje kvalitetnih spektara masa. Radni parametri spektrometra masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom pogodni za dobivanje spektara proteina IbpA prikazani su u tablici 9.

Tablica 8. Priprema otopina proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) pri  $\text{pH} \approx 8$  i  $\text{pH} \approx 6$ .

| Spojevi za pufer   | $V / \mu\text{L}$   |   |
|--|---|---|
|  | protein IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ )<br>$\text{pH} \approx 8$ | protein IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ )<br>$\text{pH} \approx 6$ |
| acetonitril<br>$w/v (\text{CH}_3\text{CN}) = 5 \%$                                     | 500   | 500   |
| amonijev hidrogenkarbonat<br>$c (\text{NH}_4\text{HCO}_3) = 0,015 \text{ mol dm}^{-3}$ | 100   | /   |
| tetraetilamonij  | 3   | /   |
| voda   | 9500  | 9500  |
| mravlja kiselina<br>$w/v (\text{HCOOH}) = 0,1 \%$                                      | /   | 10  |

Tablica 9. Radni parametri spektrometra masa LTQ XL<sup>TM</sup> s linearnom ionskom stupicom za analizu proteina IbpA.

| Parametri  | Vrijednosti |
|--|-------------|
| Temperatura grijanja ( $^{\circ}\text{C}$ )                      | 60          |
| Protok plina omotača (arb) (eng. <i>Sheath gas</i> )             | 10          |
| Protok pomoćnog plina nosioca (arb) (eng. <i>Auxiliary gas</i> ) | 5           |
| Naboj spreja (kV)  | 4           |
| Temperatura kapilare ( $^{\circ}\text{C}$ )                      | 250         |
| Naboj kapilare (V)   | 80          |
| Leće (V) (eng. <i>Tube lens</i> )                                | 150         |

Nakon čišćenja otopinom metanola, provedu se mjerenja FTMS pripremljene otopine proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} \approx 6$ ), a zatim, nakon čišćenja, i mjerenja FTMS za otopinu proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} \approx 8$ ) za pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem ( $\text{ES}^+$ ) u svrhu analize strukture proteina. Mjerenja su provedena uz parametre spektrometra masa navedene u tablici 9 i tablici 10.



Tablica 10. Postavke spektrometra masa LTQ XL™ s linearnom ionskom stupicom za analizu proteina IbpA.

| Parametri                         | Vrijednosti |
|-----------------------------------|-------------|
| Aktivacijski tip                  | CID         |
| Izolacijska širina ( $m/z$ )      | 3           |
| Aktivacijski Q                    | 0,4         |
| Aktivacijsko vrijeme (ms)         | 30          |
| Protok ( $\mu\text{L min}^{-1}$ ) | 10          |
| $m/z$ raspon                      | 200-4000    |

U svrhu analize potencijalnog vezanja markera 1 i markera 3 na protein IbpA pomiješane su na Vortexu otopine markera 1 i proteina IbpA u omjeru 1:2 te otopine markera 3 i proteina IbpA u omjeru 1:3. Zatim su priređene otopine ostavljene stajati 10 minuta. Između svakog mjerenja provedeno je ispiranje cjevčice i injekcije otopinom metanola. Mjerenja FTMS su provedena za pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem ( $\text{ES}^+$ ) prema tablici 9 i tablici 10.

#### 3.3.4. Analiza tripeptida FFA i vezanja s $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{Zn}^{2+}$ spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS)

Analiza tripeptida fenilalanil-fenilalanil-alanin (FFA) provedena je na instrumentu Agilent 6420 spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom uz pozitivnu ( $\text{ES}^+$ ) i negativnu ( $\text{ES}^-$ ) ionizaciju elektroraspršenjem. Najprije je priređena otopina FFA ( $c = 1,88 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) u metanolu, a zatim su provedena mjerenja s parametrima navedenim u tablici 11. Prilikom fragmentiranja (odnosno, analize MS/MS) korištene kolizijske energije iznosile su  $\text{CE} = 5 \text{ eV}$ .

Za analizu vezanja tripeptida FFA s  $\text{Cu}^{2+}$  ili  $\text{Zn}^{2+}$  priređene su najprije otopina bakrovog (II) sulfata pentahidrata u metanolu ( $c = 1,88 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i otopina cinkovog (II) klorida u metanolu ( $c = 1,88 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), a zatim su priređene otopina FFA s  $\text{Cu}^{2+}$  (omjer 1:3) te otopina FFA s  $\text{Zn}^{2+}$  (omjer 1:2). Analiza je provedena uz pozitivnu ( $\text{ES}^+$ ) i negativnu ( $\text{ES}^-$ ) ionizaciju elektroraspršenjem prema parametrima navedenim u tablici 11. Prilikom fragmentiranja (odnosno, analize MS/MS) korištene kolizijske energije iznosile su  $\text{CE} = 5 \text{ eV}$ .

Tablica 11. Parametri spektrometra masa Agilent 6420 s trostrukim kvadrupolom za analizu tripeptida FFA u metanolu.

| Parametri                                | Vrijednosti |
|--|-------------|
| Aktivacijski tip                         | CID         |
| <i>m/z</i> raspon                        | 10–2250     |
| Izolacijska širina ( <i>m/z</i> )        | 1           |
| Kolizijska energija (MS/MS analiza) (eV) | 5           |
| Energija ionizacije (V)                  | 70          |
| Protok (mL min <sup>-1</sup> )           | 0,2         |
| Vrijeme skeniranja (ms)                  | 500         |

Mjerenja tripeptida FFA provedena su i za FFA otopljen u deuteriranoj otopini etanola s vremenskim razmacima od  $t = 0, 15, 45$  i  $60$  minuta uz pozitivnu ( $ES^+$ ) i negativnu ( $ES^-$ ) ionizaciju elektroraspršenjem. Mjerenja su provedena prema parametrima navedenim u tablici 12. Pri istim je uvjetima provedeno mjerenje FFA u deuteriranoj otopini etanola uz dodatak  $V = 100 \mu\text{L}$  cinkovog (II) klorida.

Tablica 12. Parametri spektrometra masa Agilent 6420 s trostrukim kvadrupolom za analizu tripeptida FFA u deuteriranom etanolu.

| Parametri                         | Vrijednosti |
|-----------------------------------|-------------|
| Aktivacijski tip                  | CID         |
| <i>m/z</i> raspon                 | 10–2250     |
| Izolacijska širina ( <i>m/z</i> ) | 1           |
| Energija ionizacije (V)           | 70          |
| Protok (mL min <sup>-1</sup> )    | 0,2         |
| Vrijeme skeniranja (ms)           | 500         |

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

Brojna istraživanja provedena su te se još uvijek provode na području neuroloških poremećaja. Budući da postoji neprekidni porast u broju starije populacije, vidljiv je, nažalost, i porast u broju oboljelih od neke neurodegenerativne bolesti, a uz to i porast od nekog oblika tumora mozga. S obzirom da još uvijek ne postoji način ranog otkrivanja tih bolesti, u ovom su se radu željela proučiti osnovna svojstva markera koji bi potencijalno mogli sudjelovati u ranijem otkrivanju navedenih bolesti na način da prepoznaju specifične biomarkere koji se ispuštaju iz mozga u cerebrospinalni likvor tijekom razvoja pojedine bolesti mozga. Također, proučavana su i svojstva tripeptida FFA, koji se pokazao kao dobar model za istraživanje procesa agregacije proteina te kao potencijalni inhibitor stvaranja agregata (plakova) budući da bi svojim vezanjem mogao spriječiti nastanak  $\beta$ -nabranih ploča čijim slaganjem i povezivanjem nekovalentnim vezama dolazi do agregacije. Uz to, željelo se proučiti kakav utjecaj biološka matrica može imati na ovaj tripeptid pa je provedena analiza vezanja FFA i pojedinih metala koji su prisutni u cerebrospinalnom likvoru. Osim toga, biološka matrica (odnosno cerebrospinalni likvor) proučavana je u svrhu pronalaženja masenih koncentracija pojedinih metala koje, prema već ranije provedenim istraživanjima, također mogu pridonijeti u ranijem otkrivanju bolesti mozga, poput Alzheimerove bolesti i multiple skleroze. Metoda MS je odabrana zbog osjetljivosti i mogućnosti analize različitih uzoraka primjenom odgovarajuće MS tehnike. U ovom radu su korištene ICP-MS i ESI-MS. Snimanja su provedena u *native* MS uvjetima u oba moda ( $ES^+$  i  $ES^-$ ).

### 4.1. Analiza cerebrospinalnog likvora spektrometrom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS)

U ovom su radu mjerene ukupne masene koncentracije pojedinih metala u cerebrospinalnom likvoru, a mjerenja su važna iz sljedećih razloga: 1. pokazano je kako se koncentracije pojedinih metala mogu iskoristiti kao indikatori raznih neuroloških poremećaja budući da promjene u homeostazi metala mogu pridonijeti razvoju neurodegenerativnih bolesti, 2. radi usporedbe podataka s već provedenim istraživanjima (budući da još uvijek ne postoje uniformni podaci za povezivanje koncentracije nekog metala i pojedine neurodegenerativne bolesti), 3. u svrhu

daljnjih analiza u kojima će se ispitivati selektivnost i kompeticija između proteina u cerebrospinalnom likvoru i dodanog markera za pojedini metal. Rezultati analize prikazani su u tablici 13.

Ne postoje uniformni podaci koji bi povezali koncentracije metala u cerebrospinalnom likvoru s pojedinom bolesti budući da rezultati mogu varirati pod utjecajem kontaminacije pojedinim metalom tijekom uzorkovanja i analize, načina prehrane i stila života pacijenata te zbog različitih načina analize (primjerice korištenje različitih instrumenata). Jedan od razloga sigurno je i manjak saznanja o svim procesima koji se događaju u mozgu i cerebrospinalnom likvoru, a u koje su uključeni metali poput magnezija, cinka, željeza itd. Nadalje, vrlo je važno proučiti biološku matricu ciljanog sustava, u ovom slučaju cerebrospinalni likvor, koji pobliže prikazuje uvjete koji se nalaze u mozgu, budući da su u većini slučajeva interakcije matrice i istraživanih markera i/ili peptidomimetika (koji bi se mogli koristiti u svrhu ranijeg otkrivanja ili čak kao inhibitori razvoja pojedine bolesti mozga) neizbježne.

Tablica 13. Masene koncentracije metala u cerebrospinalnom likvoru pacijenata Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

| Uzorak    | Mg   | Ca   | Fe   | Cu   | Zn   | Mn   | Dijagnoza                 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|---------------------------|
|           | mg/L | mg/L | µg/L | µg/L | µg/L | µg/L |                           |
| uzorak 1  | 26   | 41   | 18   | 11   | 169  | 0.34 | Demijelinizirajuća bolest |
| uzorak 2  | 26   | 42   | 11   | 6    | <2   | 0.51 | Demijelinizirajuća bolest |
| uzorak 3  | 27   | 40   | 12   | 9    | 82   | 0.57 | Demijelinizirajuća bolest |
| uzorak 4  | 28   | 40   | 27   | 11   | 138  | 0.56 | Demijelinizirajuća bolest |
| uzorak 5  | 25   | 43   | 31   | 13   | 101  | 1.30 | Multipla skleroza         |
| uzorak 6  | 27   | 42   | 19   | 11   | 13   | 0.55 | Multipla skleroza         |
| uzorak 7  | 28   | 42   | 13   | 6    | 10   | 0.61 | Multipla skleroza         |
| uzorak 8  | 26   | 41   | 25   | 13   | 18   | 0.74 | Uredan nalaz              |
| uzorak 9  | 26   | 38   | 24   | 9    | 3    | 0.60 | Uredan nalaz              |
| uzorak 10 | 27   | 37   | 91   | 10   | 146  | 0.82 | Uredan nalaz              |
| uzorak 11 | 28   | 42   | 35   | 10   | 2    | 0.84 | Uredan nalaz              |
| uzorak 12 | 30   | 35   | 25   | 12   | 32   | 0.46 | Uredan nalaz              |
| uzorak 13 | 28   | 45   | 20   | 11   | 83   | 1.20 | Uredan nalaz              |
| uzorak 14 | 28   | 43   | 20   | 17   | 239  | 0.70 | Uredan nalaz              |
| uzorak 15 | 26   | 42   | 23   | 12   | 59   | 1.48 | Uredan nalaz              |

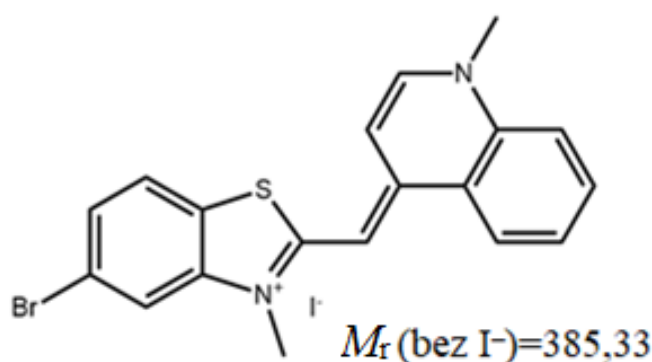
Iz tablice 13 je vidljivo kako su vrijednosti masenih koncentracija ukupnog metala unutar pojedinih skupina pacijenata dosta različite te se na temelju ovih rezultata ne može donijeti zaključak o konkretnim područjima vrijednosti koncentracija koje bi bile indikator neurodegenerativnih bolesti poput demijelinizirajućih bolesti ili multiple skleroze. Također, iz tablice se može zaključiti kako su vrijednosti masenih koncentracija kalcija i magnezija za demijelinizirajuće bolesti i multiplu sklerozu unutar područja vrijednosti masenih koncentracija za pacijente s urednim nalazima cerebrospinalnog likvora. Slično možemo opaziti i kod vrijednosti masenih koncentracija bakra i mangana, s nižim vrijednostima masenih koncentracija za pojedine pacijente s demijelinizirajućom bolesti i multiplom sklerozom. Nadalje, vrijednosti masenih koncentracija željeza za demijelinizirajuću bolest nešto su niže u odnosu na iste vrijednosti za pacijente s urednim nalazom, dok su za pacijente s multiplom sklerozom te vrijednosti niže ili u području vrijednosti masenih koncentracija pacijenata s urednim nalazom. Takvi su podaci u skladu s prijašnjim istraživanjima koja ukazuju na to da snižene koncentracije željeza (koji je potreban za razvoj mijelinske ovojnice) mogu utjecati na razvoj demijelinizirajućih bolesti, među kojima je i multipla skleroza. Najveća odstupanja vidljiva su za vrijednosti masenih koncentracija cinka, što onemogućuje donošenje zaključka o utjecaju poremećaja homeostaze ovog metala na navedene bolesti. Mogući razlog velikih odstupanja u vrijednostima masenih koncentracija cinka jesu značajni utjecaji imunološkog sustava pojedinog pacijenta, stresa i raznih infekcija na preraspodjelu cinka unutar organizma.

Uspoređujući rezultate prikazane u tablici 13 s rezultatima iz drugih literaturnih izvora<sup>50-52</sup>, vidljivo je da su vrijednosti masenih koncentracija metala za pojedine bolesti te kontrolne vrijednosti (odnosno vrijednosti masenih koncentracija pacijenata s urednim nalazima cerebrospinalnih likvora) uglavnom slične ili malo povišene u odnosu na iste vrijednosti iz tablice 13 što može potvrditi kako niže vrijednosti masenih koncentracija željeza kod demijelinizirajućih bolesti i multiple skleroze mogu utjecati na razvoj i/ili otkrivanje ovih bolesti.

## 4.2. Analiza cijaninskih boja spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS)

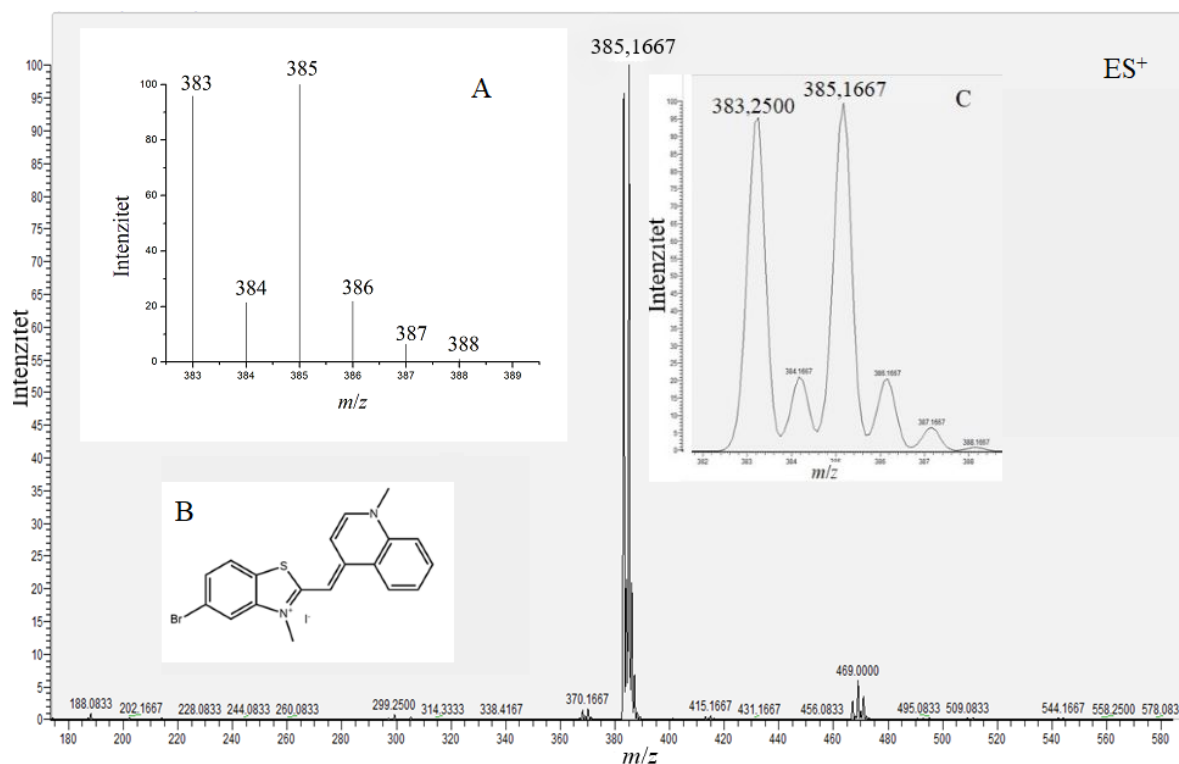
Još uvijek ne postoje markeri koji bi omogućili i olakšali rano otkrivanje pojedine bolesti mozga poput tumora ili Alzheimerove bolesti. Cijaninske boje imaju široku primjenu u različitim područjima te su se pokazale i kao potencijalno rješenje za navedeni problem. Iz tog je razloga provedena analiza cijaninskih boja (markera 1 i 3; strukture prikazane na slikama 7 i 13) spektrometrom masa LTQ XLTM s linearnom ionskom stupicom prema radnim uvjetima navedenim u odjeljku 3.3.2. Marker 1 i 3 sintetizirani su u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković (sinteza provedena prema literaturnom izvoru: I. Piantanida i sur.)<sup>53</sup>, pri čemu je marker 1 zapravo sol 5-bromo supstituirane boje tiazol-narančasto s jodidnim anionom. Marker 3 je konjugat markera 1 i pirena (povezani linkerom preko kinolinskog dijela markera 1, linker = triazol-peptidna veza). Provedena su mjerenja ITMS (spektrometrija masa s ionskom stupicom, eng. *ion trap mass spectrometry*, pri čemu željeni ion ostaje u stupici dok se svi ostali ioni uklanjaju za MS<sup>n</sup> analizu) i mjerenja FTMS (spektrometrija masa s Fourierovim transformacijama, eng. *Fourier-transform mass spectrometry*, pri čemu se svi ioni u ćeliji pobuđuju simultano, a signal u vremenskoj domeni Fourierovim transformacijama se prevodi u signal u frekvencijskoj domeni te zatim u signal masa).

### 4.2.1. Marker 1

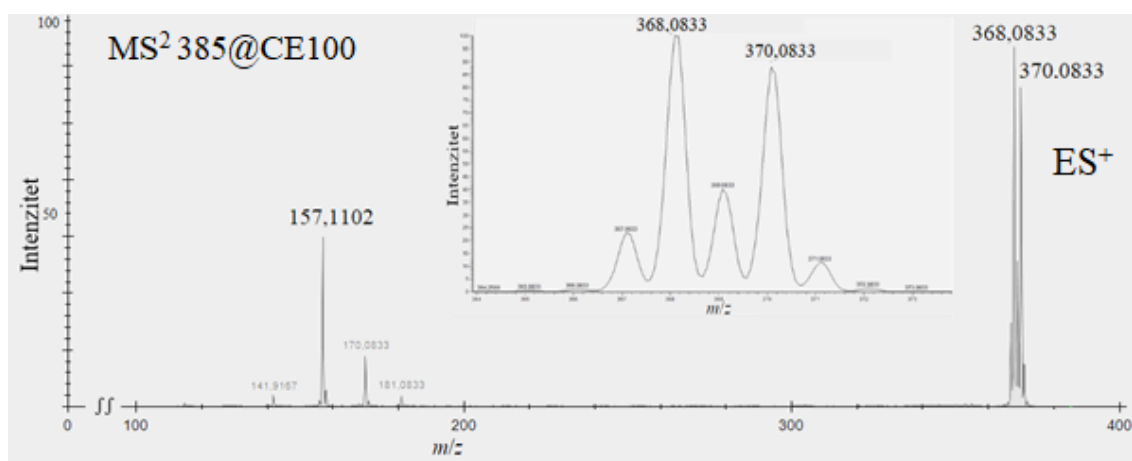


Slika 7. Struktura markera 1.

Spektri MS i MS<sup>n</sup> pozitivnog načina ionizacije markera 1 prikazani su na slikama 8, 9, 10, 11 i 12. Cjelokupni spektri ITMS i FTMS markera 1 (slike 8 i D1) prikazuju intenzivne signale molekuskog iona s izotopnom raspodjelom broma što je jedan od dokaza da spektri odgovaraju strukturi markera 1 koji sadrži brom (masa markera 1 računata je prema stabilnom izotopu <sup>81</sup>Br,  $u = 80,916$ ). Također, usporedbom teoretskog spektra markera 1 (slika 8, umetak A) s razvučenim eksperimentalnim spektrom (slika 8, umetak C) može se uvidjeti podudaranje u izotopnoj raspodjeli i intenzitetima signala što je dodatna potvrda da spektar dobiven eksperimentalno (slika 8) odgovara markeru 1. Cjelokupni spektar ITMS negativnog načina ionizacije prikazan je na slici D2. Na spektru negativnog načina ionizacije mogu se opaziti dva signala: intenzivni signal  $m/z = 127$  koji odgovara jodu te signal  $m/z = 383$  koji odgovara markeru 1. Na slici D3 prikazan je uvećani spektar ITMS<sup>2</sup> ES<sup>+</sup> markera 1 s istaknutim signalom fragmenta  $m/z = 157$  (intenzivni signal, bez izotopne raspodjele broma) prema kojem je moguće zaključiti da za dani fragment struktura ne sadrži brom. Slike D4 i D5 prikazuju uvećane i razvučene spektre FTMS<sup>2</sup> ES<sup>+</sup> i FTMS<sup>3</sup> ES<sup>+</sup> markera 1 s istaknutim signalom fragmenta  $m/z = 370$ , odnosno s istaknutim signalom fragmenta  $m/z = 354$  koji ukazuju na izotopnu raspodjelu broma što je potvrda da proučavani fragmenti u svojoj strukturi sadrže brom. Izotopna raspodjela broma prikazana je i na umetcima na slikama 9 i 11. Na slici 12 može se primijetiti da signal fragmenta  $m/z = 273$  nema izotopnu raspodjelu broma pa prema tome ovaj fragment nema brom u svojoj strukturi. Prema gore navedenim opažanjima osmišljen je i fragmentacijski put za signal molekuskog iona  $m/z = 385$  markera 1 prikazan na shemi 2 (vrijednosti kolizijskih energija korištenih za fragmentiranje iznose: CE = 30 – 100 eV). Prema shemi 2 fragmentacija se odvija kroz 2 kanala, a MS<sup>n</sup> analiza pokazuje da fragmenti nastaju homolitičkim cijepanjem. Iz navedenih spektara može se uočiti kako je spektrometar masa s linearnom ionskom stupicom kao analizatorom masa vrlo pogodan instrument za MS<sup>n</sup> analizu cijaninskih boja.

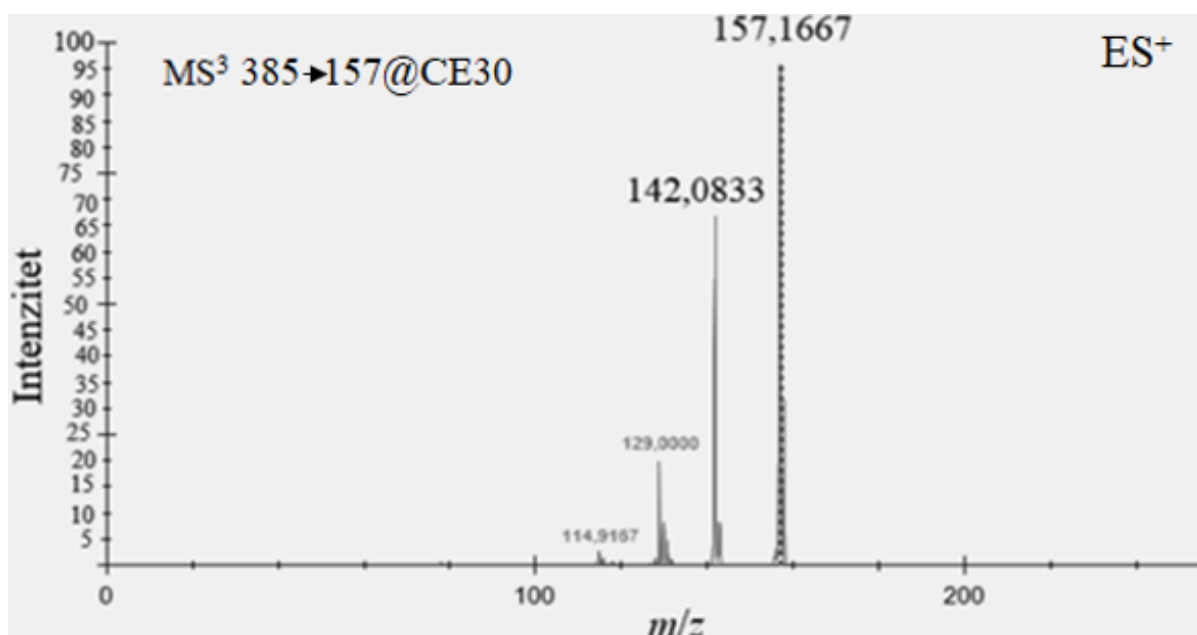


Slika 8. Cjelokupni spektar ITMS  $ES^+$  markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) s umetkom A na kojem je prikazan teoretski spektar markera 1, umetkom B na kojem je prikazana struktura markera 1 i umetkom C na kojem je prikazan uvećani i razvučeni spektar signala  $m/z = 385$  asigniran kao  $[\text{molekulski ion} - \text{I}]^+$ , izolacijska širina =  $\pm 1$ .

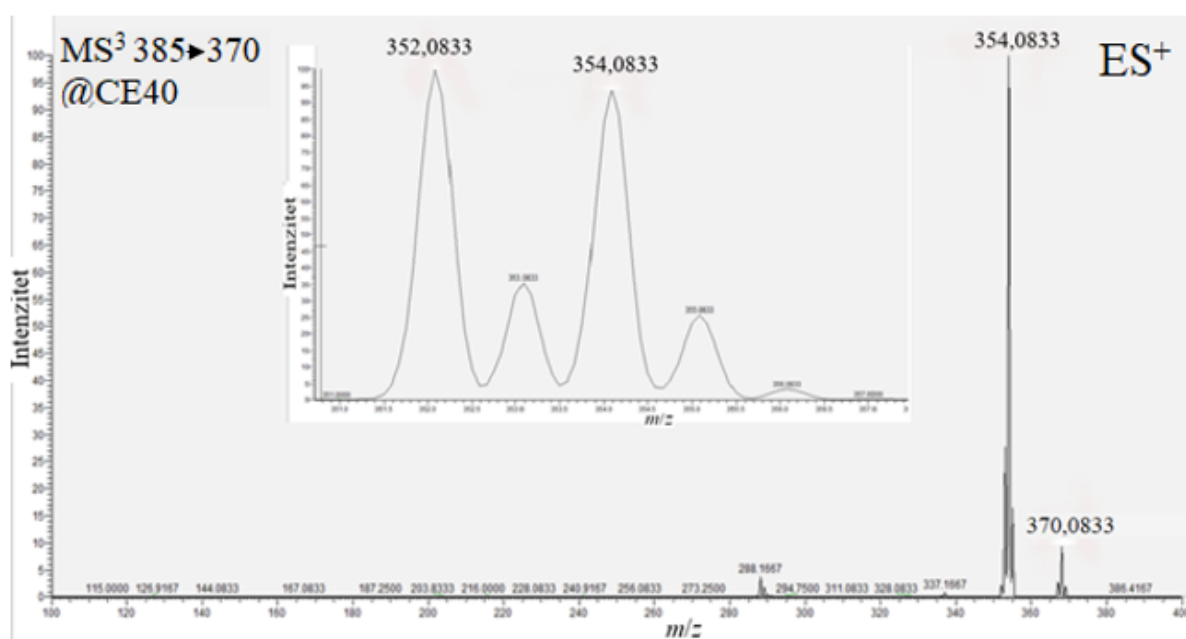


Slika 9. Spektar ITMS<sup>2</sup>  $ES^+$  markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) za signal  $m/z = 385$  s umetkom na kojem je prikazan uvećani i razvučeni spektar signala  $m/z = 370$ , izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 100 eV).

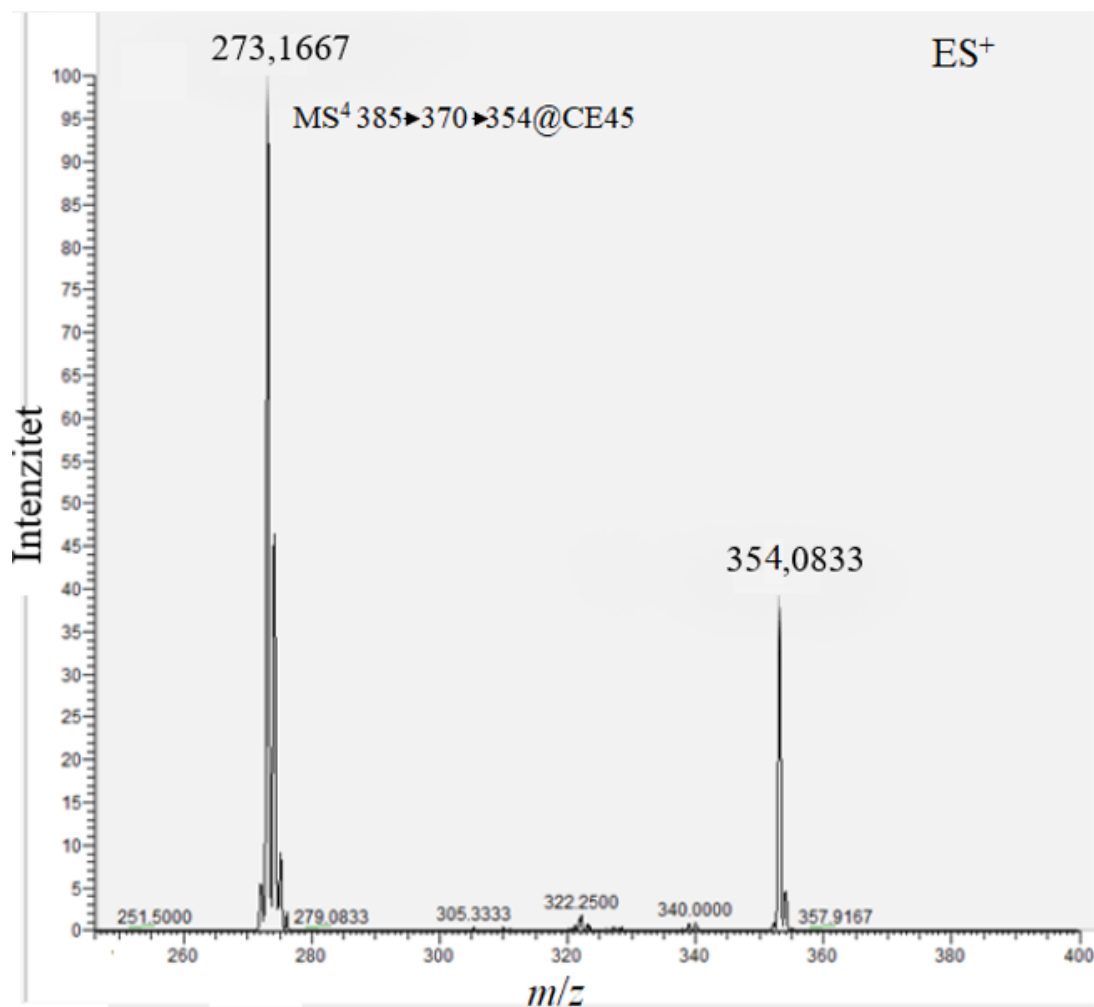




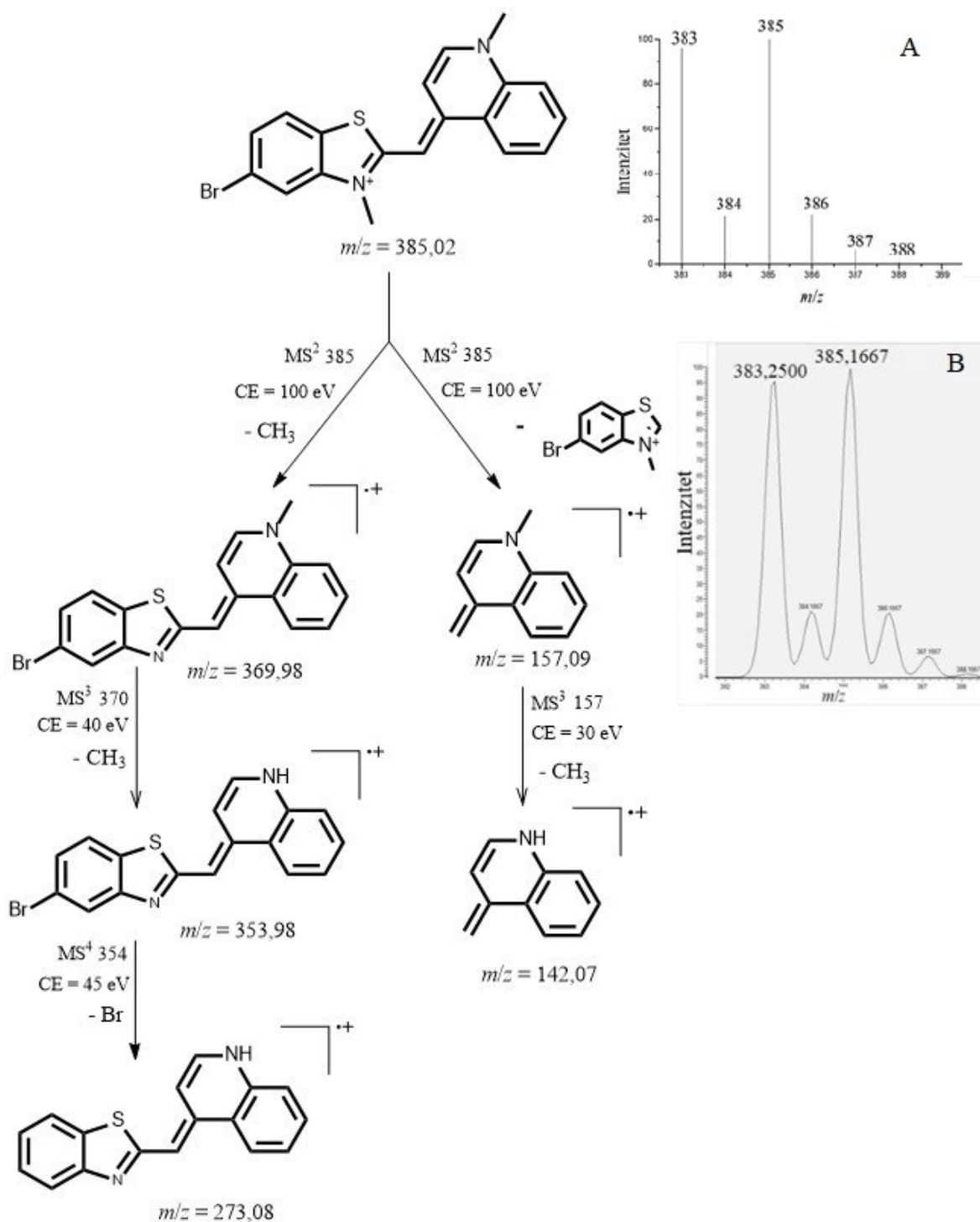
Slika 10. Spektar ITMS<sup>3</sup> ES<sup>+</sup> markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) za signal  $m/z = 157$ , izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 30 eV).



Slika 11. Spektar ITMS<sup>3</sup> ES<sup>+</sup> markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) za signal  $m/z = 370$  s umetkom na kojem je prikazan uvećani i razvučeni spektar signala  $m/z = 354$ , izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 40 eV).

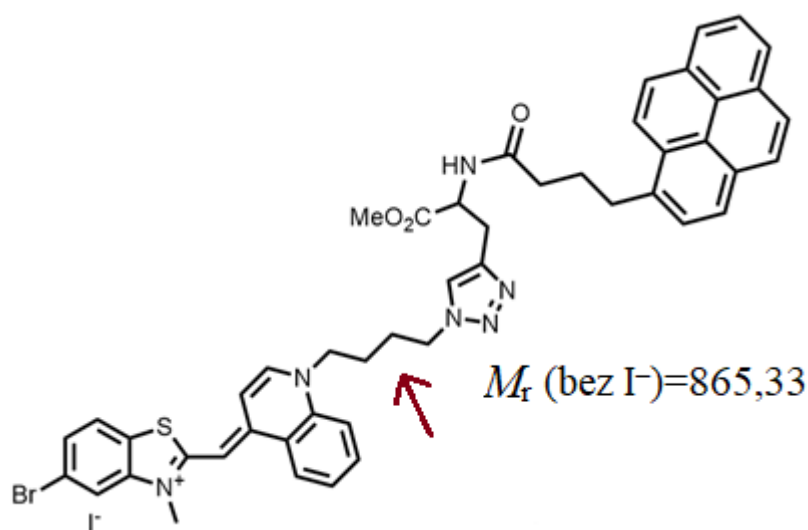


Slika 12. Spektar ITMS<sup>4</sup> ES<sup>+</sup> markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) za signal  $m/z = 354$ , izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 45 eV).



Shema 2. Prikaz puta fragmentiranja molekulskog iona (signal  $m/z = 385$ ) prema spektrima ESI MS za marker 1 (otopljen u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) s umetkom A na kojem je prikazan teoretski spektar markera 1 i umetkom B na kojem je prikazan uvećani i razvučeni spektar markera 1 za signal  $m/z = 385$ , izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = kolizijska energija).

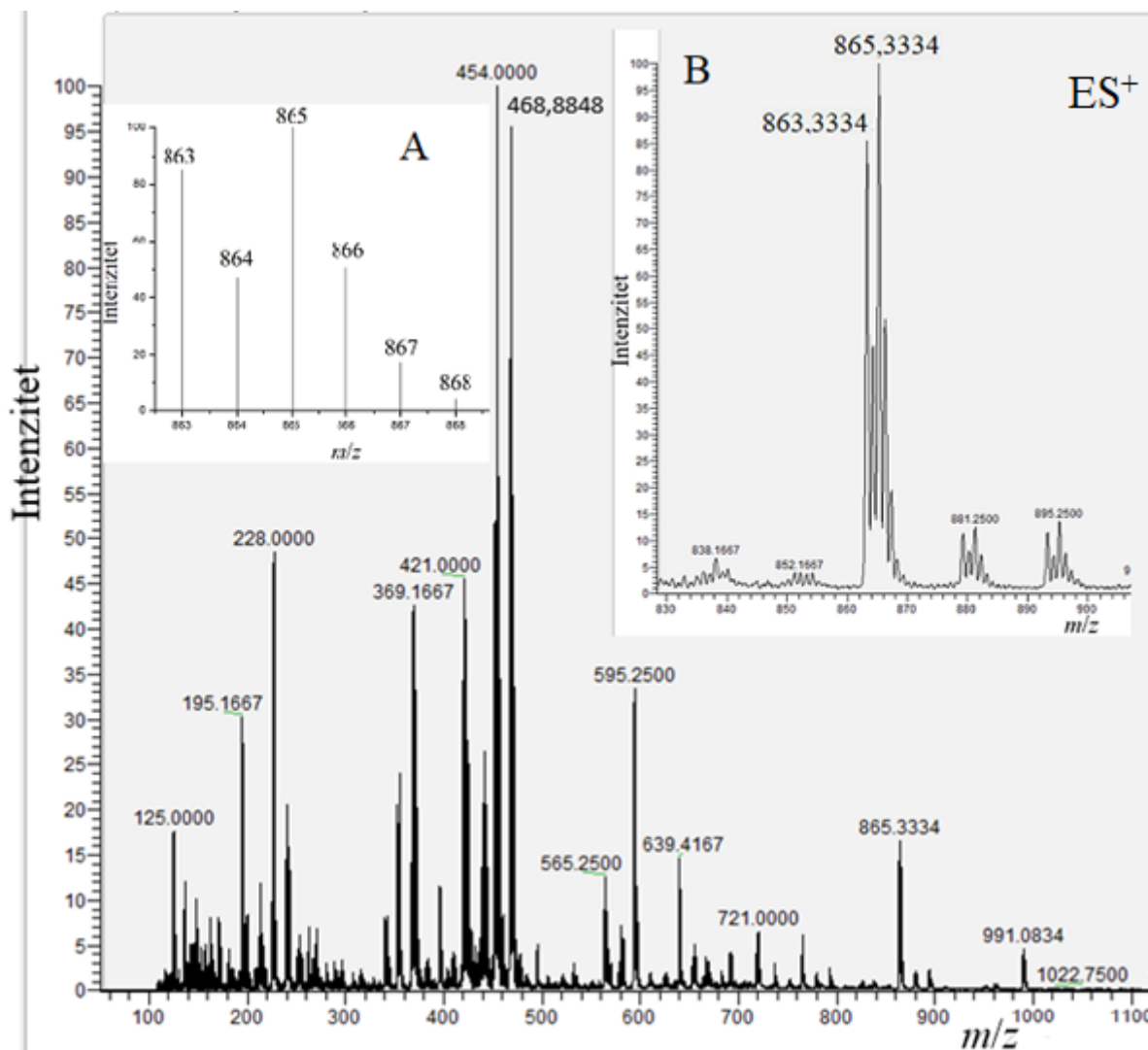
## 4.2.2. Marker 3



Slika 13. Struktura markera 3 s istaknutim polimetinskim mostom koji povezuje lijevi dio (odnosno, strukturu markera 1) s desnim dijelom strukture.

Na slikama 14 i D6 prikaz je cjelokupnih spektara ITMS i FTMS markera 3 za pozitivan način ionizacije. Slika 14 prikazuje i teoretski spektar markera 3 (umetak A) te razvučeni eksperimentalni spektar markera 3 (umetak B) čijom usporedbom možemo potvrditi da spektar prikazan na slici 14 pripada markeru 3. Također, na slici 14 je vidljivo da su najintenzivniji signali:  $m/z = 454$  i  $m/z = 469$  zapravo signali fragmenta (strukture prikazane u tablici 14) koji mogu nastati kao posljedica cijepanja polimetinskog mosta (naznačenog na slici 13) koji ih povezuje s lijevom stranom strukture markera 3 (koja pak odgovara strukturi markera 1). Na slici D6 vrlo je intenzivan i signal  $m/z = 228$  koji može odgovarati benzotiazolnom fragmentu s bromom, a identičan je za marker 1 i marker 3 (struktura fragmenta prikazana je u tablici 14). Radni parametri pogodni za dobivanje intenzivnog signala molekulskog iona markera 3 nisu pronađeni s obzirom na onemogućenost daljnjih mjerenja zbog COVID-19 pandemije. Iz istog razloga nisu provedena ni fragmentiranja koja bi bila korisna u svrhu istraživanja strukturnih značajki markera 3. Slika D7 prikazuje uvećani i razvučeni spektar FTMS signala  $m/z = 593$  s izotopnom raspodjelom broma što je potvrda da se u strukturi ovog fragmenta nalazi brom (struktura prikazana u tablici 14; masa markera 3 računata je prema stabilnom izotopu <sup>81</sup>Br,  $u = 80,916$ ). Strukturna analiza cijaninskih boja ukazuje nam na to da nije nimalo jednostavan

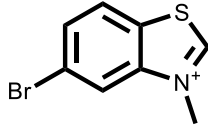
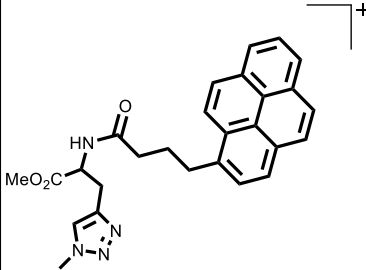
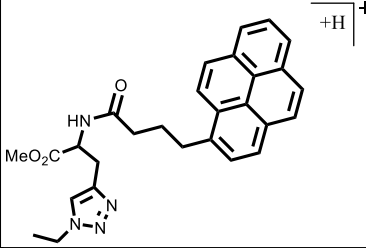
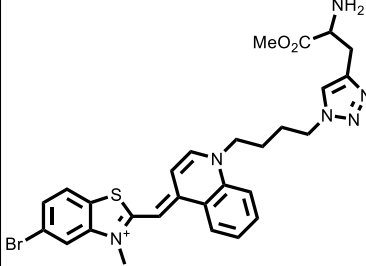
zadatak pronaći radne parametre spektrometra masa koji će dati kvalitetne spektre ovih organskih spojeva s intenzivnim signalima molekuskog iona.



Slika 14. Cjelokupni spektar ITMS ES<sup>+</sup> markera 3 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 17,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) s umetkom A na kojem je prikazan teoretski spektar markera 3 i umetkom B na kojem je prikazan uvećani i razvučeni spektar signala  $m/z = 865$ , izolacijska širina =  $\pm 1$ .

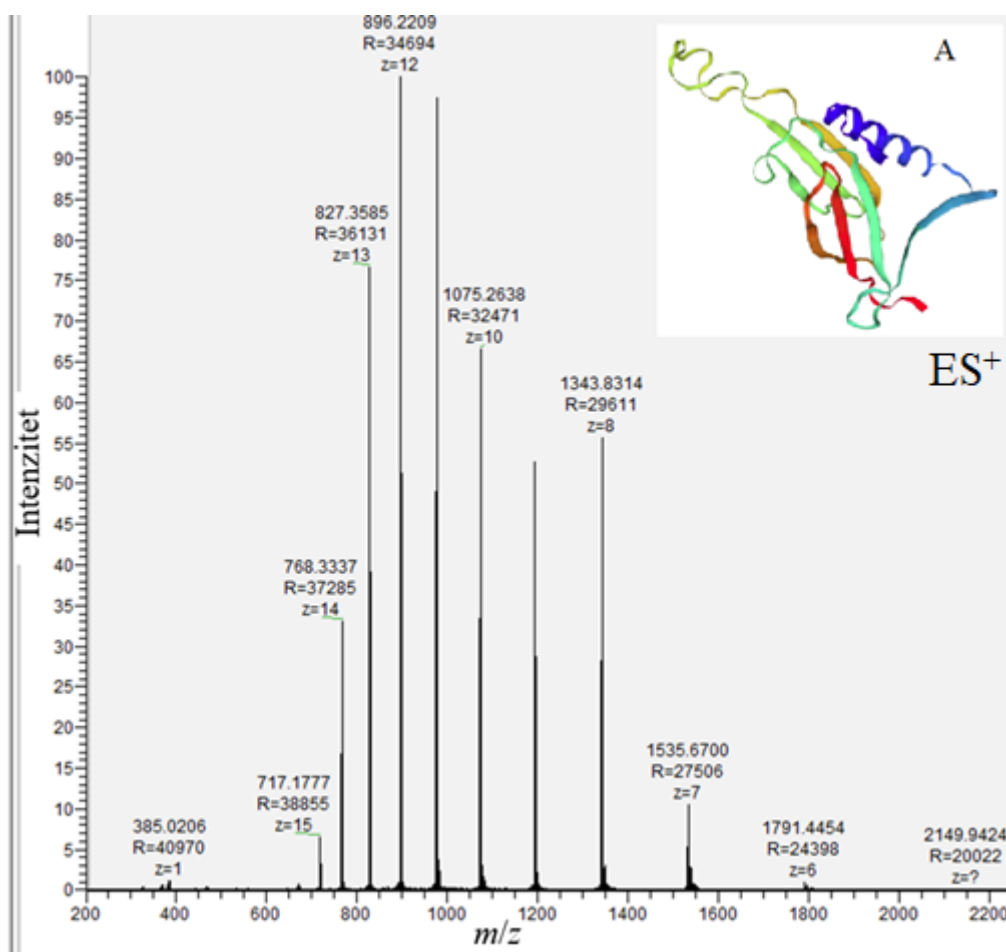
Asignacija važnijih signala markera 3 prikazanih na slici 14 i slici D6 nalazi se u tablici 14.

Tablica 14. Mogući fragmenti markera 3 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 17,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) i pridružene strukture.

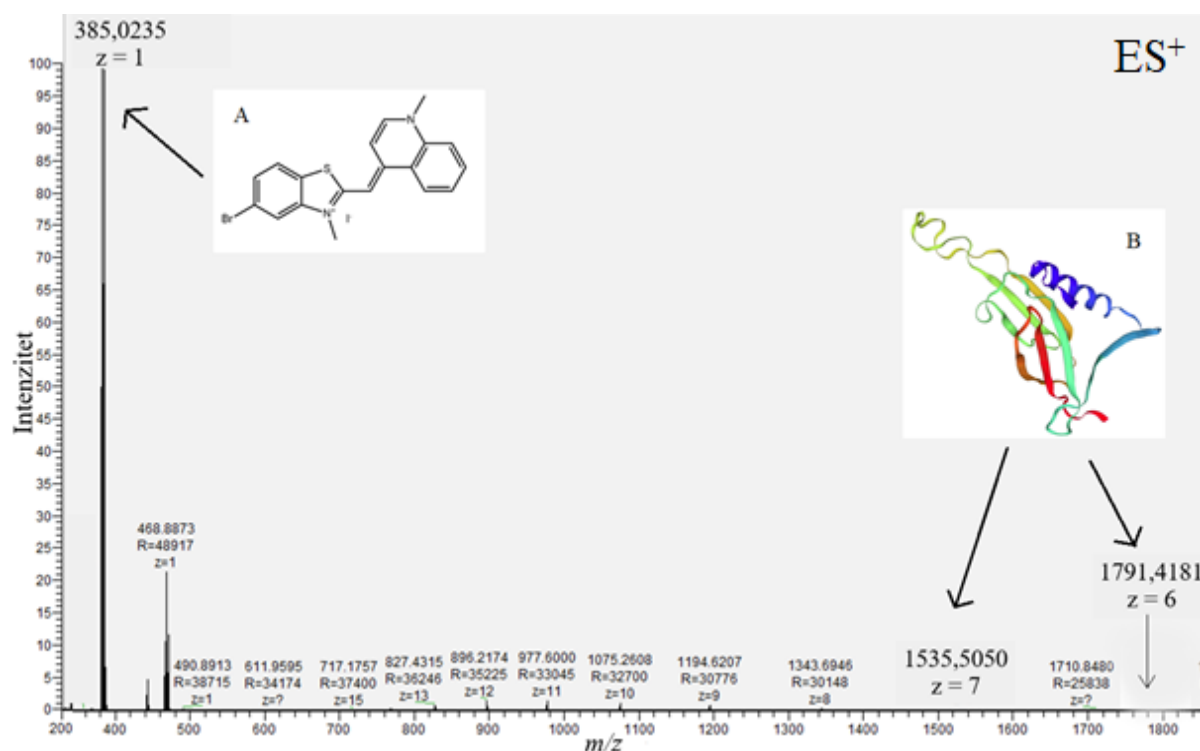
| fragmenti ( $m/z$ ) | strukture  |
|---------------------|--|
| 227, 92             |     |
| 454,00              |    |
| 468,88              |   |
| 593,13              |  |

#### 4.2.3. Analiza proteina IbpA i potencijalnog vezanja s markerima 1 i 3 pomoću spektrometra masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS)

U svrhu razvoja metode za proučavanje interakcija proteina te markera 1 i 3 provedena su MS mjerenja proteina IbpA pri raznim pH te mjerenja u svrhu analize potencijalnog vezanja markera 1 i/ili 3 s proteinom IbpA. S obzirom da je pri  $\text{pH} \approx 6,0$  došlo do denaturiranja proteina (kako je i opisano kasnije u ovom odjeljku), sljedeći je korak bio prirediti otopinu proteina IbpA pri većem pH ( $\text{pH} \approx 8,0$ ) za provedbu analize strukture proteina spektrometrom masa. Nakon analize same strukture proteina IbpA, željele su se proučiti interakcije koje bi se mogle pojaviti prilikom vezanja markera 1 i 3 s proteinom.



Slika 15. Cjelokupni spektar FTMS ES<sup>+</sup> proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , pufer: acetonitril + voda + mravlja kiselina, pH  $\approx 6,0$ ) s umetkom A na kojem je prikazana struktura proteina, izolacijska širina =  $\pm 3$ .

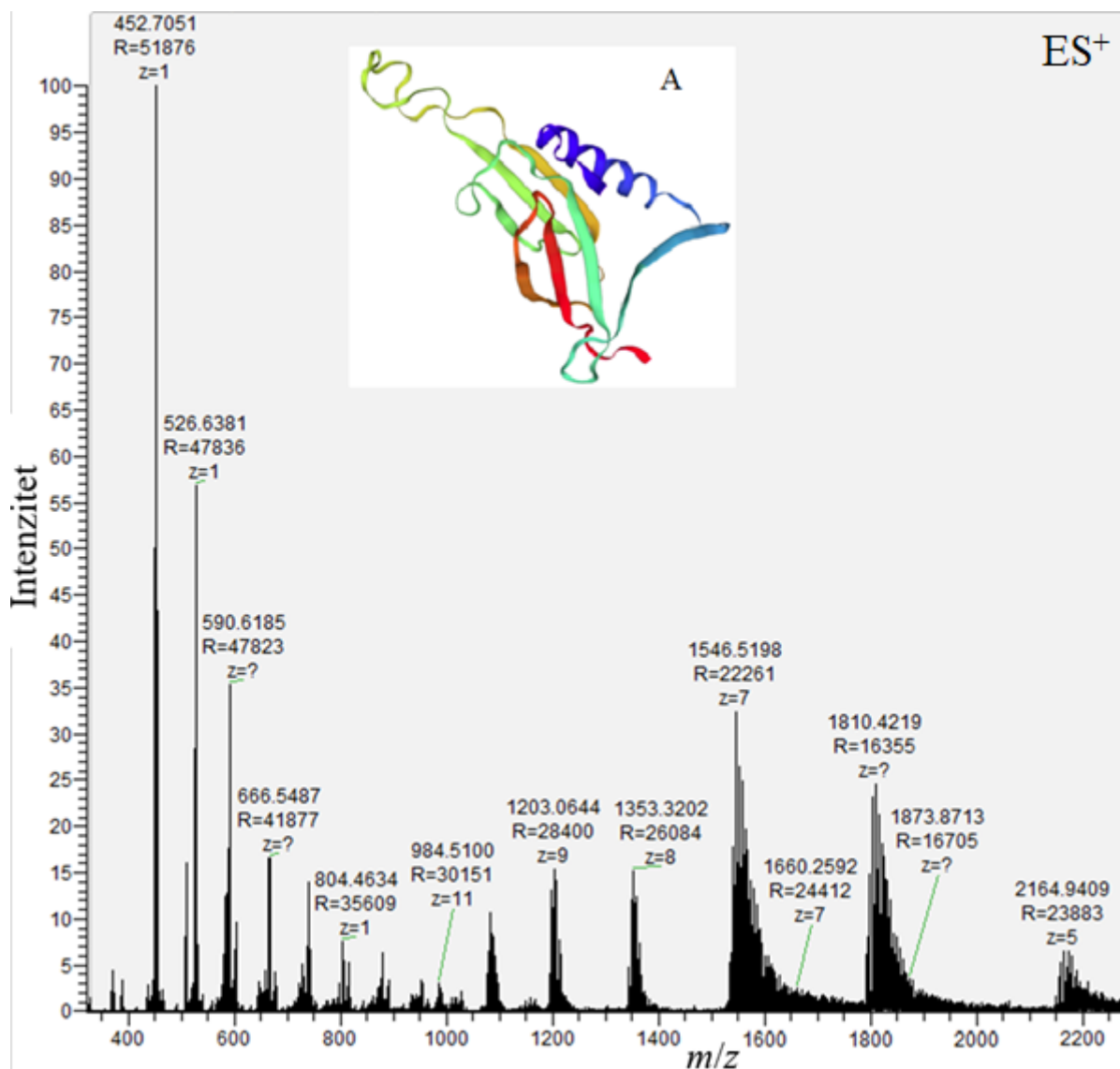


Slika 16. Cjelokupni spektar FTMS  $ES^+$  proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , pufer: acetonitril + voda + mravlja kiselina,  $\text{pH} \approx 6,0$ ) + marker 1 s umetkom A na kojem je prikazana struktura markera 1 i umetkom B na kojem je prikazana struktura proteina IbpA, izolacijska širina =  $\pm 3$ .

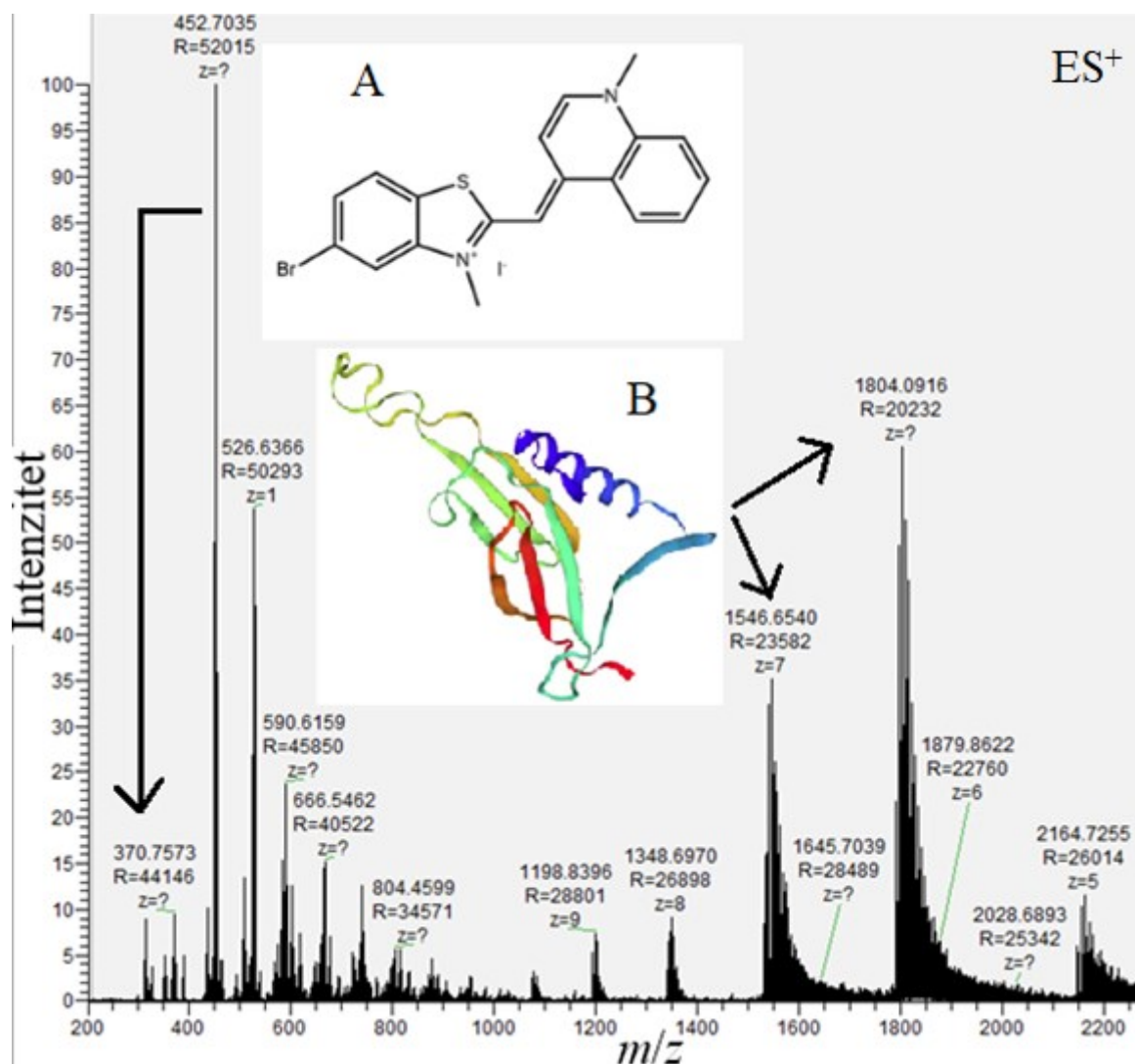
Slike 15 i 16 prikazuju cjelokupne spektre FTMS  $ES^+$  proteina IbpA pri  $\text{pH} \approx 6,0$  i proteina IbpA pri  $\text{pH} \approx 6,0$  + markera 1. Prema slici 15 je vidljivo da pri  $\text{pH} \approx 6$  dolazi do denaturiranja proteina IbpA budući da su signali proteina pri  $m/z = 1535$  i  $m/z = 1791$  vrlo malog intenziteta ili čak u razini baznog signala. S obzirom da molarna masa za danu sekvencu proteina IbpA (sekvenca: GSHGGYPPYNVELVDENHYRIAIAVAGFAESELEITAQDNLLVVKGAHAD EQKERTYLYQGIAERNFERKFQLAENIHVRGANLVNGLLYIDLER) korištenu u svrhu MS mjerenja iznosi  $M_r = 10743 \text{ Da}$ , jednostavnom provjerom može se potvrditi da signali prikazani na slici 17 odgovaraju proteinu IbpA (umnoškom mase i naboja pojedinog signala:  $1535,67 \cdot 7 = 10749,69$  ili  $1791,45 \cdot 6 = 10748,70$ ). Nadalje, usporedbom slika 15 i 16 vidljivo je da pri danim uvjetima u otopini (navedenim u odjeljku 3.3.3.) ne dolazi do vezanja markera 1 i proteina IbpA (na slici 16 vidljiv je vrlo intenzivan signal molekuskog iona markera 1 pri  $m/z = 385$  te su signali  $m/z = 1535$  i  $m/z = 1791$  nepromijenjeni u slučaju proteina, odnosno nema pomaka signala prema većim vrijednostima  $m/z$  koji bi ukazivali na moguće vezanje



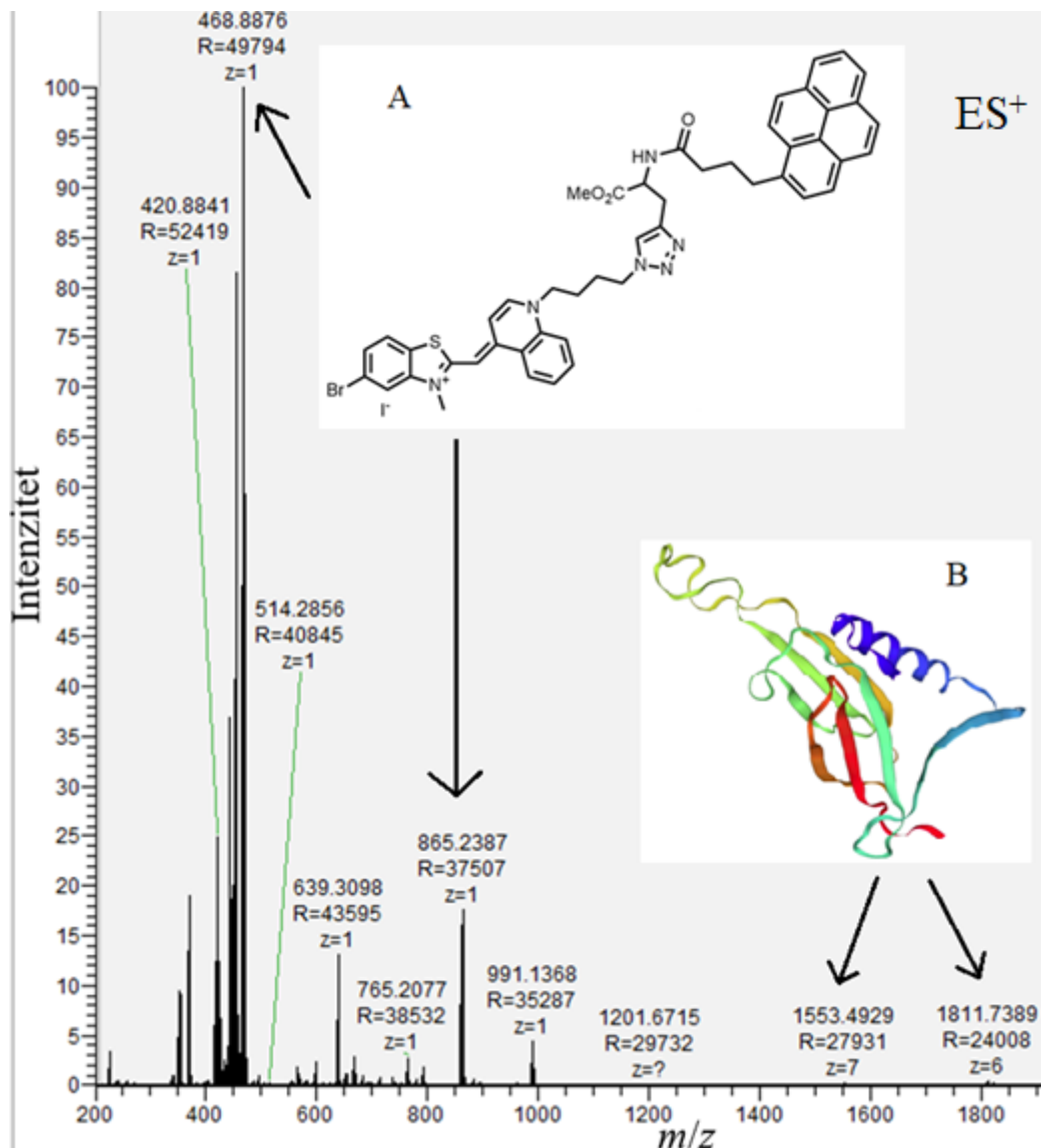
markera i proteina). Signal markera 1 na slici 16 puno je intenzivniji u odnosu na intenzitete signala proteina budući da je i koncentracija markera 1 veća u odnosu na koncentraciju proteina IbpA u istoj otopini.



Slika 17. Cjelokupni spektar FTMS ES<sup>+</sup> proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , pufer: acetonitril + voda + amonijev hidrogenkarbonat + tetraetilamonij, pH  $\approx 8,0$ ) s umetkom A na kojem je prikazana struktura proteina, izolacijska širina =  $\pm 3$ .



Slika 18. Cjelokupni spektar FTMS  $ES^+$  proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , pufer: acetonitril + voda + amonijev hidrogenkarbonat + tetraetilamonij,  $\text{pH} \approx 8,0$ ) + marker 1 s umetkom A na kojem je prikazana struktura markera 1 i umetkom B na kojem je prikazana struktura proteina IbpA, izolacijska širina =  $\pm 3$ .



Slika 19. Cjelokupni spektar FTMS ES<sup>+</sup> proteina IbpA ( $\gamma = 200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , pufer: acetonitril + voda + amonijev hidrogenkarbonat + tetraetilamonij, pH  $\approx 8,0$ ) + marker 3 s umetkom A na kojem je prikazana struktura markera 3 i umetkom B na kojem je prikazana struktura proteina IbpA, izolacijska širina =  $\pm 3$ .

Slike 17, 18 i 19 prikazuju cjelokupne spektre FTMS ES<sup>+</sup> proteina IbpA pri pH  $\approx 8,0$ , proteina IbpA pri pH  $\approx 8,0$  + markera 1 i IbpA pri pH  $\approx 8,0$  + markera 3. Usporedbom navedenih slika vidljivo je da pri zadanim uvjetima (prema odjeljku 3.3.3.) ne dolazi do vezanja ni markera 1 niti markera 3 s proteinom IbpA. Osim što nema pomaka signala proteina prema većim  $m/z$  u oba slučaja, potvrda da nije došlo do vezanja su i: prisutan signal iona fragmenta markera 1 na slici 18:  $m/z = 370$  (marker 1 bez jedne metilne skupine) te prisutni signali markera 3 na slici

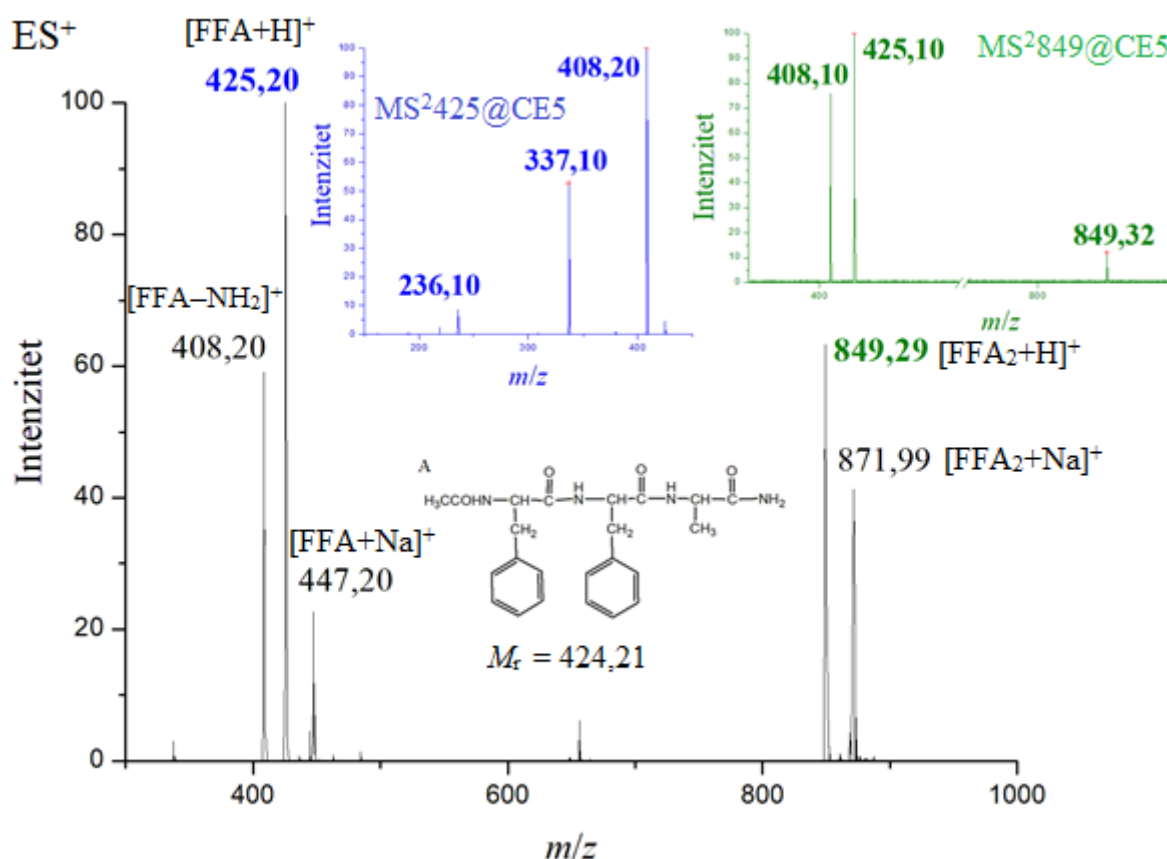
19:  $m/z = 865$  (signal molekuskog iona) te  $m/z = 469$  (vrlo intenzivan signal iona fragmenta). Budući da su spektri masa vezanja markera i proteina snimani pri radnim uvjetima za protein, signal molekuskog iona markera 1 nije vidljiv u spektru prikazanom na slici 18. Potrebna su daljnja istraživanja za pronalaženje radnih parametara i uvjeta pogodnih za vezanje te analizu vezanja markera i proteina IbpA, koja su onemogućena zbog COVID-19 pandemije. Ti će uvjeti u budućim istraživanjima poslužiti za proučavanje interakcija između markera i proteina (poput mijelin-asociranog glikoproteina, MAG) koji se nalaze u biološkoj matrici, točnije cerebrospinalnom likvoru.

### 4.3. Analiza tripeptida FFA te vezanja s $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{Zn}^{2+}$ spektrometrom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS)

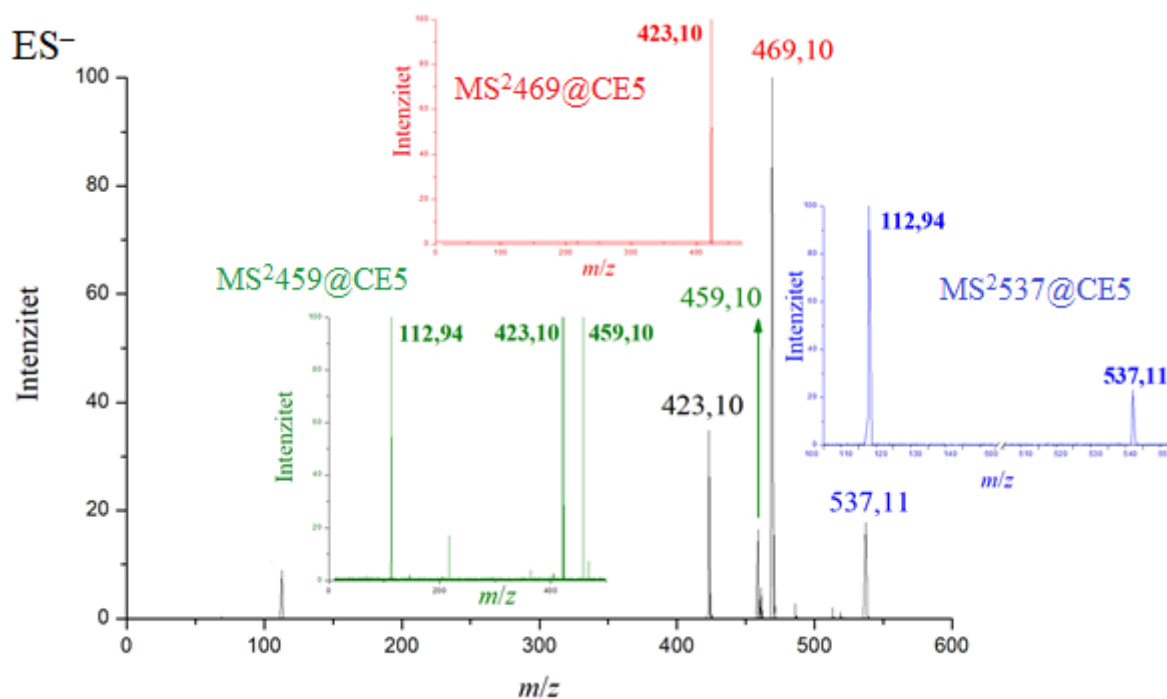
Tripeptid fenilalanil-fenilalanil-alanin (FFA) može premostiti dvije  $\beta$ -nabrane ploče te tako sudjelovati u sprječavanju agregacije proteina te samim time i u prevenciji bolesti koje nastaju kao posljedica nastajanja agregata u mozgu, budući da je poznato kako do agregacije proteina dolazi uslijed slaganja  $\beta$ -nabranih ploča jednih iznad drugih (koje se povezuju nekovalentnim interakcijama poput vodikovih veza). Zbog toga je provedena strukturna analiza tripeptida FFA ( $m/z = 425,20$ ) i njegovog vezanja s pojedinim metalima važnim za pravilnu funkciju mozga (točnije, cinkom i bakrom) koristeći spektrometar masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS) za pozitivan i negativan način ionizacije.

Provedena je  $\text{MS}^2$  analiza, a cjelokupni spektri pozitivnog i negativnog načina ionizacije tripeptida FFA kao i pripadajući spektri  $\text{MS}^2$  prikazani su na slici 20 i slici 21. Na slici 20 moguće je opaziti sljedeće signale: signal tripeptida FFA bez jedne amino skupine  $[\text{FFA}-\text{NH}_2]^+$  ( $m/z = 408,20$ ), vrlo intenzivan signal vodikovog adukta molekuskog iona  $[\text{FFA}+\text{H}]^+$  ( $m/z = 425,20$ ), signal FFA s vezanim natrijem  $[\text{FFA}+\text{Na}]^+$  ( $m/z = 447,20$ ) te signal  $[\text{FFA}_2+\text{H}]^+$  ( $m/z = 849,29$ ) i signal  $[\text{FFA}_2+\text{Na}]^+$  ( $m/z = 871,99$ ). Slika 21 prikazuje spektre MS i  $\text{MS}^2$  tripeptida FFA koji ukazuju na to da tripeptid FFA stvara mnoge adukte prilikom negativnog načina ionizacije. Jedan takav adukt je i FFA s vezanim klorom  $[\text{FFA}+\text{Cl}]^-$  kojemu odgovara signal:  $m/z = 459,10$ . Spektar  $\text{MS}^2$  za signal  $m/z = 423,10$   $[\text{FFA}-\text{H}]^-$  za negativan način ionizacije (slika 21) nije prikazan budući da je prilikom mjerenja korištena kolizijska energija ( $\text{CE} = 5 \text{ eV}$ ) nedovoljna za fragmentiranje ovog signala. Na shemi 3 prikaz je puta  $\text{MS}^2$  fragmentiranja

tripeptida FFA prema spektru MS<sup>2</sup> (za signal vodikovog adukta molekuskog iona  $m/z = 425,20$ ; spektar prikazan plavom bojom) prikazanom na slici 20 (kolizijska energija korištena prilikom fragmentiranja iznosi CE = 5 eV). Shema 3 prikazuje fragmentaciju tripeptida FFA koja se događa kroz 3 kanala. Dva najintenzivnija signala u spektru pripadaju fragmentima koji nastaju kao posljedica homolitičkog cijepanja C-N veze (A i B put), dok manje intenzivan signal pripada C putu koji odgovara heterolitičkom cijepanju peptidne veze.



Slika 20. Cjelokupni spektar MS pozitivnog načina ionizacije tripeptida FFA (otopljenog u metanolu,  $c = 1,88 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) sa spektrima MS<sup>2</sup> prikazanim plavom (za signal vodikovog adukta molekuskog iona  $[FFA+H]^+$   $m/z = 425$ ) i zelenom bojom (za signal  $[FFA_2+H]^+$   $m/z = 849$ ) te sa strukturom tripeptida FFA prikazanom na umetku A, izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 5 eV).

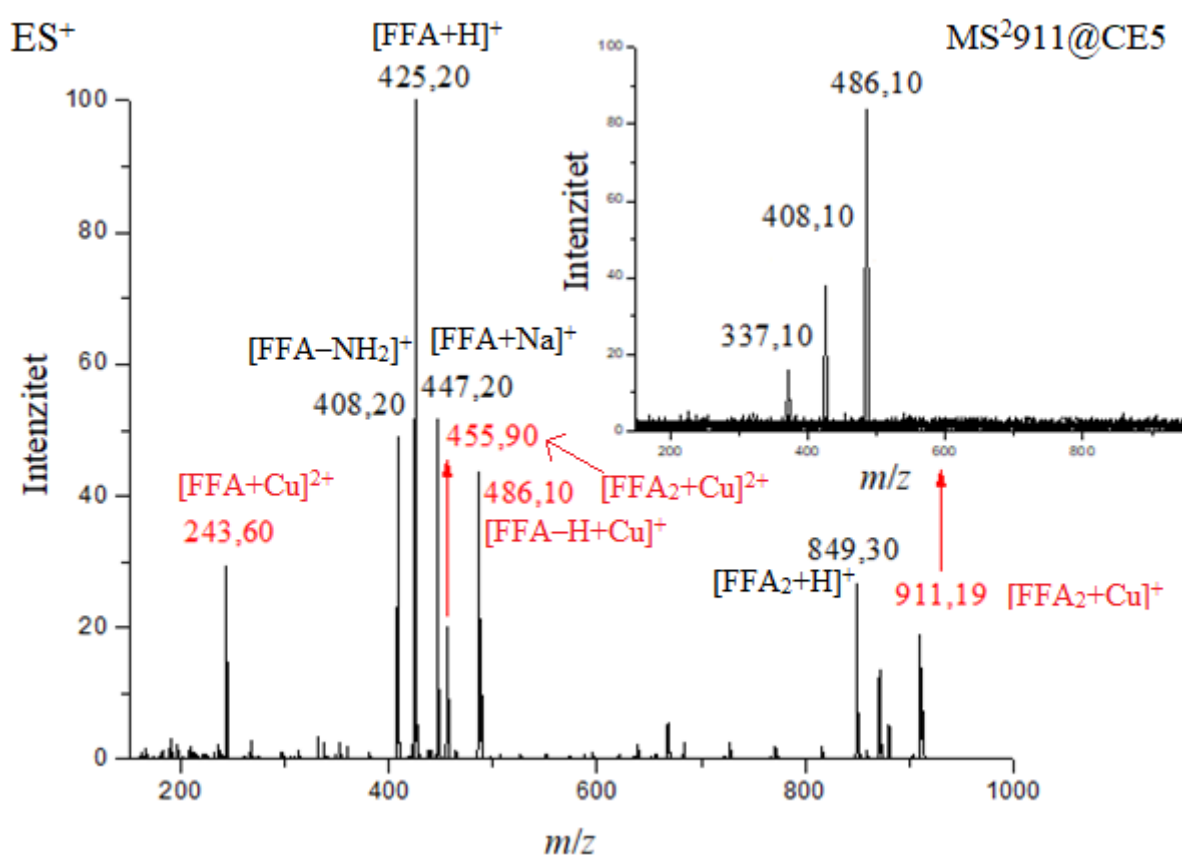


Slika 21. Cjelokupni spektar MS negativnog načina ionizacije tripeptida FFA (otopljenog u metanolu,  $c = 1,88 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) sa spektrima MS<sup>2</sup> prikazanim zelenom (za signal  $[\text{FFA}+\text{Cl}]^-$   $m/z = 459$ ), crvenom (za signal  $[\text{FA}_2]^-$   $m/z = 469$ ) i plavom (za signal  $m/z = 537$ ) bojom (CE = 5 eV), izolacijska širina =  $\pm 1$ .



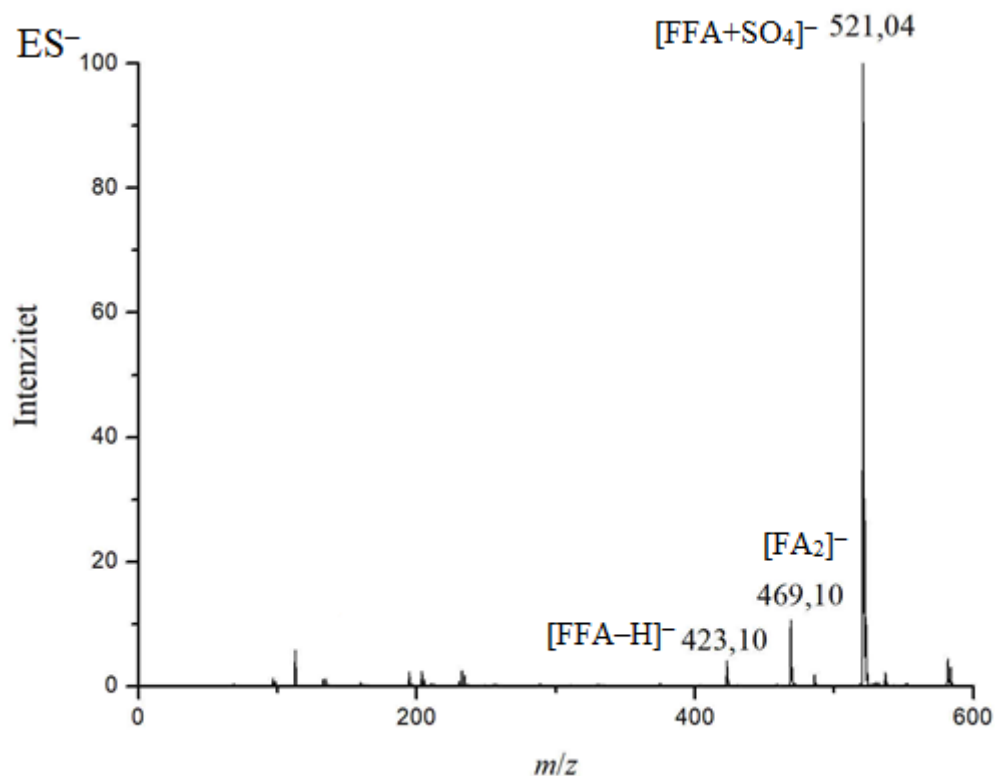
4.3.1. Interakcija FFA s  $\text{Cu}^{2+}$ 

Za potrebe analize interakcija između FFA i  $\text{Cu}^{2+}$  pripravljena je otopina kompleksa FFA- $\text{Cu}^{2+}$  u metanolu u omjeru molarnih koncentracija FFA: $\text{Cu}^{2+}$  = 1:3. Analiza je provedena metodom ESI-MS za pozitivan ( $\text{ES}^+$ ) i negativan ( $\text{ES}^-$ ) način ionizacije. Svrha provedene analize jest istražiti utjecaj biološke matrice (u ovom slučaju cerebrospinalnog likvora) koja sadrži mnoge metale esencijalne za pravilno funkcioniranje živčanog sustava, među kojima je i bakar. Mase kompleksa FFA- $\text{Cu}^{2+}$  računane su prema najstabilnijem izotopu bakra:  $^{63}\text{Cu}$ ,  $u = 62,929$ .



Slika 22. Cjelokupni spektar MS pozitivnog načina ionizacije kompleksa FFA- $\text{Cu}^{2+}$  (u otopini metanola, omjer 1:3) s umetkom na kojemu je prikazan spektar MS<sup>2</sup> za signal  $m/z = 911$   $[\text{FFA}_2+\text{Cu}]^+$ , CE = 5 eV (crvenom bojom istaknuti su signali kompleksa FFA- $\text{Cu}^{2+}$ ), izolacijska širina =  $\pm 1$ .





Slika 23. Cjelokupni spektar MS negativnog načina ionizacije kompleksa  $FFA-Cu^{2+}$  (u otopini metanola, omjer 1:3), izolacijska širina =  $\pm 1$ .

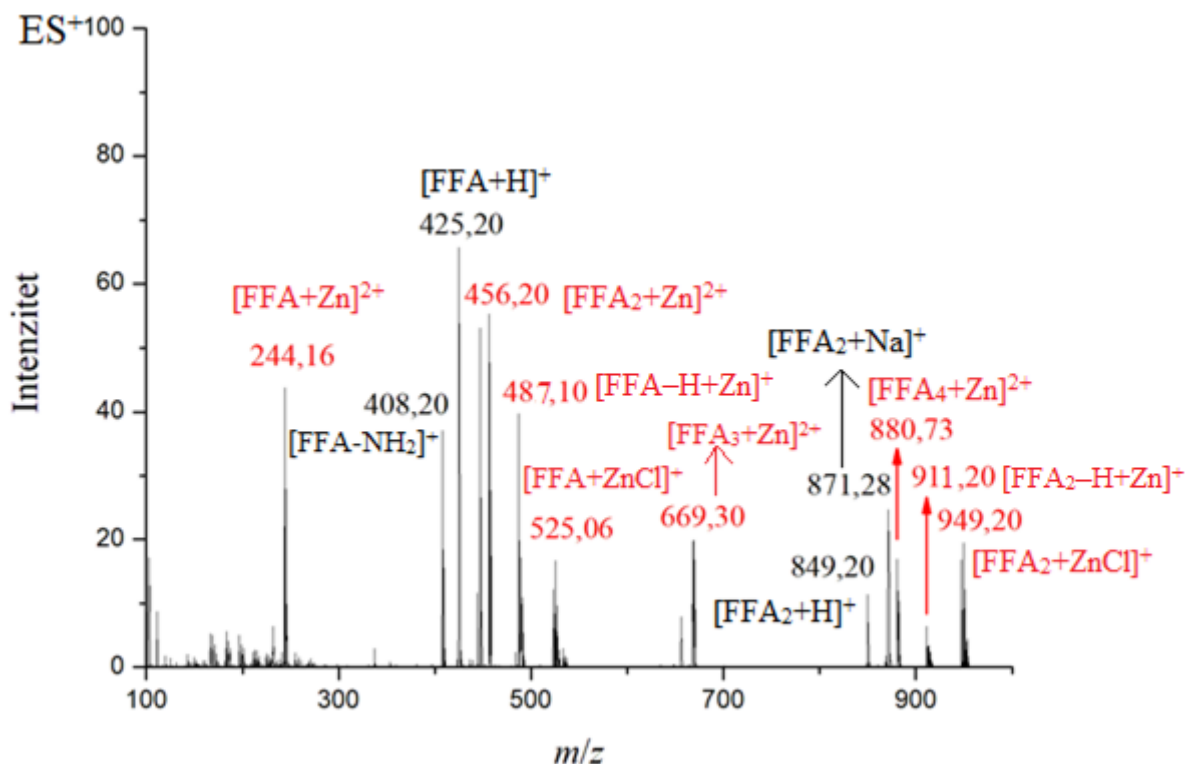
Tablica 15. Signali MS kompleksa  $FFA-Cu^{2+}$  (u otopini metanola, omjer 1:3) i pripadajuće strukture.

| Način ionizacije           | Signali ( $m/z$ ) | Struktura         |
|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Pozitivan način ionizacije | 911,19            | $[FFA_2+Cu]^+$    |
|                            | 849,30            | $[FFA_2+H]^+$     |
|                            | 486,10            | $[FFA-H+Cu]^+$    |
|                            | 455,90            | $[FFA_2+Cu]^{2+}$ |
|                            | 447,20            | $[FFA+Na]^+$      |
|                            | 425,20            | $[FFA+H]^+$       |
|                            | 408,20            | $[FFA-NH_2]^+$    |
|                            | 243,60            | $[FFA+Cu]^{2+}$   |
| Negativan način ionizacije | 521,04            | $[FFA+SO_4]^-$    |
|                            | 469,10            | $[FA_2]^-$        |
|                            | 423,10            | $[FFA-H]^-$       |

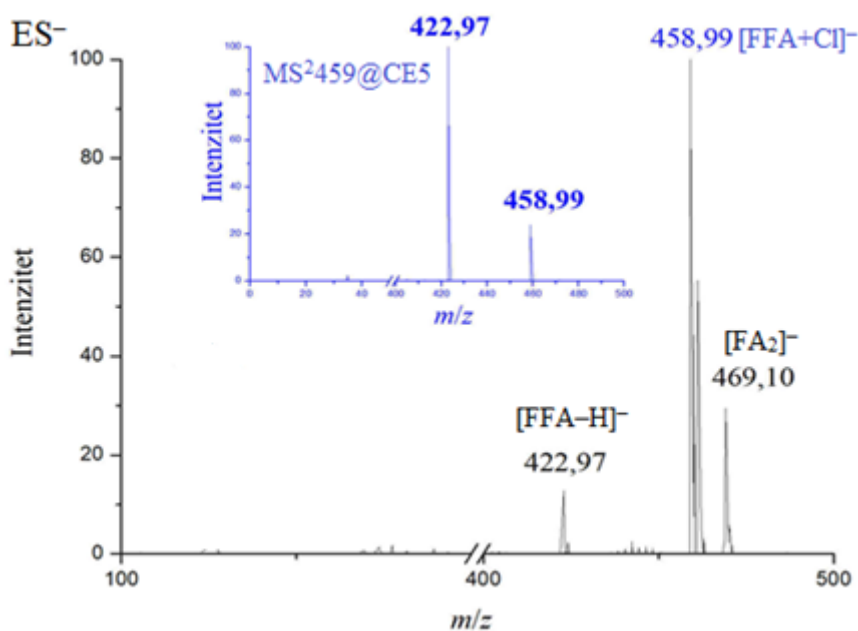
Slika 22 i slika 23 prikazuju spektre MS i MS<sup>2</sup> tripeptida FFA u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije nakon vezanja s Cu<sup>2+</sup>. Spektri MS<sup>2</sup> za signale  $m/z = 486,10$ ,  $m/z = 455,90$  (kod pozitivnog načina ionizacije) te za signale negativnog načina ionizacije nisu prikazani. Tablica 15 prikazuje povezanost struktura i signala u spektrima prikazanim na slikama 22 i 23. U slučaju vezanja FFA i Cu<sup>2+</sup> iona, signal u spektru masa bit će vidljiv kao [ukupna masa nastalog kompleksa/nabojni broj bakra]. Primjerice, ukupna masa kompleksa [FFA<sub>2</sub>+Cu]<sup>2+</sup> iznosi 911,35, ali zbog naboja Cu<sup>2+</sup> signal ovog kompleksa vidljiv je u spektru kao  $m/z = 455,90$ . Nadalje, na slici 22 može se uočiti kako najintenzivniji signal ( $m/z = 425,20$ ) pripada vodikovom aduktu molekuskog iona [FFA+H]<sup>+</sup>, dok je najintenzivniji signal za komplekse FFA-Cu<sup>2+</sup> signal  $m/z = 486,10$  čiju strukturu možemo opisati kao [FFA-H+Cu]<sup>+</sup>. Najintenzivniji signal na slici 23 je signal adukta [FFA+SO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, a sulfatni ion potječe od spoja CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O korištenog za pripremu otopine Cu<sup>2+</sup> iona. Također, na slici 23 je potrebno istaknuti signal  $m/z = 469,10$  s pripadnom strukturom [FA<sub>2</sub>]<sup>-</sup> koja nastaje nakon cijepanja peptidne veze (na položaju C prema shemi 3, pri čemu se odcjepljuje jedan fenilalanin) te zatim dolazi do vezanja dvaju dipeptida FA u plinovitoj fazi spektrometra mase. Na slici 23 može se opaziti i signal molekuskog iona tripeptida FFA  $m/z = 423,10$  [FFA-H]<sup>-</sup> intenziteta u razini baznog signala. Kao što je vidljivo sa spektara i iz tablice 15, FFA se s Cu<sup>2+</sup> veže u omjerima 1:1 te 2:1.

#### 4.3.2. Interakcija FFA s Zn<sup>2+</sup>

Za potrebe analize interakcija između FFA i Zn<sup>2+</sup> pripravljena je otopina kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> u metanolu u omjeru molarnih koncentracija FFA:Zn<sup>2+</sup> = 1:2. Analiza je provedena metodom ESI-MS za pozitivan (ES<sup>+</sup>) i negativan (ES<sup>-</sup>) način ionizacije. Svrha provedene analize jest istražiti utjecaj biološke matrice (u ovom slučaju cerebrospinalnog likvora) koja sadrži mnoge metale esencijalne za pravilno funkcioniranje živčanog sustava, među kojima je i cink. Mase kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> računane su prema najstabilnijem izotopu cinka: <sup>64</sup>Zn,  $u = 63,929$ .



Slika 24. Cjelokupni spektar MS ES<sup>+</sup> kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (u otopini metanola, omjer 1:2; crvenom bojom istaknuti su signali kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup>), izolacijska širina = ±1.



Slika 25. Cjelokupni spektar MS ES<sup>-</sup> kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (u otopini metanola, omjer 1:2) s umetkom na kojemu je prikazan spektar MS<sup>2</sup> za najintenzivniji signal [FFA+Cl]<sup>-</sup> m/z = 459 (CE = 5 eV), izolacijska širina = ±1.

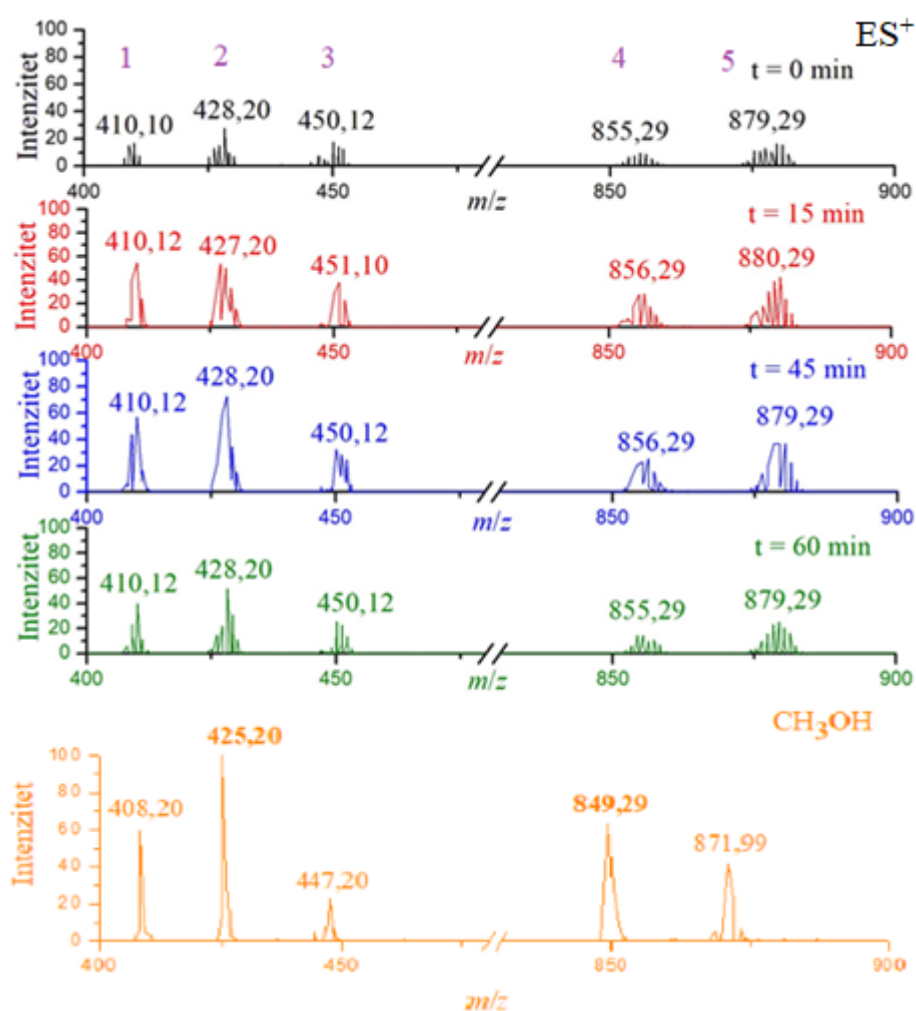
Tablica 16. Signali MS kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (u otopini metanola, omjer 1:2) i pripadajuće strukture.

| Način ionizacije           | Signali ( <i>m/z</i> ) | Struktura                             |
|----------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Pozitivan način ionizacije | 949,20                 | [FFA <sub>2</sub> +ZnCl] <sup>+</sup> |
|                            | 911,20                 | [FFA <sub>2</sub> -H+Zn] <sup>+</sup> |
|                            | 880,73                 | [FFA <sub>4</sub> +Zn] <sup>2+</sup>  |
|                            | 871,28                 | [FFA <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>   |
|                            | 849,20                 | [FFA <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>    |
|                            | 669,30                 | [FFA <sub>3</sub> +Zn] <sup>2+</sup>  |
|                            | 525,06                 | [FFA+ZnCl] <sup>+</sup>               |
|                            | 487,10                 | [FFA-H+Zn] <sup>+</sup>               |
|                            | 456,20                 | [FFA <sub>2</sub> +Zn] <sup>2+</sup>  |
|                            | 425,20                 | [FFA+H] <sup>+</sup>                  |
|                            | 408,20                 | [FFA-NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>   |
|                            | 244,16                 | [FFA+Zn] <sup>2+</sup>                |
| Negativan način ionizacije | 469,10                 | [FA <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>       |
|                            | 458,99                 | [FFA+Cl] <sup>-</sup>                 |
|                            | 422,97                 | [FFA-H] <sup>-</sup>                  |

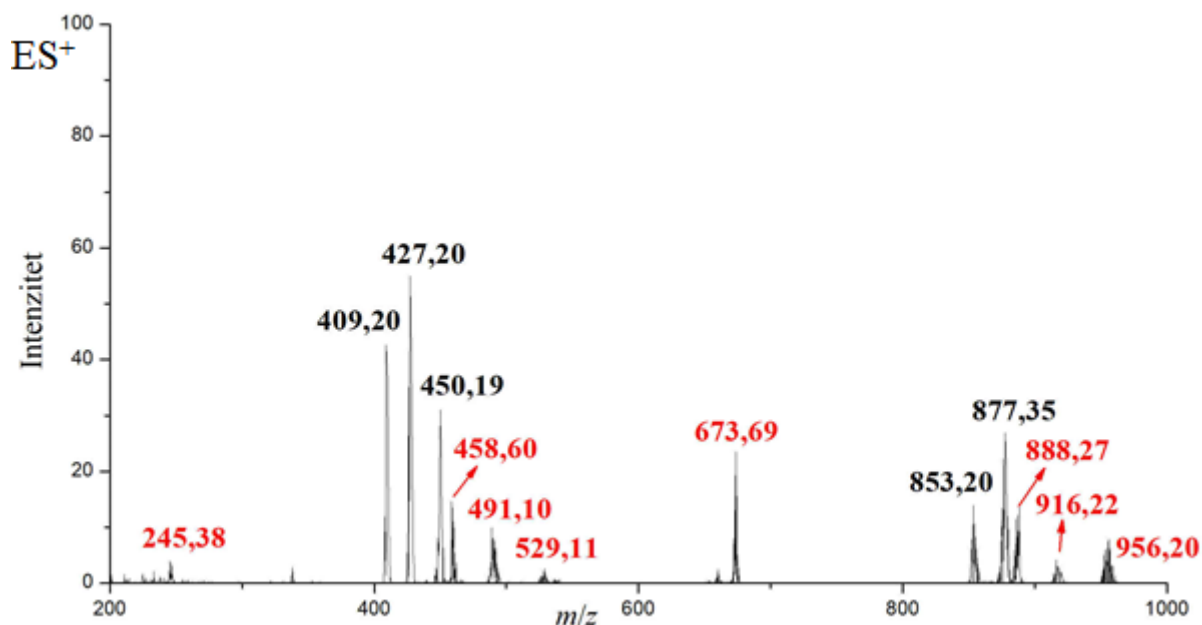
Slika 24 i slika 25 prikazuju spektre MS i MS<sup>2</sup> kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (u omjeru koncentracija 1:2) za pozitivni i negativni način ionizacije. Tablica 16 prikazuje povezanost struktura i signala u spektrima prikazanim na slikama 24 i 25. Slike MS<sup>2</sup> fragmentiranja za pozitivni način ionizacije kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> prikazane u dodatku (slike D8, D9, D10, D11, D12 i D13) dodatna su potvrda da signali istaknuti crvenom bojom na slici 24 pripadaju ovom kompleksu. Kao i u slučaju kompleksa FFA-Cu<sup>2+</sup>, i na spektru kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> u pozitivnom modu najintenzivniji signal je *m/z* = 425,20 koji pripada vodikovom aduktu molekulskog iona [FFA+H]<sup>+</sup>, dok je najintenzivniji signal za komplekse FFA-Zn<sup>2+</sup> signal *m/z* = 456,20 čiju strukturu možemo opisati kao [FFA<sub>2</sub>+Zn]<sup>2+</sup> (slika 24). Za negativni način ionizacije (slika 25) najintenzivniji signal *m/z* = 458,99 pripada kompleksu [FFA+Cl]<sup>-</sup>, a kloridni ion potječe od spoja ZnCl<sub>2</sub> korištenog za pripremu otopine Zn<sup>2+</sup> iona. Prema spektrima i tablici 16 vidljivo je da se FFA sa Zn<sup>2+</sup> veže u omjerima: 1:1, 2:1, 3:1 i 4:1. Dakle, vezanje Cu<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup> s tripeptidom FFA u različitim omjerima ukazuje nam na mogući utjecaj biološke matrice (u kojoj su, među ostalim, prisutni i ovi metali) na buduća istraživanja djelotvornosti ovog tripeptida u realnom uzorku. U svrhu daljnje analize uloge metala u razvoju neuroloških poremećaja, bilo bi korisno proučiti dolazi li do nastajanja kompleksa FFA s magnezijem, kalcijem, željezom i manganom.

## 4.3.3. Analiza tripeptida FFA u deuteriranom etanolu

Provedena su mjerenja za tripeptid FFA otopljen u deuteriranom etanolu, a usporedba cjelokupnih spektara masa za pozitivan način ionizacije s vremenskim razmakom od 0, 15, 45 i 60 minuta prikazana je na slici 26. Vidljivo je da dolazi do izmjene pojedinih protona deuterijem (dolazi do povećanja molekulske mase pa su samim time signali vidljivi pri višim  $m/z$ ). Usporedba cjelokupnih spektara masa za negativan način ionizacije nalazi se u dodatku (slika D14). U deuteriranom etanolu otopljen je i kompleks FFA-Zn<sup>2+</sup>, a cjelokupni spektar masa za pozitivni način ionizacije prikazan je na slici 27, dok je isti spektar za negativni način ionizacije prikazan na slici D15.



Slika 26. Usporedba cjelokupnih spektara MS ES<sup>+</sup> tripeptida FFA (otopljenog u deuteriranom etanolu,  $c = 1,88 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) snimljenih odmah nakon pripreme otopine te nakon 15, 45 i 60 minuta sa spektrom FFA (otopljenog u metanolu,  $c = 1,88 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), izolacijska širina  $\pm 1$ .



Slika 27. Cjelokupni spektar MS ES<sup>+</sup> kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (otopljenog u deuteriranom etanolu, omjer 1:2, crvenom bojom istaknuti su signali koji pripadaju kompleksu), izolacijska širina = ±1.

Na slici 26 možemo uočiti reverzibilnu izmjenu protona deuterijem za signale  $m/z = 428$ ,  $m/z = 450$ ,  $m/z = 855$  i  $m/z = 879$ . Uspoređujući spektre tripeptida FFA otopljenog u deuteriranom etanolu sa spektrom tripeptida FFA prikazanim narančastom bojom (FFA otopljen u metanolu) jasno je vidljiva izmjena protona deuterijem (najvjerojatnije s amino skupina molekule FFA): 1) izmjena 2 protona za signal koji odgovara strukturi: [FFA-NH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 2) izmjena 2-3 protona za signal koji odgovara strukturi [FFA+H]<sup>+</sup>, 3) izmjena 3-4 protona za signal koji odgovara strukturi [FFA+Na]<sup>+</sup>, 4) izmjena 6-7 protona za signal koji odgovara strukturi [FFA<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> te 5) izmjena 7-8 protona za signal koji odgovara strukturi [FFA<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>.

Usporedbom slika 24 i 25 (cjelokupni spektri kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> u metanolu za pozitivan i negativan način ionizacije) sa slikom 27 i slikom D15 (cjelokupni spektri kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> u deuteriranom etanolu za pozitivan i negativan način ionizacije) može se primijetiti pomak signala prema višim  $m/z$  za signale kompleksa otopljenog u deuteriranom otapalu u odnosu na signale istog kompleksa otopljenog u metanolu.

## § 5. ZAKLJUČAK

Brojna istraživanja provedena su te se još uvijek provode u svrhu ranijeg otkrivanja i prevencije razvoja raznih neuroloških poremećaja. Iz provedenog istraživanja može se, ponajprije, zaključiti kako je spektrometrija masa iznimno pogodna tehnika za ovu vrstu istraživanja, s time da metoda mora biti prilagođena uzorku i informaciji koju želimo dobiti. Metoda ESI-MS, kao nedestruktivna metoda može se primijeniti na području karakterizacije organskih i bioloških spojeva te njihovih interakcija sa željenim proteinima i/ili metalima. Za analizu spojeva poput cijaninskih boja i tripeptida FFA pogodnija je pozitivna od negativne ionizacije elektroraspršenjem, budući da spektri u pozitivnom načinu snimanja u oba slučaja daju više signala, a time i više informacija o ovim spojevima. Također, metoda ICP-MS može poslužiti u svrhu istraživanja udjela metala u biološkoj matrici (primjerice cerebrospinalnom likvoru) te je sama metoda vrlo brza, osjetljiva i ima mogućnost provođenja multielementne analize.

Rezultati analize biološke matrice, to jest mjerenja masenih koncentracija pojedinih metala u cerebrospinalnom likvoru nisu dostatni za donošenje konkretnog zaključka o području vrijednosti masenih koncentracija tih metala kao pokazatelja razvoja nekog neurološkog poremećaja te su potrebna daljnja istraživanja. Nadalje, strukturna analiza cijaninskih boja (markera 1 i 3) te analiza njihovog vezanja s proteinom IbpA nije u potpunosti provedena i potrebno je pronaći uvjete i radne parametre spektrometra masa pri kojima će se moći provesti analiza interakcija, a koji će onda poslužiti u daljnjoj analizi interakcija markera i proteina iz cerebrospinalnog likvora. Karakterizacija tripeptida FFA metodom ESI-MS pokazala je da FFA stvara komplekse s  $\text{Cu}^{2+}$  u omjerima 1:1 i 2:1, dok su za kompleks FFA- $\text{Zn}^{2+}$  ti omjeri: 1:1, 2:1, 3:1 i 4:1. U svrhu daljnje analize uloge metala u razvoju neuroloških poremećaja i utjecaja biološke matrice, bilo bi korisno proučiti dolazi li do nastajanja kompleksa FFA s magnezijem, kalcijem, željezom i manganom.

Na kraju, iako su potrebna još mnoga istraživanja kako bi se otkrio način ranog otkrivanja bolesti mozga poput glioblastoma multiforme i Alzheimerove bolesti, ovim je radom napravljen mali korak u analizi potencijalnih markera i inhibitora neuroloških poremećaja te je ukazano na mogući utjecaj biološke matrice prilikom istraživanja s realnim uzorcima.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
2. Z. Jiang, K. Pflug, M. Usama, D. Kuai, X. Yan, R. Sitcheran, K. Burgess, *J. Med. Chem.*, **62** (2019) 9236 – 9245.
3. A. Horvatić, *Spektrometrija masa fragmenata peptidnih iona nastalih djelovanjem radikala*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 1.
4. J. Marcoux, C. V. Robinson, *Cell Press*, **21** (2013) 1541-1550.
5. P. M. Roos, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **52** (2019) 48-52.
6. F. Chen, B. Gülbakan, S. Weidmann, S. R. Fagerer, A. J. Ibáñez, R. Zenobi, *Mass Spectrom. Rev.* **35** (2016) 48–70.
7. A. Kurutos, I. Orehovec, A. Tomašić-Paić, I. Crnolatac, L. Horvat, N. Gadjev, I. Piantanida, T. Deligeorgiev, *Dyes Pigm.* **148** (2018) 452–459.
8. T. Pospišil, *Sinteza, karakterizacija i samoudruživanje malih peptidnih gelatora temeljenih na proteinu amilod-β*, Doktorski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2017, str. 1,7, 10, 11, 12, 16.
9. C. Grochowski, E. Blicharska, P. Krukow, K. Jonak, M. Maciejewski, D. Szczepanek, K. Jonak, J. Flieger, R. Maciejewski, *Front. Chem.*, **7** (2019) 1-14.
10. A. Alexander, M. Agrawal, A. Uddin, S. Siddique, A. M. Shehata, M. A. Shaker, S. A. U. Rahman, M. I. M. Abdul, M. A. Shaker, *Int. J. Nanomed.* **14** (2019) 5895-5909.
11. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12987-019-0133-x/figures/1> (datum pristupa: 27. kolovoza 2020.)
12. A. Alimonti, B. Bocca, A. Pino, F. Ruggieri, G. Forte, G. Sancesario, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **21** (2007) 234-241.
13. B. Michalke, V. Nischwitz, *Anal. Chim. Acta* **682** (2010) 23-36.
14. R. Albulescu, A. J. Petrescu, M. Sarbu, A. Grigore, R. Ica, C. V. A. Munteanu, A. Albulescu, Ioana V. Militaru, A.-D. Zamfir, S. Petrescu, C. Tanase, *Proteomics Technologies and Applications*, IntechOpen, 2019, str. 775-804.

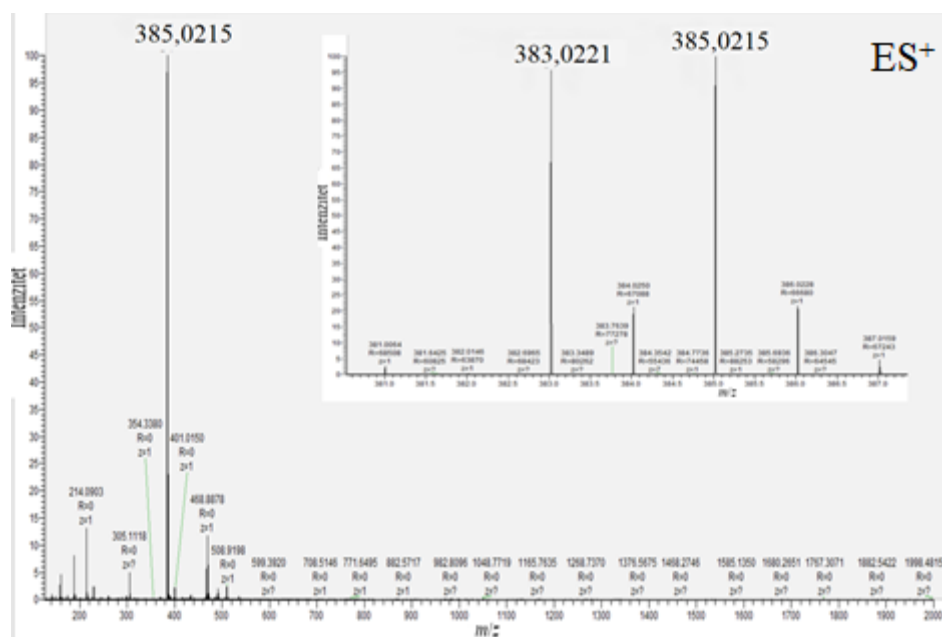


15. S. Kröger, A.-C. Niehoff, A. Jeibmann, M. Sperling, W. Paulus, W. Stummer, U. Karst, *Anal. Chem.*, **90** (2018) 12253-12260.
16. G.-Y. Pan, H.-R. Jia, Y.-X. Zhu, W. Sun, X.-T. Cheng, F.-G. Wu, *Appl. Nano Mater.*, **6** (2018) 2885-2897.
17. J. C. Akers, W. Hua, H. Li, V. Ramakrishnan, Z. Yang, K. Quan, W. Zhu, J. Li, J. Figueroa, B. R. Hirshman, B. Miller, D. Piccioni, F. Ringel, R. Komotar, K. Messer, D. R. Galasko, F. Hochberg, Y. Mao, B. S. Carter, C. C. Chen, *OncoTargets Ther*, **8** (2017) 68769-68779.
18. L. M. Young, A. E. Ashcroft, S. E. Radford, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **39** (2017) 90-99.
19. Y. Ha, O. G. Tsay, D. G. Churchill, *Monatsh. Chem.* **142** (2011) 385-398.
20. G. Ganguly, S. Chakrabarti, U. Chatterjee, L. Saso, *Drug Des., Dev. Ther.* **11** (2017) 797-810.
21. E. Bonilla, K. Tanji, M. Hirano, T. H. Vu, S. DiMauro, E. A. Schon, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1410** (1999) 171-182.
22. N. Braidy, A. Poljak, C. Marjo, H. Rutledge, A. Rich, B.-E. Judger, T. Jayasena, N. C. Inestrosa, P. S. Sachdev, *Front. Aging Neurosci.* **9** (2019) 1-16.
23. I. Hozumi, T. Hasegawa, A. Honda, K. Ozawa, Y. Hayashi, K. Hashimoto, M. Yamada, A. Koumura, T. Sakurai, A. Kimura, Y. Tanaka, M. Satoh, T. Inuzuka, *J. Neurol. Sci.* **303** (2011) 95-99.
24. R. Squitti, M. Ventriglia, M. Siotto, C. Salustri, *Biometals in Neurodegenerative Diseases*, Academic Press, London 2017, str. 19-34.
25. <https://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/72/Parkinsonova-bolest.html> (datum pristupa 01. rujna 2020.)
26. A. H. V. Schapira, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1410** (1999) 159-170.
27. G. Forte, B. Bocca, O. Senofonte, F. Petrucci, L. Brusa, P. Stanzione, S. Zannino, N. Violante, A. Alimonti, G. Sancesario, *J. Neural Transm.* **111** (2004) 1031-1040.
28. D. Willkommen, M. Lucio, P. Schmitt-Kopplin, M. Gazzaz, M. Schroeter, A. Sigaroudi, B. Michalke, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **49** (2018) 164-170.
29. P. M. Roos, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **52** (2019) 48-52.
30. A. Stojavljević, Lj. Vujotić, B. Rovčanin, S. Borković-Mitić, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, *Sci. Rep.* **10** (2020) 1-9.

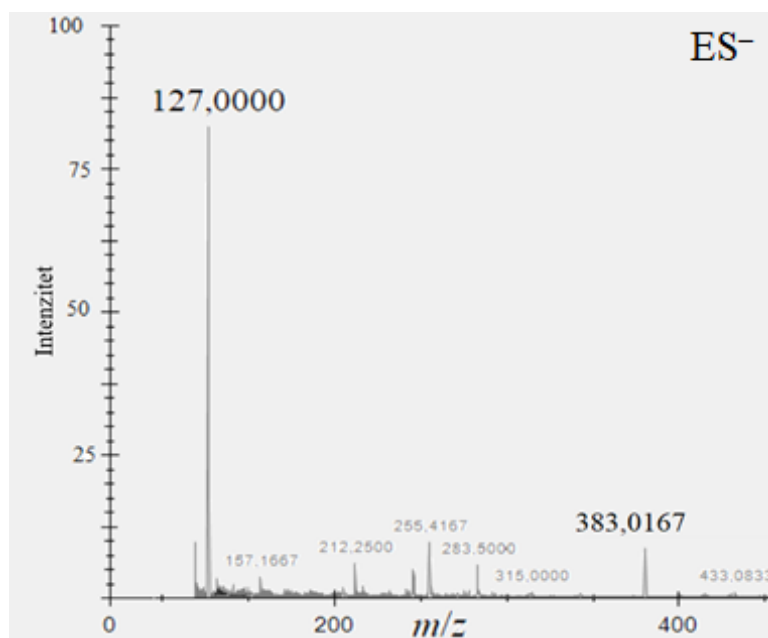
31. L. Mezzaroba, D. F. Alfieri, A. N. C. Simão, E. Maria, V. Reiche, *Neurotoxic.*, **74** (2019) 230-231.
32. S. Paranjpe, *Synthesis of Novel Fluorescent Benzothiazole Cyanine Dyes as Potential Imaging Agents*, Doktorski rad, Georgia State University, 2012., str. 1, 3, 15, 38, 39.
33. B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.* **253** (2005) 55-76.
34. L. M. Young, J. C. Saunders, R. A. Mahood, C. H. Revill, R. J. Foster, L.-H. Tu, D. P. Raleigh, S. E. Radford, A. E. Ashcroft, *Nat. Chem.* **7** (2015) 73-81.
35. P. R. Patlolla, N. Desai, S. Gupta, B. Datta, *Spectrochim. Acta, Part A* **209** (2019) 256-263.
36. O. Alexandru, A. M. Georgescu, A. Dragoi, M. E. Ciurea, C. I. Taisescu, L. G. Tataranu, C. Brindusa, M. V. Boldeanu, S. O. Purcaru, C. A. Silosi, A. Demetrian, A. Dricu, *Rev. Chim.* **70** (2019) 112-117.
37. X. Yang, C. Shi, R. Tong, W. Qian, H. E. Zhau, R. Wang, G. Zhu, J. Cheng, V. W. Yang, T. Cheng, M. Henary, L. Strekowski, L. W. K. Chung, *Clin. Cancer Res.*, **16(10)** (2010) 2833-2844.
38. I. Crnolatac, L.-M. Tumir, N. Y. Lesev, A. A. Vasilev, T. G. Deligeorgiev, K. Mišković, Lj. Glavaš-Obrovac, O. Vugrek, I. Piantanida, *ChemMedChem* **8** (2013) 1093-1103.
39. Y. Guan, Y. Zhang, L. Xiao, J. Li, J.-P. Wang, M. D. Chordia, Z.-Q. Liu, W. K. Chung, W. Yue, D. Pan, *Mol. Pharmaceutics*, **14** (2017) 1-13.
40. M. T. Jeena, S. Kim, S. Jin, J.-H. Ryu, *Cancers* **4** (2019) 1-20.
41. S. Luo, X. Tan, S. Fang, Y. Wang, T. Liu, X. Wang, Y. Yuan, H. Sun, Q. Qi, C. Shi, *Adv. Funct. Mater.* **26** (2016) 2826-2835.
42. B. L. Schottel, H. T. Chifotides, K. R. Dunbar, *Chem. Soc. Rev.* **37** (2008) 68-83.
43. J. Cao, J. Chi, J. Xia, Y. Zhang, S. Han, Y. Sun, *Appl. Mater. Interfaces* **11** (2019) 25720-25729.
44. R. G. Thomas, Y. Y. Jeong, *Chonnam Med. J.* **53** (2017) 83-94.
45. G. Vladilo, A. Hassanali, *Life (Basel, Switz.)* **8(1)** (2018) 1-22.
46. D. Kuczyńska-Wiśnik, S. Kędzierska, E. Matuszewska, P. Lund, A. Taylor, B. Lipińska, E. Laskowska, *Br. Microbiol. Res. J.* **148** (2002) 1757-1765.
47. <https://www.uniprot.org/uniprot/P0C054> (datum pristupa: 11. rujna 2020.)
48. M. A. Kaczorowska, B. Jędrzejewska, *J. Mass Spectrom.* **54** (2019) 592-599.

- 
49. D. Gembarovski, *Strukturna karakterizacija makrolida i njihovih derivata spektrometrijom masa*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011, str. 21-23.
  50. T. M. Melø, C. Larsen, L. R. White, J. Aasly, T. E. Syøbakk, T. P. Flaten, U. Sonnenwald, T. Syversen, *Biol. Trace Elem. Res.* **93** (2003) 1-8.
  51. K. Gellein, J. H. Skogholt, J. Aaseth, G. B. Thoresen, S. Lierhagen, E. Steinnes, T. Syversen, T. P. Flaten, *J. Neurol. Sci.* **266** (2008) 70-78.
  52. K. T. Aspli, T. P. Flaten, P. M. Roos, T. Holmøy, J. H. Skogholt, J. Aaseth, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **31** (2015) 183-187.
  53. T. Šmilehner, M. Badovinac, I. Piantanida, *New J. Chem.*, **42** (2018) 6655-6663.

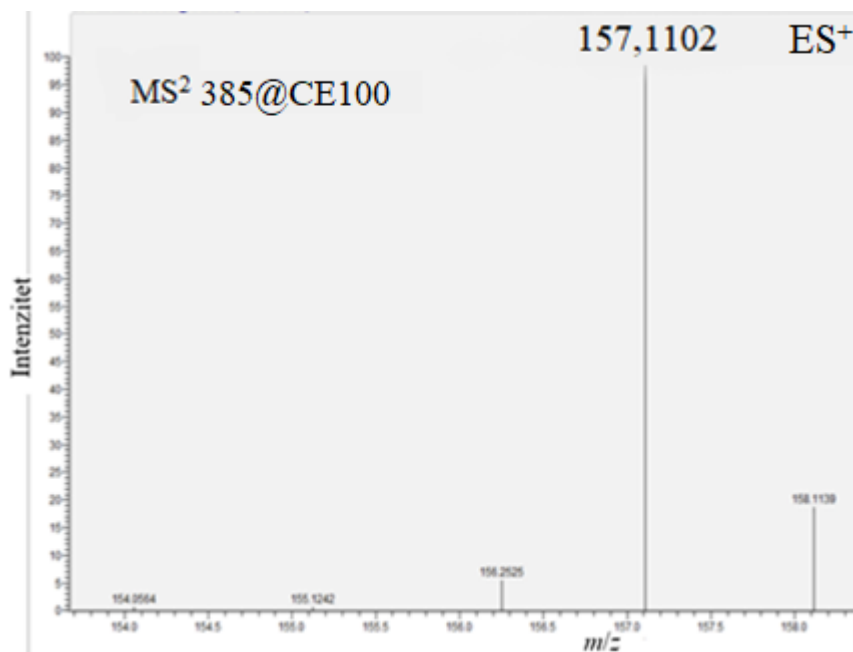
## § 7. DODATAK



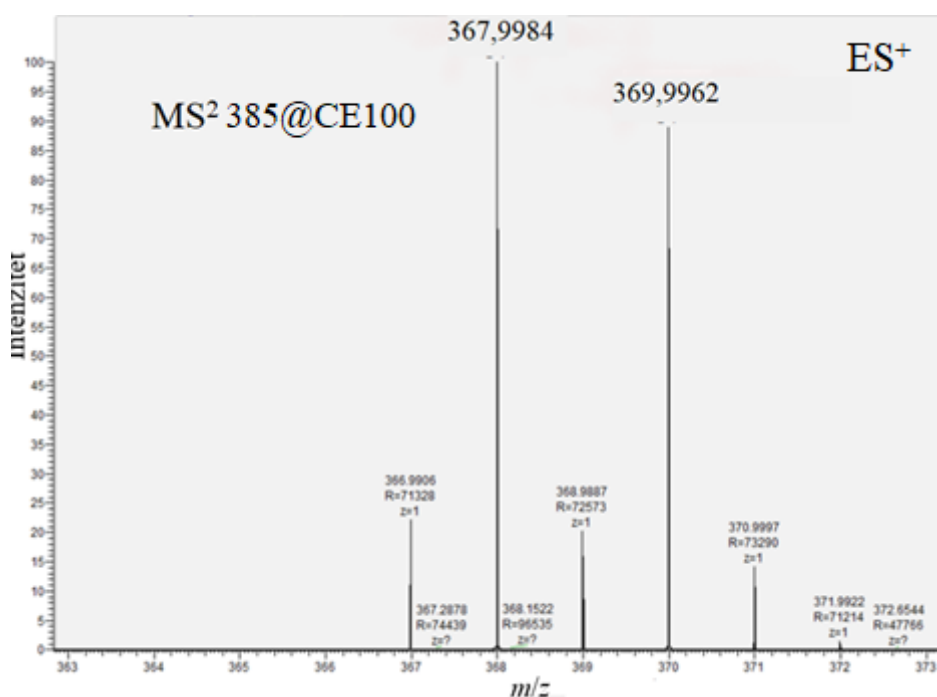
Slika D1. Cjelokupni spektar FTMS ES<sup>+</sup> markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) s umetkom na kojem je prikazan uvećani i razvučeni spektar signala  $m/z = 385$ , izolacijska širina =  $\pm 1$ .



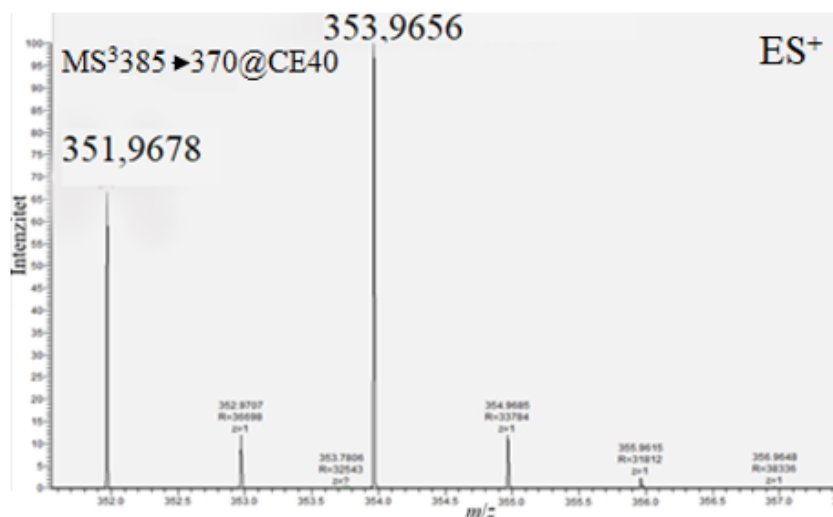
Slika D2. Cjelokupni spektar ITMS ES<sup>-</sup> (negativan način ionizacije) markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), izolacijska širina =  $\pm 1$ .



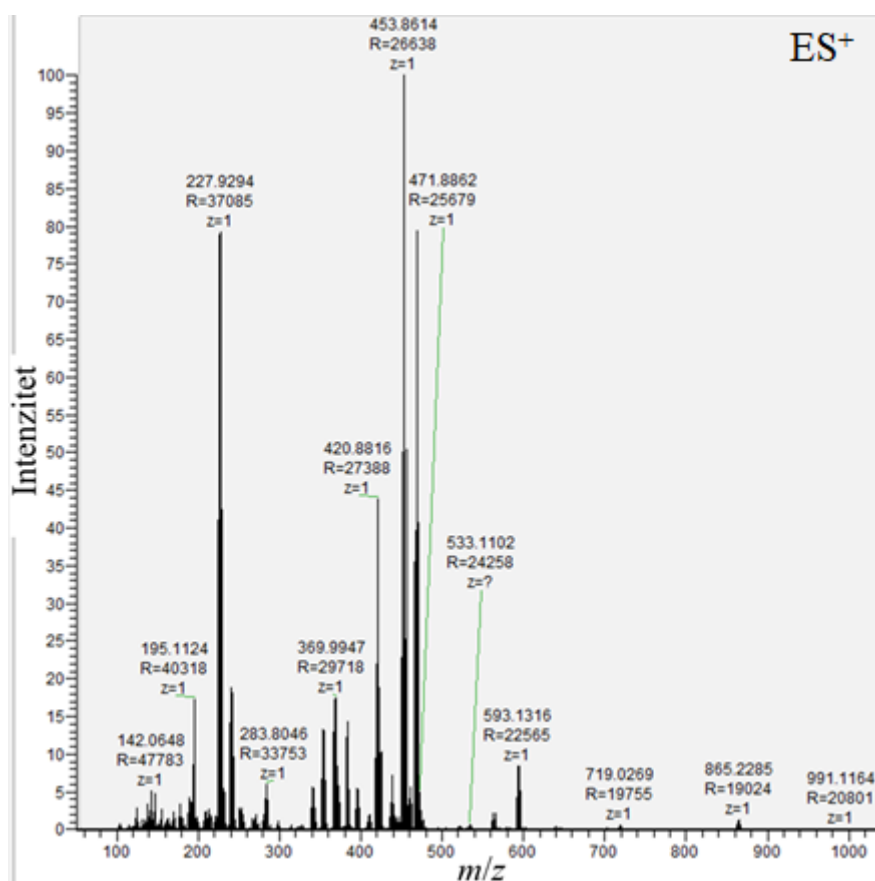
Slika D3. Uvećani spektar ITMS<sup>2</sup> ES<sup>+</sup> markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) s istaknutim signalom fragmenta  $m/z = 157$  (CE = 100 eV), izolacijska širina =  $\pm 1$ .



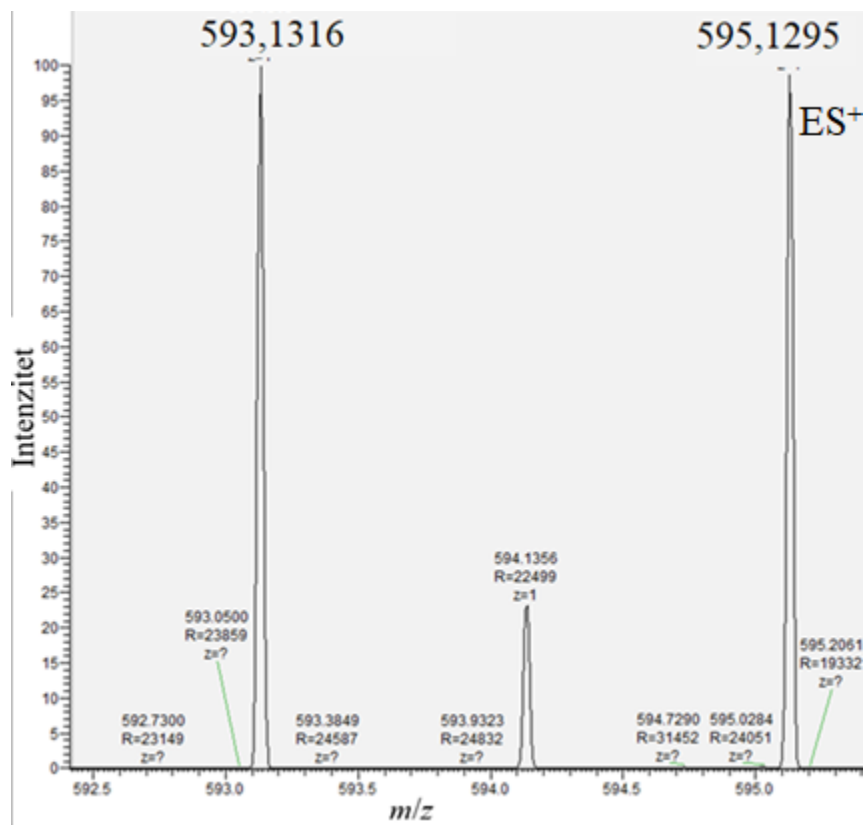
Slika D4. Uvećani i razvučeni spektar FTMS<sup>2</sup> ES<sup>+</sup> markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) s istaknutim signalima fragmenta  $m/z = 370$  (CE = 100 eV), izolacijska širina =  $\pm 1$ .



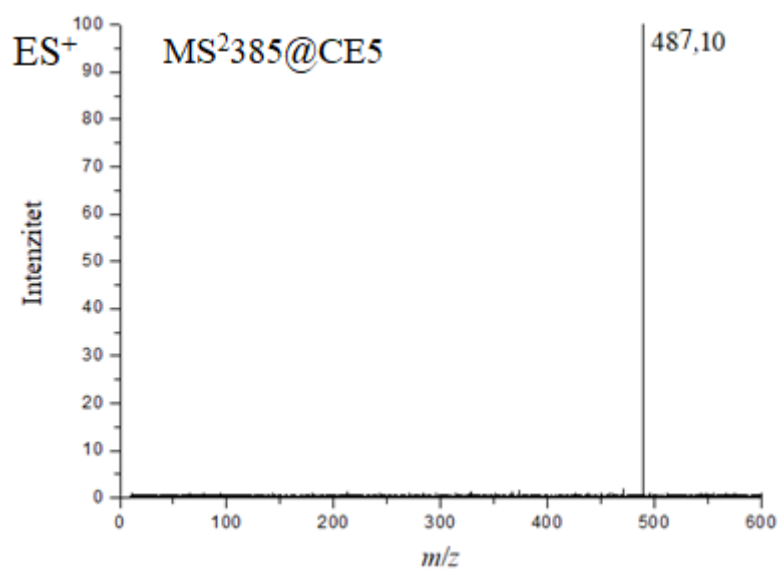
Slika D5. Uvećani i razvučeni spektar FTMS<sup>3</sup> ES<sup>+</sup> markera 1 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 38,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) s istaknutim signalima fragmenta  $m/z = 354$  (CE = 40 eV), izolacijska širina =  $\pm 1$ .



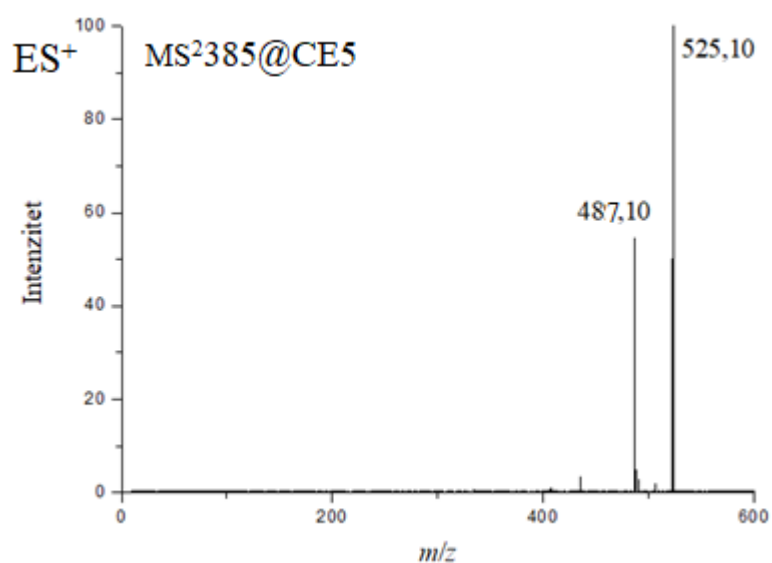
Slika D6. Cjelokupni spektar FTMS ES<sup>+</sup> markera 3 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 17,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), izolacijska širina =  $\pm 1$ .



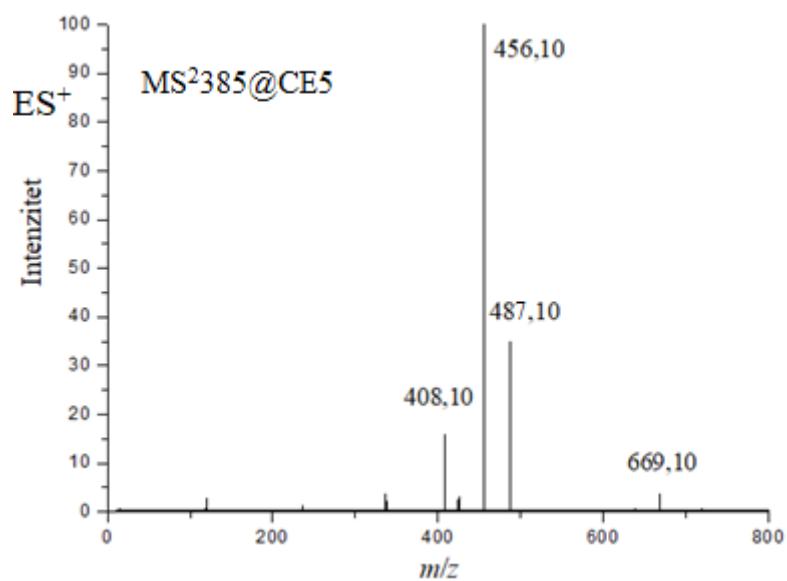
Slika D7. Uvećani i razvučeni spektar FTMS  $ES^+$  markera 3 (otopljenog u otopini amonijevog acetata, acetonitrila i vode,  $c = 17,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) s istaknutim signalima fragmenta  $m/z = 595$ , izolacijska širina =  $\pm 1$ .



Slika D8. Spektar  $MS^2 ES^+$  fragmentiranja signala  $m/z = 487$  kompleksa  $FFA-Zn^{2+}$  (otopljenog u metanolu, omjer 1:2), izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 5 eV).

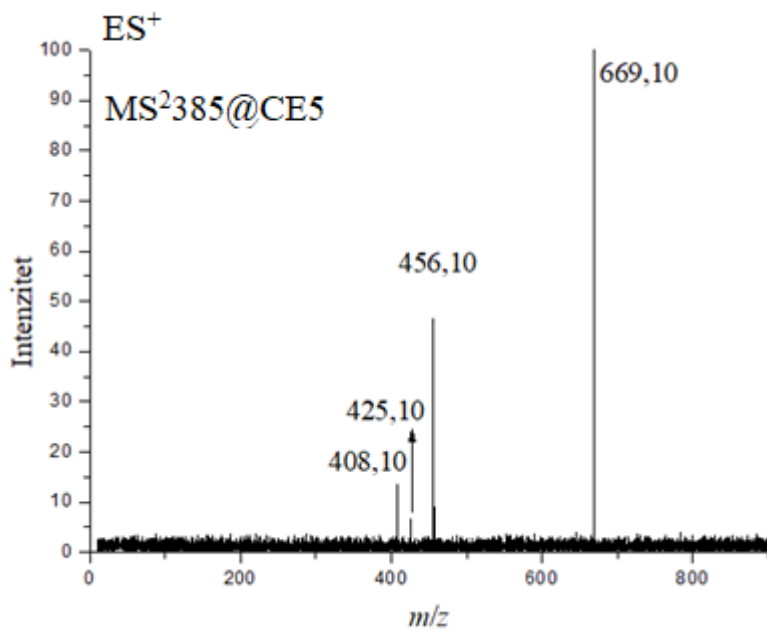


Slika D9. Spektar MS<sup>2</sup> ES<sup>+</sup> fragmentiranja signala  $m/z = 525$  kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (otopljenog u metanolu, omjer 1:2), izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 5 eV).

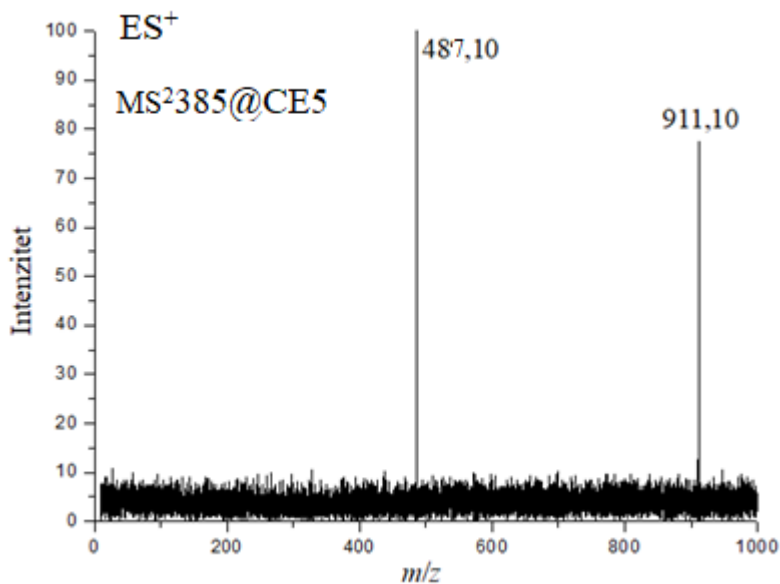


Slika D10. Spektar MS<sup>2</sup> ES<sup>+</sup> fragmentiranja signala  $m/z = 669$  kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (otopljenog u metanolu, omjer 1:2), izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 5 eV).

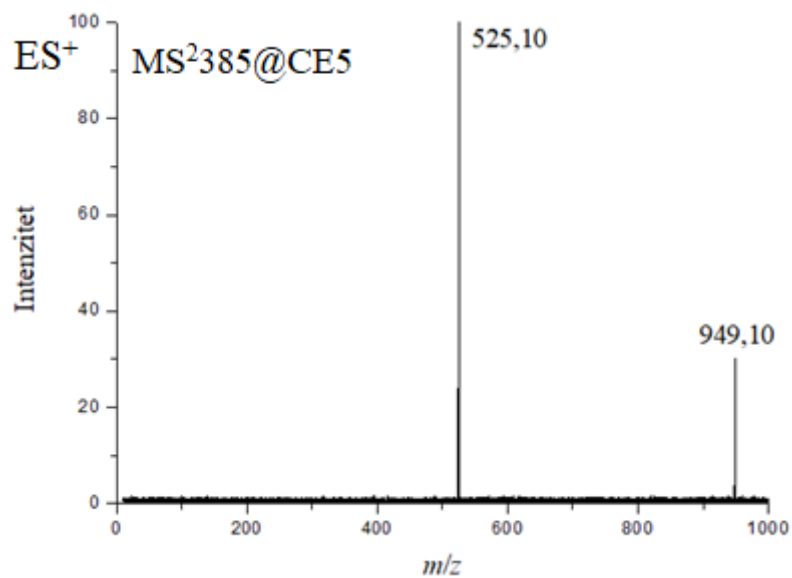




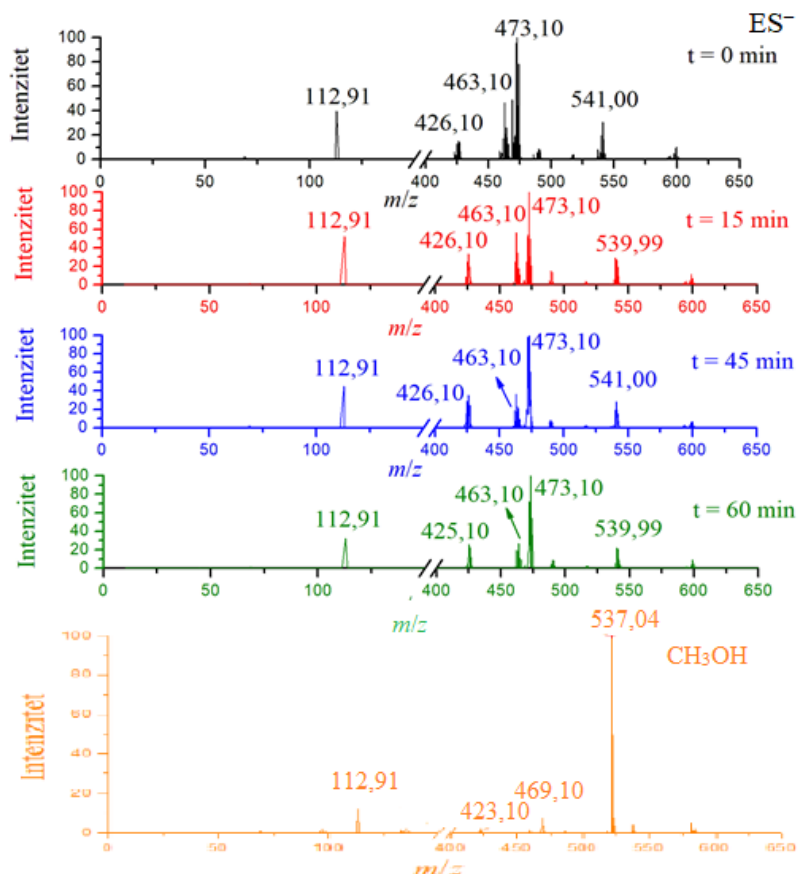
Slika D11. Spektar  $MS^2 ES^+$  fragmentiranja signala  $m/z = 880$  kompleksa FFA- $Zn^{2+}$  (otopljenog u metanolu, omjer 1:2), izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 5 eV).



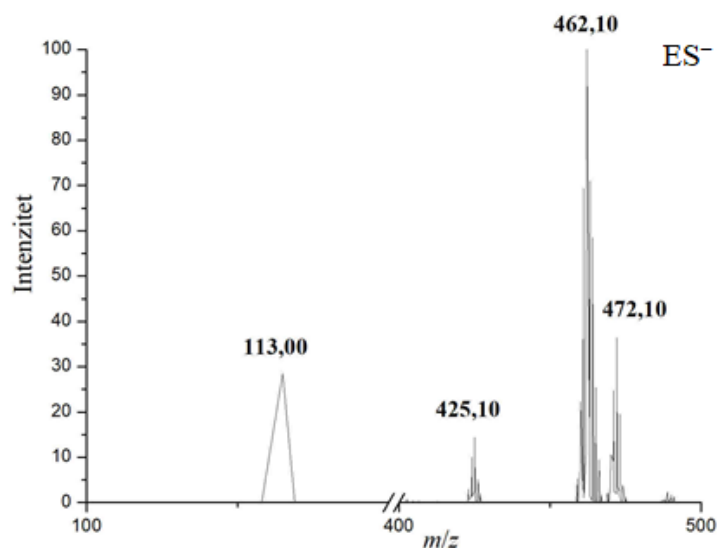
Slika D12. Spektar  $MS^2 ES^+$  fragmentiranja signala  $m/z = 911$  kompleksa FFA- $Zn^{2+}$  (otopljenog u metanolu, omjer 1:2), izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 5 eV).



Slika D13. Spektar MS<sup>2</sup> ES<sup>+</sup> fragmentiranja signala  $m/z = 949$  kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (otopljenog u metanolu, omjer 1:2), izolacijska širina =  $\pm 1$  (CE = 5 eV).



Slika D14. Usporedba cjelokupnih spektara MS ES<sup>-</sup> tripeptida FFA (otopljenog u deuteriranom etanolu) snimljenih odmah nakon pripreme otopine te nakon 15, 45 i 60 minuta sa cjelokupnim spektrom MS ES<sup>-</sup> FFA (otopljenog u metanolu), izolacijska širina = ±1.



Slika D15. Cjelokupni spektar MS ES<sup>-</sup> kompleksa FFA-Zn<sup>2+</sup> (otopljenog u deuteriranom etanolu, omjer 1:2), izolacijska širina = ±1.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ružica Šoić

Datum rođenja: 19. travnja 1995.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Mihaela Šiloboda, Sveti Martin pod Okićem

2010.–2014. Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Samobor

2014.–2018. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2018.–2020. Diplomski studij kemije, smjer: analitička i anorganska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020. Erasmus+ KA103 SMP, International Centre for Cancer Vaccine Science, Gdansk (Poljska)

### Nagrade i priznanja

2020. Rektorova nagrada

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. i 2019. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Rokov Plavec, Jasmina; Ević, Valentina; Kekez, Mario; Kekez, Ivana; **Šoić, Ružica**; Houser, Josef; Wimmerová, Michaela; Matković-Čalogović, Dubravka, *Importance of the disulfide link in the stability of cytosolic protein*, ARBRE-MOBIEU Plenary Meeting - Living Molecules: towards Integrative Biophysics of the Cell, Prag, Češka, 2020.