

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA NAHTIGAL

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA NAHTIGAL

**VREDNOTENJE IZBRANIH SPOJIN S SPOSOBNOSTJO
KELACIJE KOVINSKIH IONOV KOT ANTIOKSIDANTOV**

**EVALUATION OF SELECTED COMPOUNDS WITH
ABILITY OF CHELATING METAL IONS AS
ANTIOXIDANTS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. Celotno eksperimentalno delo je bilo opravljeno na Katedri za farmacevtsko kemijo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Janezu Mravljaku za vse nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge ter pomoč v laboratoriju. Hvala tudi osebju Katedre za farmacevtsko kemijo za izkazano pomoč.

Velika hvala tudi moji družini, prijateljem in sodelavcem za vse vzpodbudne besede tekom nastajanja magistrske naloge. Bili ste mi v veliko pomoč.

Hvala tudi vsem, ki niste bili posebej omenjeni, pa ste vseeno doprinesli k nastanku te naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Nina Nahtigal

Ljubljana, 2018

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Barbara Ostanek

Mentor: izr. prof. dr. Janez Mravljak

Član komisije: izr. prof. dr. Igor Locatelli

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
SEZNAM SLIK	VII
SEZNAM PREGLEDNIC	IX
1. UVOD	1
1.1. OKSIDATIVNI STRES	1
1.1.1. Nastanek radikalov	1
1.1.2. Fentonova reakcija.....	2
1.1.3. Uravnavanje oksidativnega stresa	2
1.1.4. Vrednotenje antioksidantov – Ferozinski test	4
1.1.5. Določanje oksidativnega stresa	5
1.2. VLOGA BAKROVIH IN ŽELEZOVH IONOV V ORGANIZMU	6
1.2.1. Elektronska konfiguracija železa.....	6
1.2.2. Elektronska konfiguracija bakra.....	7
1.3. VPLIV OKSIDATIVNEGA STRESA NA RAZVOJ ALZHEIMERJEVE BOLEZENI (AD)	7
1.4. VLOGA PIRIMIDINSKIH DERIVATOV V KOZMETIČNIH PRIPRAVKIH. 10	
1.5. UV-Vis ABSORPCIJSKA SPEKTROSKOPIJA.....	10
1.5.1. Beer-Lambertov zakon	11
1.6. FLUORESCENČNA SPEKTROSKOPIJA	12
2. NAMEN DELA.....	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1. VZORCI.....	15
3.2. TOPILA IN REAGENTI	16
3.3. MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATURE	17
3.3.1. Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader, BioTek.....	17
3.3.2. UV – Vis spektrofotomer Cary 50 Conc, Varian	18
4. EKSPERIMENTALNO DELO	19
4.1. ASKORBATNI TEST - TEST INHIBICIJE FENTONOVE REAKCIJE, KATALIZIRANE S Cu ²⁺ IONI.....	19

4.2.	ASKORBATNI TEST - TEST INHIBICIJE FENTONOVE REAKCIJE, KATALIZIRANE Z Fe^{3+} IONI	22
4.3.	FEROZINSKI TEST.....	24
4.4.	STABILNOST KOMPLEKSA FEROZIN- Fe^{2+} BREZ PRISOTNOSTI LIGANDA (VZORCA) IN OB PRISOTNEM LIGANDU	26
4.5.	DOLOČITEV STEHIOMETRIJSKEGA RAZMERJA S TITRACIJO Z Fe^{3+} IONI 27	
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1.	ASKORBATNI TEST - TEST INHIBICIJE FENTONOVE REAKCIJE, KATALIZIRANE S Cu^{2+} IONI.....	28
5.2.	ASKORBATNI TEST - TEST INHIBICIJE FENTONOVE REAKCIJE, KATALIZIRANE Z Fe^{3+} IONI	34
5.3.	FEROZINSKI TEST.....	44
5.4.	STABILNOST KOMPLEKSA FEROZIN- Fe^{2+} BREZ PRISOTNOSTI LIGANDA (VZORCA) IN OB PRISOTNEM LIGANDU	46
5.5.	DOLOČITEV STEHIOMETRIJSKEGA RAZMERJA MED VZORCEM IN Fe^{3+} S TITRACIJO Z Fe^{3+} IONI	49
6.	SKLEPI	52
7.	LITERATURA.....	53

POVZETEK

Oksidativni stres je posebna oblika stresa, ki se pojavi zaradi prevelike tvorbe radikalov in/ali zmanjšane obrambne učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Med najnevarnejše procese nastanka radikalov spada Fentonova reakcija. Gre za pomemben način tvorbe hidroksilnega radikala preko redukcije vodikovega peroksida z železovimi ali bakrovimi ioni, ki pa je za naše celice izjemno toksičen. Oksidativni stres je tako v veliki meri odgovoren za nastanek številnih bolezni ali pa je njihov zvesti spremljevalec kot npr. pri Alzheimerjevi bolezni in prezgodnjem staranju. Z razvojem spojin, ki bi bile sposobne vezati kovinske ione in tako upočasniti oziroma zavreti Fentonovo reakcijo, bi naredili ogromen korak k zdravljenju teh bolezni.

V magistrsko nalogo smo tako vključili osem spojin in ovrednotili njihove antioksidativne sposobnosti. V prvem sklopu testiranja smo izvedli askorbatni test z Fe^{3+} in Cu^{2+} ioni, kjer smo spremljali potek Fentonove reakcije preko porasta fluorescence. Kar nekaj spojin je izkazalo dobro zmožnost vezave ionov (ZJ-176, NLS-1, NLS-6 in 7), vendar smo v nadaljnja testiranja vključili dve najboljši (ZJ-176 in NLS-6). Izvedli smo ferozinski test in spektrofotometrično titracijo z Fe^{3+} ioni, kjer smo opazovali specifične premike absorbančnih spektrov ter določili stehiometrijsko razmerje ligand-kovinski ion v nastalih kompleksih. Ferozin tvori z Fe^{2+} ioni obarvan kompleks, ki ga zaznamo spektrofotometrično pri 562 nm. Ker ne vemo, ali naši spojini vežeta Fe^{2+} ione, spekter ferozinskega kompleksa pa se je po dodatku naše spojine zmanjšal, smo ta pojav delno pripisali oksidaciji Fe^{2+} do Fe^{3+} ionov, saj je bila raztopina v kivetu v stiku s kisikom iz zraka med samo meritvijo. Da pa naši spojini zelo dobro vežeta Fe^{3+} ione, smo dokazali tudi pri askorbatnem testu in nadalje pri določitvi stehiometrijskega razmerja. Absorpcijski spekter spojine ZJ-176 je po dodatku Fe^{3+} ionov ves čas naraščal, spremembe v naklonu nismo zaznali, kar nakazuje na to, da ena molekula ZJ-176 veže več kot tri molekule železa. Pri spojini NLS-6 smo zaznali spremembo v naklonu, kar bi lahko predstavljalo nasičenje spojine z Fe^{3+} ioni in nastanek kompleksa NLS-6- Fe^{3+} v razmerju 1:4. Spojina NLS-6 tako veže vsaj 4 ione železa, kar pa bi morali potrditi še z drugimi analznimi tehnikami. Obe spojini sta izkazali dobre antioksidativne sposobnosti, zato bi ju bilo smiselno vključiti v nadaljnja testiranja.

Ključne besede: oksidativni stres, Fentonova reakcija, kovinski ioni, antioksidanti, Alzheimerjeva bolezen

ABSTRACT

Oxidative stress is a particular type of stress which occurs due to excessive formation of radicals and/or reduced defence efficiency of antioxidant systems. Among the most dangerous processes of the formation of radicals is Fenton's reaction. It is an important mode of forming a hydroxyl radical through the reduction of hydrogen peroxide with iron or copper ions, which is extremely toxic for our cells. Oxidative stress is therefore largely responsible for the emergence of many diseases, or is their loyal companion, such as Alzheimer's disease and premature aging. By developing compounds that would be able to bind metal ions to slow down or inhibit Fenton's reaction, we would take a huge step towards treating these diseases.

We included eight compounds into this Master's Thesis and evaluated their antioxidant abilities. In the first phase, an ascorbate test was carried out with Fe^{3+} and Cu^{2+} ions, where Fenton's reaction was monitored through fluorescence increase. Several compounds expressed good ion-binding capacity (ZJ-176, NLS-1, NLS-6 and 7), but in the subsequent testing we included the best two (ZJ-176 and NLS-6). We conducted a ferrozine test and a spectrophotometric titration with Fe^{3+} ions to observe specific displacements of the absorbance spectra and determine the stoichiometric ratio of the ligand-metal ion in the resulting complexes. Ferrozine forms a colored complex with Fe^{2+} ions, which is spectrophotometrically detected at 562 nm. Since we do not know, whether our compounds binds Fe^{2+} ions, the spectrum of the ferrozine complex decreased after the addition of our compound, this phenomenon was partly attributed to the oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} ions since the solution in cuvette was namely in contact with oxygen from the air during the measurement. We have also proved in ascorbate test that our compounds have a great ability to bind Fe^{3+} ions and further in determining the stoichiometric ratio. The absorbance spectrum of the ZJ-176 compound was increasing after addition of Fe^{3+} ions. No changes were detected in slope, suggesting that one ZJ-176 molecule binds more than three iron molecules. In the NLS-6 compound, a change in slope was detected, which could represent a saturation of the NLS-6 with Fe^{3+} ions and formation of the NLS-6- Fe^{3+} complex in ratio 1:4. One NLS-6 molecule thus binds at least four iron ions, which should be confirmed by other analytical techniques. Both compounds have demonstrated good antioxidative capabilities, so it would be worthwhile to include them in further evaluations.

Keywords: oxidative stress, Fenton's reaction, metal ions, antioxidants, Alzheimer's disease

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
AD	Alzheimerjeva bolezen (<i>angl.</i> Alzheimer`s disease)
Asc	askorbinska kislina
A β	beta amiloidni peptid
CCA	kumarin 3-karboksilna kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl.</i> deoxyribonucleic acid)
GSH	glutation
GSSG	dimerna oblika glutationa
M	molekulska masa
mH ₂ O	voda, prečiščena z MilliQ sistemom
OS	oksidativni stres
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (<i>angl.</i> reactive oxygen species)
T	prepustnost, transmitanca
UV	ultravijolična (svetloba)
Vis	vidna (svetloba)

SEZNAM SLIK

Slika 1: Struktura kompleksa ferozin-Fe ²⁺	5
Slika 2: Elektronska konfiguracija Fe ³⁺ iona.....	6
Slika 3: Elektronska konfiguracija Cu ⁺ in Cu ²⁺ iona.....	7
Slika 4: Struktura β amiloidnega peptida.	9
Slika 5: Kliokvinol; hidrofobni Cu/Zn kelator.	9
Slika 6: Struktura molekule pirimidina.	10
Slika 7: Pot svetlobe skozi kiveto debeline l.	11
Slika 8: Jablonskijev diagram (levo) in Stokesov premik (desno).	13
Slika 9: Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader, proizvajalca BioTek...	18
Slika 10: UV – Vis spektrofotometer Cary 50 Conc, proizvajalca Varian.....	18
Slika 11: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu ²⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-176.	28
Slika 12: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu ²⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-167_1.	29
Slika 13: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu ²⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-70.	29
Slika 14: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu ²⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-1.	30
Slika 15: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu ²⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-2.	30
Slika 16: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu ²⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-5.	31
Slika 17: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu ²⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-6.	31
Slika 18: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu ²⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-7.	32
Slika 19: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-176.	34
Slika 20: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-176, brez EDTA.	35
Slika 21: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-167_1.	35
Slika 22: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-167_1, brez EDTA.	36
Slika 23: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-70.	36
Slika 24: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-70, brez EDTA.	37
Slika 25: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-1.	37

Slika 26: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-1, brez EDTA.....	38
Slika 27: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-2.	38
Slika 28: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-2, brez EDTA.....	39
Slika 29: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-5.	39
Slika 30: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-5, brez EDTA.....	40
Slika 31: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-6.	40
Slika 32: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-6, brez EDTA.....	41
Slika 33: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-7.	41
Slika 34: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe ³⁺ ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-7, brez EDTA.....	42
Slika 35: Stabilnost kompleksa ferozin-Fe ²⁺ pri 562 nm v prisotnosti spojine ZJ-176.....	44
Slika 36: UV-Vis spektri kompleksa ferozin-Fe ²⁺ pri 562 nm v prisotnosti raztopine vzorca ZJ-176, merjeni v 30 minutnih intervalih.....	44
Slika 37: Stabilnost kompleksa ferozin-Fe ²⁺ pri 562 nm v prisotnosti spojine NLS-6.	45
Slika 38: UV-Vis spektri kompleksa ferozin-Fe ²⁺ pri 562 nm v prisotnosti raztopine vzorca NLS-6, merjeni v 30 minutnih intervalih.	45
Slika 39: Stabilnost kompleksa ferozin-Fe ²⁺ pri 562 nm.	46
Slika 40: UV-Vis spektri kompleksa ferozin-Fe ²⁺ pri 562 nm, merjeni v 20 minutnih intervalih.....	47
Slika 41: Odsotnost kompleksa ferozin-Fe ²⁺ pri 562 nm.	47
Slika 42: Primerjava naklonov krivulj ob prisotnem ligandu (vzorcu) in brez prisotnega liganda pri 562 nm.....	48
Slika 43: A) Spektrofotometrična UV-Vis titracija 20 μM ZJ-176 v prisotnosti 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 in 50 μM FeCl ₃ . B) Grafični prikaz nastanka kompleksa ZJ-176-Fe ³⁺ pri 235 nm.....	49
Slika 44: A) Spektrofotometrična UV-Vis titracija 20 μM NLS-6 v prisotnosti 0, 1, 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 82, 90, 98 in 106 μmol/L FeCl ₃ . B) Grafični prikaz nastanka kompleksa NLS-6-Fe ³⁺ pri 345 nm.....	50
Slika 45: Struktura molekule (<i>E</i>)-5-(4-hidroksistiril)kinolin-8-ol.....	51

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Mehanizem in mesto delovanja pomembnejših encimskih antioksidantov. . .	3
Preglednica II: Mehanizem in mesto delovanja pomembnejših ne-encimskih antioksidantov.....	4
Preglednica III: Prikaz testiranih spojin.	15
Preglednica IV: Mase vzorcev in ustrezni volumni topila 1, potrebnih za pripravo osnovnih raztopin.	19
Preglednica V: Prikaz pipetiranja raztopin.....	21
Preglednica VI: Mase vzorcev in ustrezni volumni topila 1, potrebnih za pripravo osnovnih raztopin.	22
Preglednica VII: Prikaz pipetiranja raztopin.	23
Preglednica VIII: Masi vzorcev in ustrezna volumna topila 2, potrebna za pripravo raztopin vzorcev.	25
Preglednica IX: Prikaz redčenja osnovnih raztopin vzorcev do predpisane koncentracije.	27
Preglednica X: Prikaz % maksimalne vrednosti po 20 minutah za posamezno spojino.	33
Preglednica XI: Prikaz intenzitet fluorescenc po 30 minutah in 24 urah za posamezno spojino.	43

1. UVOD

1.1. OKSIDATIVNI STRES

Vsakodnevno smo izpostavljeni različnim oblikam stresa, tako fizičnemu, psihičnemu ali kemičnemu, kar negativno vpliva na nas. Dandanes je te izpostavljenosti preveč, kar ima za naš organizem zagotovo škodljive posledice. Posebno obliko stresa imenujemo oksidativni stres (OS), kjer gre za patološko stanje, ki se pojavi zaradi zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov in/ali prevelike tvorbe radikalov. Tej obliki stresa so izpostavljeni vsi aerobni organizmi, ki pridobivajo energijo s pomočjo kisika. Nase opozori šele ob izbruhu določenih bolezni, zato je nekako nevidno vpleten v naše življenje. Glavni razlog za OS predstavlja prekomerni nastanek t.i. reaktivnih kisikovih zvrsti - ROS (*angl.* reactive oxygen species), česar se dandanes dodobra zavedamo. Ključni problem ostaja njegovo zaznavanje, kar bi nam omogočilo pravočasno ukrepanje in preprečilo nastanek marsikatere bolezni. Onesnaženost okolja in hiter življenjski slog sta zagotovo vodilna dejavnika, ki poleg vseh ostalih pospešujeta nastanek OS. Prav tako se OS poveča pri izjemnem telesnem naporu. Takrat namreč potekajo oksidativni procesi v večjem obsegu, kar ima za posledico povečano nastajanje ROS (1).

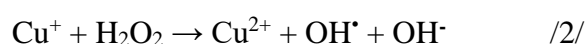
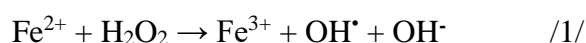
1.1.1. Nastanek radikalov

Radikali so molekule, atomi ali ioni, ki vsebujejo vsaj en nesparjen valenčni elektron. Le-ti pogosto izvirajo iz molekul, ki imajo v svoji strukturi kisik, dušik ali žveplo. So izjemno reaktivni in venomer težijo k zapolnitvi vrzeli na eni izmed orbital, zaradi česar radikali hitro reagirajo s sosednjimi molekulami, najpogosteje na tri načine: z odvzemom atoma vodika, z adicijo na dvojno vez ali z reakcijo z drugim radikalom. Reakcije med radikali in neradikali so še posebej pomembne, saj pri tovrstnih reakcijah vedno nastane nov radikal. Že en sam radikal lahko tako sproži verižno reakcijo.

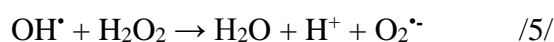
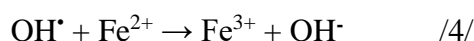
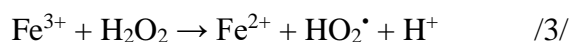
ROS se lahko vežejo na baze nukleinskih kislin, stranske verige proteinov in dvojne vezi nenasičenih maščobnih kislin ter tako povzročijo nastanek OS, ki je v veliki meri odgovoren za nastanek vnetnih bolezni, kardiovaskularnih bolezni, raka, diabetesa, Alzheimerjeve bolezni, avtizma in staranja (2).

1.1.2. Fentonova reakcija

Fentonova reakcija je glavni način tvorbe škodljivih radikalov. Gre namreč za pomemben način tvorbe hidroksilnega radikala (OH^\bullet) v organizmu, preko redukcije vodikovega peroksida. Pomembno vlogo odigrajo železovi in bakrovi ioni, ki povzročijo redukcijo vodikovega peroksida do OH^\bullet in hidroksilnega aniona preko vmesnega kompleksa /1, 2/. Nastali OH^\bullet reagira nadalje tako, da pritegne vodikov atom, kjer nastane molekula vode in nov radikal. Če ta vodikov atom izvira iz molekule maščobne kisline, lahko to pomeni začetek peroksidacije nenasičenih maščobnih kislin in fosfolipidov (1, 3).



Fe^{3+} lahko prav tako vstopa v reakcije s H_2O_2 , vendar je njihov potek počasnejši, kot pa z Fe^{2+} /3/ (4). Možne so tudi nekatere druge reakcije /4, 5/:



1.1.3. Uravnavanje oksidativnega stresa

V telesu obstaja naravni obrambni sistem, ki je sposoben preprečiti škodljivo delovanje radikalov. Sestavlja ga encimski sistem in snovi, imenovane antioksidanti. Poznamo primarni, sekundarni in terciarni obrambni mehanizem. Primarni obrambni mehanizem skuša v telesu preprečiti nastanek radikalov. Pri sekundarnem mehanizmu skuša telo nevtralizirati radikale, terciarni pa je odgovoren za popravilo morebitnih poškodb, ki so nastale zaradi škodljivega delovanja radikalov. Sam obrambni sistem je v organizmu razdeljen na znotraj- ali zunajcelično raven. V krvni plazmi in v zunajceličnem prostoru delujejo kot antioksidantna zaščita vse snovi, ki imajo redukcijske sposobnosti za nasičenje elektronskega primanjkljaja. To so tioli, glutation, bilirubin, sečna kislina, albumini, holesterol in eksogene snovi (tokoferoli, askorbinska kislina, polifenoli in bioflavonoidi). Znotraj same celice pa nastane glavnina radikalov v lipidnih plasteh, zato so tudi lipofilni

antioksidanti prva obramba pred škodljivim delovanjem ROS. Poznejšo obrambno linijo pa predstavljajo vodotopni vitamini (vitamin C in nekateri vitamini skupine B) (1).

Antioksidanti so torej snovi, ki reagirajo z radikali in jih nevtralizirajo ter tako preprečijo nadaljnje verižne radikalske reakcije. Tako upočasnijo ali preprečijo oksidacijo pomembnih bioloških molekul. V strukturi imajo vsaj en vodik, ki ga radikal zlahka odtegne. Glede na kemijsko strukturo, ločimo antioksidante na encimske (preglednica I) in ne-encimske snovi (preglednica II), po topnosti pa na hidrofobne in hidrofilne. Slabost antioksidantov je, da ne zmorejo ločiti med reaktivnimi zvrstmi, ki imajo koristno fiziološko vlogo in tistimi, ki povzročajo oksidativne poškodbe bioloških molekul. Zato lahko velika količina določenih antioksidantov deluje prooksidativno in še poveča OS. Učinek antioksidanta je tako odvisen predvsem od odmerka in stanja v telesu (1, 5).

Encimski antioksidanti:

Preglednica I: Mehanizem in mesto delovanja pomembnejših encimskih antioksidantov (1, 6, 7).

	ANTIOKSIDANT	MEHANIZEM DELOVANJA	MESTO DELOVANJA
1	Superoksid dismutaza (SOD)	Dismutacija superoksidnega radikala v vodikov peroksid in vodo	Citosol, mitohondriji
2	Glutation peroksidaza	Redukcija organskih peroksidov ali vodikovega peroksida do vode, pri čemer se glutacion oksidira	Citosol, mitohondriji
3	Glutation reduktaza	Katalizira prenos elektronov z NADPH na disulfidno vez GSSG	Citosol
4	Katalaza	Odstranjevanje vodikovega peroksida in s tem preprečevanje nastanka hidroksilnega radikala	Peroksisomi, citosol
5	Tioredoksin in tioredoksin reduktaza	Regeneracija antioksidantnih molekul (ubikinon, lipojska in askorbinska kislina) - redukcija disulfidnih vezi	Citosol

Ne-encimski antioksidanti:

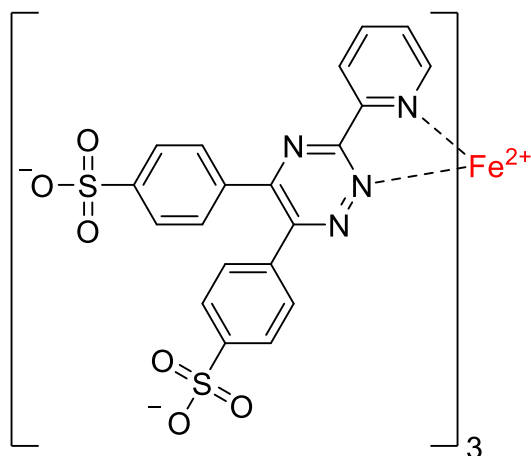
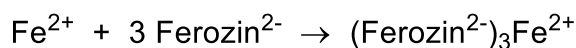
Preglednica II: Mehanizem in mesto delovanja pomembnejših ne-encimskih antioksidantov (1, 6, 7).

	ANTIOKSIDANT	MEHANIZEM DELOVANJA	MESTO DELOVANJA
1	Askorbinska kislina (Vitamin C)	Neposredno reagira s superoksidnim in hidroksilnim radikalom ter ostalimi peroksidi in se pri tem oksidira do stabilnega askorbilnega radikala	Zunajcelična tekočina
2	T α -tokoferoli in tokotrienoli (Vitamin E)	Preprečuje oksidacijo polinenasičenih maščobnih kislin in poškodb na membranah eritrocitov. Oksidira se do tokoferilnega radikala	Mitohondriji in endoplazmatski retikulum ter plazmalema
3	β -karoten	Lovilec singletnega kisika - preprečevanje lipidne peroksidacije	Lipoproteini, notranja membrana
4	Glutation (GSH)	Deluje skupaj z glutation peroksidazo in glutation reduktazo. Razmerje med GSSG in GSH je dober kazalnik stanja oksidativnega stresa.	Citosol, mitohondriji
5	Transferin, feritin, laktoferin	Vežejo proste ione prehodnih kovin	Zunajcelična tekočina

1.1.4. Vrednotenje antioksidantov – Ferozinski test

Za določanje aktivnosti antioksidantov je na voljo veliko različnih metod. Vsaka izmed njih ima svojo značilno tarčo, in vsaka od njih ima svoje prednosti ter slabosti. Antioksidanti pogosto delujejo preko več različnih mehanizmov, odvisno od samega reakcijskega sistema. Različni viri radikalov lahko sprožijo različne odzive enakega antioksidanta, zato je najbolje uporabiti več različnih metod hkrati.

Za določanje sposobnosti kelacije Fe²⁺ uporabljamo ferozinski test. Ferozin lahko tvori z Fe²⁺ vijolično obarvan kompleks, ki ima maksimum absorbance pri 562 nm (Slika 1). Ob prisotnosti spojine, ki lahko prav tako veže Fe²⁺, pa posledično nastane manj kompleksa s ferozinom in manj intenzivno obarvanje. Z merjenjem padca absorbance pri 562 nm lahko tako določimo sposobnost testirane spojine, da kelira divalentno železo. (8).



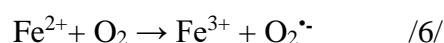
Slika 1: Struktura kompleksa ferozin- Fe^{2+} (9).

1.1.5. Določanje oksidativnega stresa

Zaradi kratke življenjske dobe radikalov oziroma njihove velike reaktivnosti, zelo težko določimo dejansko stanje OS v organizmu. Nekatere reaktivne zvrsti tudi slabo prehajajo celične membrane zaradi naboja (npr. superoksidni anion). Ravno zato ne prehajajo iz prizadetega območja ali organa v kri. Velikokrat tako ne moremo neposredno določiti primarnih radikalov, temveč le njihove vmesne presnovke, ki so bolj stabilni. Zato je mnogo lažje v organizmu ugotoviti antioksidativni status, kot pa stanje OS. Obstajajo številne metode, vsaka pa ima seveda svoje prednosti in slabosti. Najpogostejše metode, s katerimi ocenimo t.i. prooksidantni status, so: določanje hidroperoksidov s pomočjo Fentonove reakcije in kromogena (d-ROMs test), elektronska paramagnetna resonanca (EPR) z uporabo spinskih pasti za lovljenje zelo reaktivnih in kratkoživih radikalov, določanje presnovkov lipidne peroksidacije, ki dajejo obarvane adukte s tiobarbiturno kislino (test TBAR), določanje nekaterih stranskih produktov oksidacije (npr. izoprostanov), določanje 8-hidroksi-degvanozina kot pokazatelja oksidirane DNA v urinu in kemiluminiscenca, s katero se lahko spremlja sproščanje radikalov iz nevtrofilcev (pospešena npr. z luminolom ali luciferinom). V krvi pa določamo encime, ki so vključeni v celično zaščito: superoksid dismutazo, od selena odvisno glutation peroksidazo, katalazo, glutation reduktazo in izoencime glutation-S-transferaze. Poleg specifičnih parametrov pa lahko določimo tudi celokupni antioksidantni status (1,5).

1.2. VLOGA BAKROVIH IN ŽELEZOVH IONOV V ORGANIZMU

Bakrovi in železovi ioni igrajo pomembno vlogo v skoraj vseh živih organizmih. So kofaktorji številnih presnovnih encimov in sodelujejo v reakcijah prenosa elektronov (redoks reakcijah) ter tako vplivajo na celično presnovo, rast in razvoj. V nasprotnem primeru pa so lahko tudi toksični za naše celice, če je njihova koncentracija presežena, saj spodbudijo tvorbo ROS. Prosti bakrovi oziroma železovi ioni vstopajo v reakcije s kisikom in se oksidirajo, kisik pa reducirajo do superoksidnega radikala /6/. Le-ta se najpogosteje s pomočjo superoksid dismutaze pretvori v kisik in vodikov peroksid.

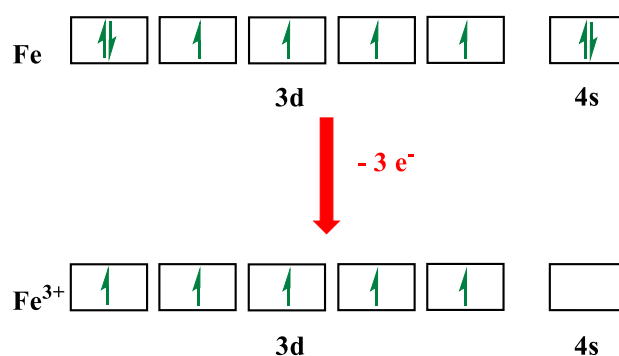


Vodikov peroksid se lahko nadalje v Fentonovi reakciji reducira do hidroksilnega aniona in izjemno reaktivnega hidroksilnega radikala (OH^{\bullet}), reducenti reakcije pa so Fe^{2+} ioni. OH^{\bullet} lahko oksidira številne biomolekule, kot so proteini, lipidi in DNA ter tako povzroči mutacije, poškodbe DNA, OS in apoptozo celic.

Veliko bolezni je neposredno povezanih z neravnovesjem bakrovih in železovih ionov, na primer družinska hemokromatoza, Friedreichova ataksija in Wilsonova bolezen, vse več pa je tudi nevrodegenerativnih bolezni (10).

1.2.1. Elektronska konfiguracija železa

Železo najdemo v številnih oksidacijskih stanjih, najpogostejši sta Fe^{2+} in Fe^{3+} (Slika 2).



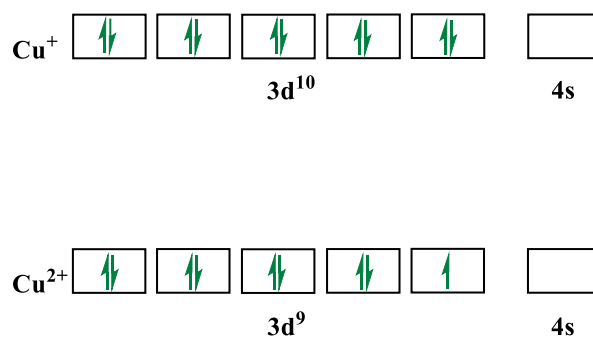
Slika 2: Elektronska konfiguracija Fe^{3+} iona (prirejeno po 11).

V raztopini se železo najpogosteje nahaja v Fe^{3+} obliki, ki je tudi najbolj stabilno oksidacijsko stanje. Železo v raztopini iz Fe^{2+} soli, na primer iz FeSO_4 , pa se v prisotnosti kisika počasi oksidira do Fe^{3+} stanja. Raztopljeni kisik v raztopini se pri tem reducira do $\text{O}_2^{\bullet-}$.

V prostem Fe^{2+} ionu ima vseh pet 3d orbital enako energijo (Slika 2). Ob prisotnem ligandu se lahko energijsko stanje posameznih 3d orbital spremeni. Če je sprememba te energije občutna, se lahko elektroni prerazporedijo v nižje energetske orbitale. Fe^{2+} nato ostane brez neparjenih elektronov in se tako težje oksidira. Kot tak se nahaja v molekuli oksihemoglobina in oksimioglobina (3).

1.2.2. Elektronska konfiguracija bakra

Baker se nahaja najpogosteje v dveh oksidacijskih stanjih, Cu^+ in Cu^{2+} (Slika 3). Med seboj se ti dve stanji razlikujeta v enem neparjenem elektronu, kar omogoča bakru vstop v radikalske reakcije. V ustreznih pogojih lahko tako bakrovi ioni hitro reagirajo z molekulami kisika (10).



Slika 3: Elektronska konfiguracija Cu^+ in Cu^{2+} iona (prirejeno po 12).

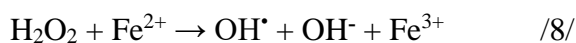
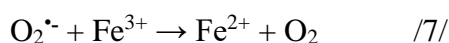
1.3. VPLIV OKSIDATIVNEGA STRESA NA RAZVOJ ALZHEIMERJEVE BOLEZENI (AD)

AD je motnja, ki prizadene predvsem starejšo populacijo. Skladno z Diagnostičnim in statističnim priročnikom duševnih motenj (13), ki ga uporabljajo predvsem v Ameriki, drugod pa Mednarodno klasifikacijo bolezni (14), se AD bolezen kaže kot skupek naslednjih simptomov:

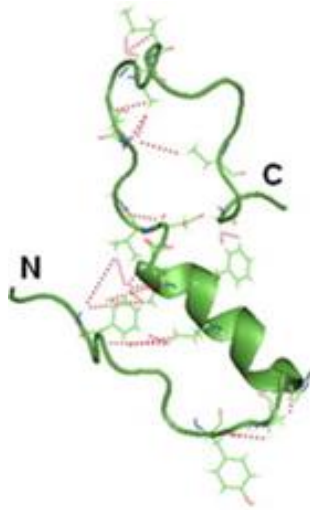
- Poslabšanje spomina: poslabšanje sposobnosti sprejemanja novih informacij ali priklic informacij iz preteklosti v spomin
- Ena ali več kognitivnih motenj: nezmožnost prepoznavanja predmetov ali pojavov, nesposobnost izvajanja gibov pri sicer ohranjeni motoriki, afazija (delna ali popolna nezmožnost za govorjenje ali razumevanje govora) (15).

OS igra pomembno vlogo v patogenezi AD. Dokazano je, da so radikali kisika vključeni v biokemijske aktivnosti v možganskih celicah, kot je signalna transmisija, genska transkripcija in regulacija gvanilat ciklaze. V fizioloških koncentracijah prav tako sodelujejo v regulaciji sinaptične plastičnosti in spomina. Ravno zato imajo ROS ključno vlogo v patogenezi staranja in s staranjem povezane bolezni, kot je tudi AD (16).

Hipoteza o amiloidni kaskadi, ki se je uveljavila zadnja leta, še zmeraj velja za vodilni vzrok nastanka AD (17). Motnja presnove in nivoja β amiloidnega peptida – $A\beta$ (slika 4), povzroči kaskado dogodkov, ki so odgovorni za nastanek AD. $A\beta$ nastane s cepitvijo amiloidnega prekursorskega proteina. Reakcijo katalizirata encima β -sekretaza in γ -sekretaza. Poleg selektivne nevronske degeneracije so pri AD prisotne tudi senilne lehe (ovalne mikroskopske lezije v zunajceličnem prostoru možganov, s centralnim proteinskim jedrom, sestavljenega iz fibrilarnega proteina $A\beta$) in neurofibrilarni pleteži. Lehe kažejo sliko vnetne reakcije v živčnem tkivu, ki povzroči spreminjanje in kasneje odmiranje nevronov, ki so preko dendritov in nevronov v stiku z njimi. Oboji so najverjetneje posledica in ne vzrok bolezni. Mehanizmi, preko katerih povzroči akumulacija $A\beta$ poškodbe in smrt nevronov, prav gotovo vključujejo OS in vnetne procese. Vezava $A\beta$ na specifične receptorje (RAGE receptorji) namreč spodbudi tvorbo radikalov, z vezavo prehodnih kovin (cink, železo in baker) pa spodbudi tvorbo ROS. ROS vplivajo na novonastale nevrone in tako vplivajo na potek bolezni. Pri AD gre tako za motnjo v regulaciji kovinskih ionov (še posebno redoks aktivnih ionov prehodnih kovin), ki se kopičijo v citoplazmi nevronov. Povečana koncentracija H_2O_2 v citoplazmi vodi v prisotnosti kovinskih ionov do povečane tvorbe OH^\bullet . V možganih, obolelih od AD, so našli povečane koncentracije cinka, železa in bakra, saj le-ti katalizirajo pretvorbo H_2O_2 do OH^\bullet , preko Fentonove in Haber-Weisseve reakcije /7, 8/:

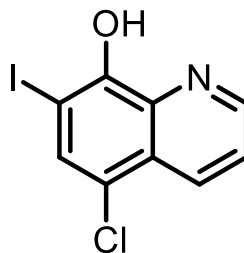


Baker ima posebno vlogo v patogenezi AD, saj po različnih poteh povzroča obarjanje topnega $A\beta$: s spremembo strukture $A\beta$, spodbuditvijo OS in regulacijo signalnih poti v nevronih (16, 18).



Slika 4: Struktura β amiloidnega peptida (19).

Vidimo lahko, da je AD zelo kompleksna bolezen. Diagnoza bolezni je zelo težka in se jo najlažje potrdi šele pri izvedbi avtopsije, ki razkrije karakteristične patološke spremembe v morfologiji in histologiji možganov. Zdravljenje poteka predvsem z zdravili, ki delujejo tako, da zavirajo acetilholin esterazo (npr. donepezil in galantamin). Pri AD je namreč zaradi propada celic v osrednjem živčevju znižana koncentracija acetilholina, ki pa je pomemben živčni prenašalec. Zaviralci acetilholinesteraz sicer upočasnijo razvoj bolezni, a so učinkoviti le v začetni fazi bolezni. Prav tako se pri zdravljenju AD uporabljajo kelatorji kovinskih ionov, saj le-ti povzročijo obarjanje topnega $A\beta$. Pomanjkanje ionov povzroči raztapljanje senilnih leh. Hidrofobni Cu/Zn kelator je kliokvinol, ki prosto prehaja krvno možgansko pregrado in preprečuje vezavo teh ionov na $A\beta$ (slika 5). Zaradi večplastne narave AD je tako bolj primeren pristop k zdravljenju razvoj tarčnih molekul, ki so usmerjene k preprečevanju propada celic osrednjega živčevja. Idealno bi bilo torej razviti spojine, ki bi sočasno zavirale agregacijo $A\beta$, uravnavale homeostazo kovinskih ionov in nadzorovale OS (18, 20).

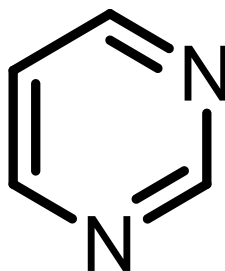


Slika 5: Kliokvinol; hidrofobni Cu/Zn kelator.

1.4. VLOGA PIRIMIDINSKIH DERIVATOV V KOZMETIČNIH PRIPRAVKIH

Posledica povečanega OS v organizmu ni samo razvoj mnogoterih bolezni, temveč tudi pospešeno staranje. Razvili so že mnoge hipoteze glede procesa staranja, s katerimi naj bi razjasnili ta zapleteni fiziološki proces. Hipoteza o spremembi proteinov (posttranslacijske spremembe, nenormalna sinteza) ter hipoteza o spremembi DNA, ki onemogoča celici, da si opomore po oksidativnih poškodbah in tako pospeši proces staranja, sta le dve izmed mnogih. Seveda igra pri tem pomembno vlogo genetska zasnova, telesna masa in telesna dejavnost (1).

Kozmetična industrija nas tako preplavlja z izdelki, s katerimi lahko omilimo posledice staranja. Določenim kozmetičnim pripravkom tako dodajajo pirimidinske derivate (npr. derivate pirimidilpiperazina), saj le-ti zavirajo staranje kožnih celic in z vezavo kovinskih ionov preprečujejo nastanek OS (slika 6). Prav tako preprečujejo nastanek aken, celulita in pigmentacijskih motenj ter spodbujajo zadebelitev povrhnjice in rasti las (21).



Slika 6: Struktura molekule pirimidina (22).

1.5. UV-Vis ABSORPCIJSKA SPEKTROSKOPIJA

Absorpcijsko spektroskopijo uvrščamo med spektralne tehnike. Osnova spektralnih tehnik je interakcija svetlobe s snovjo, pri kateri se lahko svetloba odbije, razprši, absorbira, ukloni oziroma spremeni smer potovanja ali prehajanja skozi snov.

Svetloba je elektromagnetno sevanje energije, ki se širi po prostoru kot valovanje. Sestavljajo jo fotoni in ima tako lastnosti valovanja ter lastnosti delcev (dualizem). Elektromagnetno valovanje opišemo s hitrostjo (c), valovno dolžino (λ) in frekvenco (ν) (enačba 1). Valovna dolžina je definirana kot linearna razdalja enega osnovnega vala (nm),

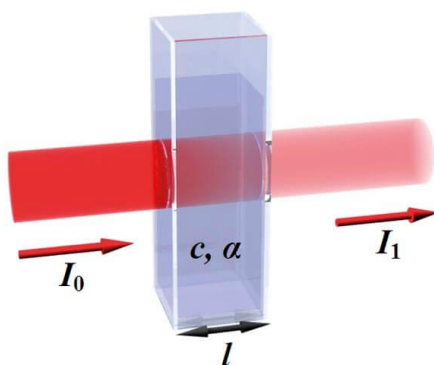
frekvenca pa predstavlja število osnovnih valov v eni sekundi (Hz). Hitrost potovanja svetlobe v prostoru je odvisna od medija.

Enačba 1: $c = v \lambda$

Pri absorpcijski spektroskopiji snov (atom, ion ali molekula) absorbira energijo fotonov v območju λ med 200 - 800 nm in pri tem prehaja v vzbujeno stanje, ki se kaže kot eden od treh pojavov: sprememba načina rotacije kovalentne vezi, sprememba načina vibracije kovalentne vezi ali prehod elektronov na višji energijski nivo. Količina energije fotona, ki je potrebna za nastanek določene spremembe, je odvisna od narave vezi in je specifična za vsako vez. Verjetnost, da bo prišlo do določene energijske spremembe, je največja, če ima foton ravno toliko energije, kot jo sprememba zahteva. Ne glede na količino absorbirane energije in vrsto energijske spremembe se poskušajo vezi vrniti v osnovno, nevzbujeno stanje. Količina absorbirane energije elektromagnetnega valovanja neke snovi je enaka vsoti absorbirane energije vseh posameznih vezi (23).

1.5.1. Beer-Lambertov zakon

Svetlobo izbrane valovne dolžine (I_0) pošljemo pravokotno na kiveto, v kateri je raztopina snovi in tako izmerimo količino absorbirane svetlobe (slika 7). Snov v raztopini del svetlobe absorbira, preostali del svetlobe pa izstopi na drugi strani kivete. Jakost prepuščene svetlobe (I_1), ki jo izmerimo, je manjša od začetne jakosti I_0 in je posledica absorpcijske aktivnosti snovi v raztopini.



Slika 7: Pot svetlobe skozi kiveto debeline l (prirejeno po 23).

Za homogene raztopine snovi v kiveti velja, da je delež prepuščene svetlobe, ki jo imenujemo transmitanca (T), enak razmerju med intenziteto izhodne in vhodne svetlobe (enačba 2). Pogosteje tako merimo odstotek transmitance (% T) (enačba 3).

Enačba 2: $T = I_1 / I_0$ ($I_1 < I_0$)

Enačba 3: $\%T = (I_1 / I_0) 100$

Vendar pa je odnos med T oziroma $\%T$ in koncentracijo snovi negativen in eksponenten, zato je smiselno pretvoriti $T / \%T$ v absorbanco (A) (enačba 4). Odnos med koncentracijo snovi v raztopini v kivetu in A je namreč premo sorazmeren, in ta odnos opisuje Beer-Lambertov zakon.

Enačba 4: $A = -\log T = \log (1 / T) = \log (100 / \%T)$

Količina svetlobe, ki jo obarvana homogena raztopina absorbira, je odvisna od molarne absorpcijskega koeficienta snovi (ϵ), dolžine optične poti (l) in koncentracije snovi v raztopini v kivetu (C) (enačba 5).

Enačba 5: $A = \epsilon l C$

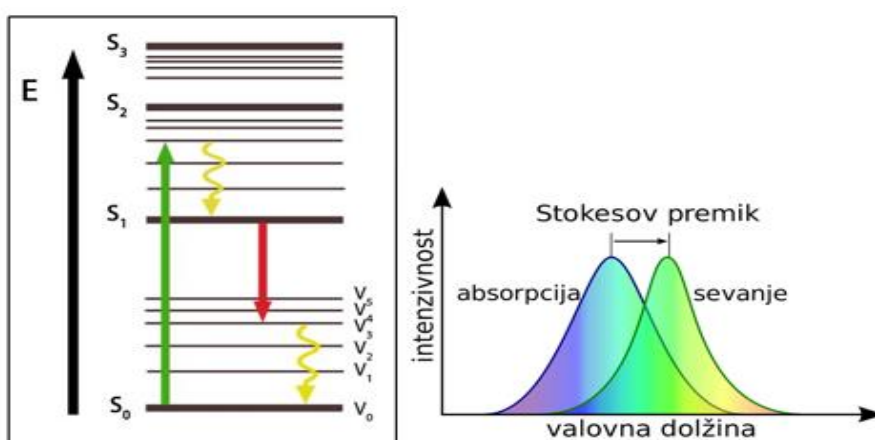
Pri prehodu svetlobe skozi raztopino analita v kivetu prihaja poleg absorpcije svetlobe tudi do drugih fizikalnih pojavov. Nekaj svetlobe absorbirajo voda, steklo in topilo, nekaj pa se je odbije od površine kivete. Omenjenim vplivom se izognemo z meritvijo jakosti prepuščene svetlobe slepega vzorca (topilu namesto vzorca z merjenim analitom dodamo vse sestavine matriksa) (23).

Vendar ima tudi Beer-Lambertov zakon določene omejitve, ki porušijo linearen odnos med A in C analita v raztopini: previsoka koncentracija analita v kivetu, previsoka koncentracija ostalih sestavin z drugačnim ϵ (npr. elektroliti), reakcija analita s topilom, pri kateri nastane produkt z drugačnim absorbančnim spektrom, svetloba ni monokromatska in nevzporedne stranice kivete (23, 24).

1.6. FLUORESCENČNA SPEKTROSKOPIJA

Fluorescenčno spektroskopijo (fluorimetrijo) uvrščamo med luminiscenčne metode. Gre za instrumentalno tehniko merjenja fluorofora v raztopini s pomočjo fluorescence. Analit spremenimo v fluorofor s pomočjo specifične kemijske reakcije. Fluorofori so spojine, ki so sposobne oddati absorbirano energijo elektromagnetnega valovanja s kratko λ v obliki emisijske svetlobe, fluorescenca pa je pojav oddajanja absorbirane energije elektromagnetnega valovanja v obliki emisijske svetlobe. Pojav fluorescence najlažje predstavimo z Jablonskijevim diagramom (slika 8). Pri obsevanju fluorofora z

elektromagnetnim valovanjem kratke λ (ekscitacijska oz. vzbujevalna svetloba) pride do absorpcije energije in posledično do prehoda elektronov fluorofora iz osnovnega energetskega stanja (S_0) v vzbujeno stanje (S_1). Vzbujeno stanje fluorofora energijsko ni ugodno, zato pri prehodu v osnovno stanje, najprej odda energijo, sprejeto v obliki spremenjene vibracije in rotacije vezi (notranja konverzija fluorofora). Rezultat tega je prehod fluorofora v najnižje vibracijsko stanje vzbujenega fluorofora ($S_{1,0}$). Nadalje, izgubi še energijo v obliki fotonov pri prehodu iz $S_{1,0}$ stanja, v katerokoli vibracijsko ali rotacijsko stanje S_0 . Spekter emisijske svetlobe je tako pomaknjen k daljšim λ , kar imenujemo Stokesov premik (slika 8).



Slika 8: Jablonskijev diagram (levo) in Stokesov premik (desno) (prirejeno po 23).

Najboljše fluorescentne lastnosti imajo molekule, ki imajo v svoji strukturi kondenzirane aromatske obročje ter nekatere alifatske in ciklične karbonilne spojine, s konjugiranimi dvojnimi vezmi. Fluorescirajo pa tudi nekatere endogene molekule, kot je NADH in aromatske aminokisljine. Odnos med jakostjo emisijske svetlobe in koncentracijo fluorofora v kivetu je linearen, vendar le v primeru, da je absorbanca ekscitacijske svetlobe pod 0,1. Pri fluorimetriji zato običajno delamo z zelo razredčenimi vzorci (23).

2. NAMEN DELA

Glavni način tvorbe škodljivih hidroksilnih radikalov pri oksidativnem stresu je Fentonova reakcija, ki jo katalizirajo kovinski ioni (predvsem Fe^{2+} in Cu^+ ioni). Oksidativni stres je tako odgovoren za zgodnje staranje in razvoj številnih bolezni, med katere sodi tudi Alzheimerjeva bolezen. Z razvojem spojin, ki bi bile sposobne vezati kovinske ione in tako upočasniti, oziroma zavreti Fentonovo reakcijo, bi naredili ogromen korak k zdravljenju Alzheimerjeve bolezni in upočasnitvi zgodnjega staranja.

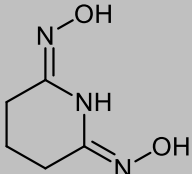
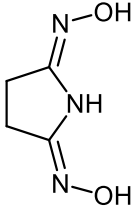
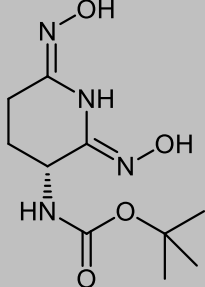
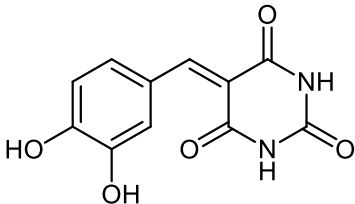
V magistrsko nalogo bomo tako vključili osem spojin in ovrednotili njihove antioksidacijske sposobnosti. V prvem sklopu testiranja bomo izvedli askorbatni test z Fe^{3+} in Cu^{2+} ioni, pri katerem bomo spremljali potek Fentonove reakcije preko porasta fluorescence. Zanima nas, kako dobro izbrane spojine vežejo omenjene ione in s tem upočasnijo, oziroma zavrejo Fentonovo reakcijo. Spojini, ki se bosta izkazali kot najboljši, bomo vključili v nadaljnja testiranja. Izvedli bomo test s ferozinom in spektrofotometrično titracijo z Fe^{3+} ioni na UV – Vis spektrometru in tako opazovali specifične premike absorbančnih spektrov ter določili stehiometrijsko razmerje ligand – kovinski ion v nastalih kompleksih. S pomočjo Microsoft Excel programa bomo izrisali emisijske in absorbančne spektre ter titracijski krivulji in ovrednotili antioksidacijske sposobnosti analiziranih spojin.

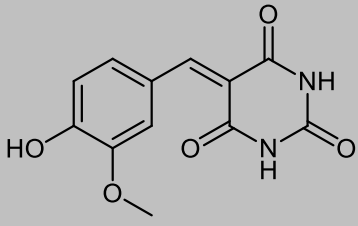
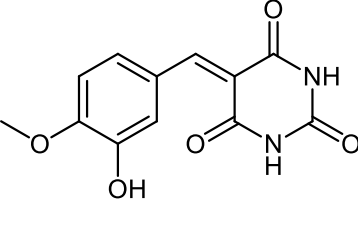
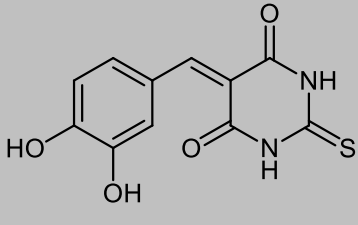
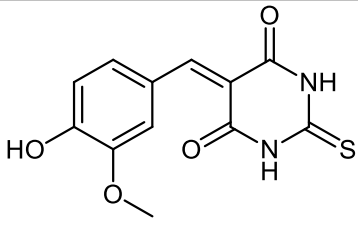
3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

V analizo smo vključili osem spojin, ki so bile predhodno sintetizirane na katedri za Farmacevtsko kemijo, na Fakulteti za farmacijo (Univerza v Ljubljani). Vsi vzorci so bili v trdnem agregatnem stanju, v obliki praškastih delcev.

Preglednica III: Prikaz testiranih spojin.

Št. vzorca	Oznaka spojine	M (g/mol)	Bruto formula	Strukturna formula
1.	ZJ-176	143,14	C ₅ H ₉ N ₃ O ₂	
2.	ZJ-167_1	129,12	C ₄ H ₇ N ₃ O ₂	
3.	ZJ-70	258,27	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₅	
4.	NLS-1	248,19	C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₅	

5.	NLS-2	262,22	$C_{12}H_{10}N_2O_5$	
6.	NLS-5	262,22	$C_{12}H_{10}N_2O_5$	
7.	NLS-6	264,02	$C_{11}H_8N_2O_4S$	
8.	NLS-7	278,28	$C_{12}H_{10}N_2O_4S$	

3.2. TOPILA IN REAGENTI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili reagente različnih proizvajalcev (Merck, Sigma – Aldrich, Acros Organics). Za pripravo pufrov in raztopine Fe oziroma Cu ionov smo uporabili deionizirano vodo, ki je bila dodatno prečiščena z MilliQ sistemom.

Uporabljeni reagenti:

- Kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 , Merck
- Natrijev klorid, NaCl, Merck
- Deferoksamin, $C_{25}H_{48}N_6O_8$, Sigma-Aldrich
- Natrijev hidroksid, NaOH, Merck
- Bakrov(II) sulfat, $CuSO_4$, Acros Organics
- EDTA (etilendiamintetraocetna kislina), $C_{10}H_{16}N_2O_8$, Acros Organics
- Železov(III) klorid, $FeCl_3$, Acros Organics

- Ferozin [3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-natrijeva sol disulfonske kisline], $C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2$, Sigma-Aldrich
- Železov(II) klorid tetrahidrat, $FeCl_2 \times 4 H_2O$, Sigma-Aldrich

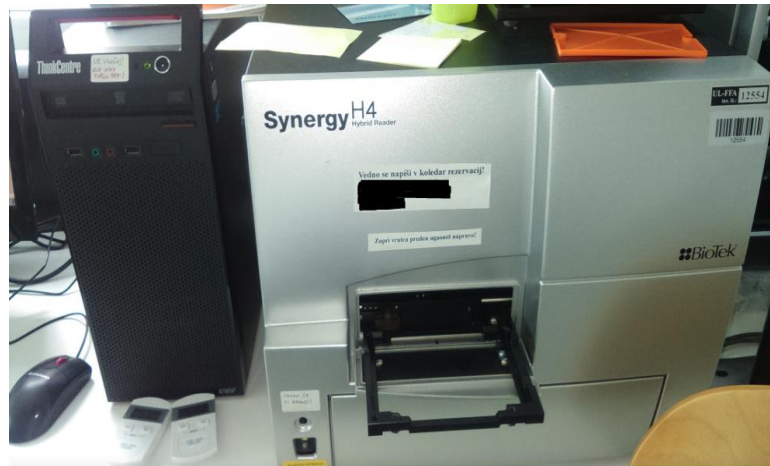
3.3. MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATURE

Uporabljeni merilni pripomočki in aparature:

- Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader, BioTek
- UV – Vis spektrometer Cary 50 Conc, Varian
- Precizna tehtnica Sartorius AX124
- Stresalnik Vibromix 10
- Ultrazvočna kopel Sonis 4 (Iskra Pio)
- pH meter (Mettler-Toledo)
- Multikanalna pipeta Biohit (Kemomed) s pripadajočimi nastavki 10 – 300 μ L
- Multikanalna pipeta Sartorius s pripadajočimi nastavki 50 – 1200 μ L
- Enokanalna pipeta Transferpette (Brand) s pripadajočimi nastavki 100 – 1000 μ L
- Mikrotitrške ploščice s 96 vdolbinicami (Greiner)
- Steklena kiveta 1,5 mL
- Različen laboratorijski pribor (centrifugirke s stojalom, mikrocentrifugirke, merilni valj, spatula, čaše različnih velikosti, plastične kadičke, penicilinke z zamaški, merilna buča 1000 mL, 5 mL stekleničke z zamaški)

3.3.1. Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader, BioTek

Porast fluorescence smo spremljali s čitalcem mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader, proizvajalca BioTek (slika 9). Poleg merjenja fluorescence omogoča tudi merjenje absorbance in ostalih luminiscenčnih metod. Synergy H4 uporablja za merjenje fluorescence kot izvor svetlobe volframovo-halogensko žarnico, s filtri za izbor specifičnih λ . Detektor sestavljajo fotopomnoževalke, ki so izredno občutljive in hitro odzivne. Le-te namreč morajo imeti visoko občutljivost, saj je jakost emisijske svetlobe v primerjavi z jakostjo ekscitacijske svetlobe vsaj stokrat manjša. Čitalec podpira branje ploščic s 6, 12, 24, 48, 96 in 384 vdolbinicami ter omogoča izvajanje meritev v temperaturnem območju od 4 – 50 °C. Prav tako omogoča avtomatsko tresenje plošče. Podprt je z računalniškim programom GEN5.203 (Gen5 Data Analysis Software) (23, 25).



Slika 9: Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader, proizvajalca BioTek.

3.3.2. UV – Vis spektrofotometer Cary 50 Conc, Varian

Pri delu smo uporabili enožarkovni spektrofotometer Cary 50 Conc, proizvajalca Varian (slika 10). Za izvor svetlobe uporablja ksenonsko žarnico, ki oddaja svetlobo λ od 190 do 1100 nm. Sledi vstopna reža, ki usmeri svetlobo na monokromator, le-ta pa izbere λ vzbujevalne svetlobe. Zavedati se moramo, da izbrana svetloba v nobenem primeru ni povsem monokromatska. Monokromatska svetloba je namreč le laserska svetloba. Izstopna reža nato izbere območje razpršene svetlobe z želeno λ in jo pošlje pravokotno na kiveto z vzorcem. Kivete so običajno iz kvarčnega stekla, saj prepuščajo svetlobo λ tudi pod 320 nm (UV svetloba). V zadnjem času se pogosto uporabljajo tudi večnamenske plastične kivete, za enkratno uporabo. Sledi občutljiv detektor iz dveh silikonskih diod in računalniški procesor za analizo signala in podatkov. Spektrofotometer je podprt z računalniškim programom Agilent Cary WinUV (23, 26).



Slika 10: UV – Vis spektrofotometer Cary 50 Conc, proizvajalca Varian.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. ASKORBATNI TEST - TEST INHIBICIJE FENTONOVE REAKCIJE, KATALIZIRANE S Cu^{2+} IONI

KH_2PO_4 pufer z $1 \mu\text{M}$ deferoksamina, pH 7,4 (v nadaljevanju **topilo 1**):

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebne mase za pripravo 20 mM raztopine KH_2PO_4 , z dodatkom 100 mM NaCl in $1 \mu\text{M}$ deferoksamina. V 1000 mL merilno čašo smo zatehtali 2,72 g KH_2PO_4 , 5,84 g NaCl in 0,560 g deferoksamina ($\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_8$) in raztopili v približno 800 mL vode. Nato smo uravnali pH na 7,4 z dodatkom 4 % raztopine NaOH, ki smo jo pripravili tako, da smo zatehtali 4,00 g NaOH v 100 mL bučko in dopolnili z vodo do oznake. Raztopino smo nadalje kvantitativno prenesli v 1000 mL bučo in dopolnili z vodo do oznake.

Formula 6: $m = c \times V \times M$,

kjer **m** predstavlja maso spojine, **c** koncentracijo spojine, **V** volumen topila 1 in **M** molekulska masa spojine.

$M_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 136,09 \text{ g/mol}$, $M_{\text{NaCl}} = 58,44 \text{ g/mol}$, $M_{\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_8} = 560,68 \text{ g/mol}$

Priprava raztopin vzorcev v topilu 1:

Najprej smo pripravili osnovno raztopino vzorca koncentracije 6 mM. S pomočjo formule 6 smo izračunali maso vzorca. V mikrocentrifugirko smo zatehtali ustrezno maso vzorca in dodali ustrezen volumen topila 1 (preglednica IV). Za meritve kinetike smo nadalje redčili osnovno raztopino do koncentracije $600 \mu\text{M}$, tako da smo v plastično centrifugirko s pokrovčkom odmerili 4,50 mL topila 1 in dodali 0,500 mL 6 mM osnovne raztopine vzorca. Vsebinsko smo premešali na stresalniku Vibromix 10. Raztopine vzorcev z zaporedno št. 4 – 8, smo sonicirali v ultrazvočni kopeli, da smo pospešili hitrost raztapljanja. Raztopine vzorcev smo hranili v hladilniku 1 mesec.

Preglednica IV: Mase vzorcev in ustrezni volumni topila 1, potrebnih za pripravo osnovnih raztopin.

Št. Vzorca	Oznaka spojine	Masa (mg)	M (g/mol)	V topila 1 (mL)	c (mmol/L)
1	ZJ-176	1,3	143,14	1,51	6
2	ZJ-167_1	1,2	129,12	1,55	6
3	ZJ-70	2,0	258,27	1,29	6

4	NLS-1	1,8	248,19	1,21	6
5	NLS-2	1,8	262,22	1,14	6
6	NLS-5	1,7	262,22	1,08	6
7	NLS-6	1,4	264,02	0,884	6
8	NLS-7	1,5	278,28	0,898	6

Priprava raztopine kumarin 3-karboksilne kisline (CCA) v topilu 1:

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 1 mM raztopine CCA. V 50 mL centrifugirko s pokrovčkom smo zatehtali 4,60 mg CCA in dodali 24,2 mL topila 1 z merilnim valjem. Za meritve kinetike smo nadalje redčili osnovno raztopino do koncentracije 250 μ M, tako da smo v plastično centrifugirko s pokrovčkom odmerili 7,50 mL topila 1 in dodali 2,50 mL 1 mM osnovne raztopine CCA. Raztopino CCA smo hranili v hladilniku 1 mesec.

$$M_{\text{CCA}} = 190,15 \text{ g/mol}$$

Priprava raztopine askorbinske kisline (Asc) v topilu 1:

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 60 mM raztopine Asc. V mikrocentrifugirko smo zatehtali 10,0 mg Asc in dodali 0,946 mL topila 1. Za meritve kinetike smo nadalje redčili osnovno raztopino do koncentracije 600 μ M, tako da smo v plastično centrifugirko s pokrovčkom odmerili 14,9 mL topila 1 in dodali 150 μ L 60 mM osnovne raztopine Asc. Vsak dan smo pripravili svežo raztopino Asc.

$$M_{\text{Asc}} = 176,12 \text{ g/mol}$$

Priprava raztopine CuSO₄ v vodi, prečiščeni z MilliQ sistemom (mH₂O):

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 1 mM raztopine CuSO₄. V plastično centrifugirko s pokrovčkom smo zatehtali 0,868 mg CuSO₄ in dodali 5,44 mL mH₂O. Za meritve kinetike smo nadalje redčili osnovno raztopino do koncentracije 200 μ M, tako da smo v plastično centrifugirko s pokrovčkom odmerili 4,00 mL mH₂O in dodali 1,00 mL 1 mM osnovne raztopine CuSO₄. Raztopino CuSO₄ smo hranili v hladilniku 1 mesec.

$$M_{\text{CuSO}_4} = 159,61 \text{ g/mol}$$

Postopek dela:

Raztopine smo napipetirali na mikrotitrsko ploščico v treh ponovitvah v treh vrsticah, kot prikazuje preglednica V.

Preglednica V: Prikaz pipetiranja raztopin.

A	$80 \mu\text{L CCA} + 10 \mu\text{L topila 1} + 10 \mu\text{L Cu-(II)} \rightarrow 100 \mu\text{L Asc}$
B	$80 \mu\text{L CCA} + 10 \mu\text{L topila 1} + 10 \mu\text{L vzorca} \rightarrow 100 \mu\text{L Asc}$
C	$80 \mu\text{L CCA} + 10 \mu\text{L Cu-(II)} + 10 \mu\text{L vzorca} \rightarrow 100 \mu\text{L Asc}$

Askorbinsko kislino smo napipetirali po 30 minutni inkubaciji in takoj začeli z meritvijo, ki je trajala 20 minut. Intenziteto fluorescence smo merili na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader, ki je podprt z računalniškim programom GEN5.203 (Gen5 Data Analysis Software).

Pogoji merjenja: $\lambda_{\text{ekscitacije}} = 395 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisije}} = 450 \text{ nm}$

T = 25 °C; Odprtina reže = 9,5; Ojačanje = 90

Koncentracije posameznih raztopin v reakcijski zmesi:

CCA: 250 $\mu\text{mol/L}$; Cu^{2+} : 200 $\mu\text{mol/L}$; Vzorec: 600 $\mu\text{mol/L}$; Asc: 600 $\mu\text{mol/L}$

4.2. ASKORBATNI TEST - TEST INHIBICIJE FENTONOVE REAKCIJE, KATALIZIRANE Z Fe³⁺ IONI

Priprava raztopin vzorcev v topilu 1:

Najprej smo pripravili osnovno raztopino vzorca koncentracije 6 mM. S pomočjo formule 6 smo izračunali maso vzorca. V mikrocentrifugirko smo zatehtali ustrezno maso vzorca in dodali ustrezen volumen topila 1 (preglednica VI). Za meritve kinetike smo nadalje redčili osnovno raztopino do koncentracije 600 μ M, tako da smo v plastično centrifugirko s pokrovčkom odmerili 4,50 mL topila 1 in dodali 0,500 mL 6 mM osnovne raztopine vzorca. Vsebinsko smo premešali na stresalnku Vibromix 10. Raztopine vzorcev z zaporedno št. 4 – 8, smo sonicirali v ultrazvočni kopeli, da smo pospešili hitrost raztapljanja. Raztopine vzorcev smo hranili v hladilniku 1 mesec.

Preglednica VI: Mase vzorcev in ustrezni volumni topila 1, potrebnih za pripravo osnovnih raztopin.

Št. Vzorca	Oznaka spojine	Masa (mg)	M (g/mol)	V topila 1 (mL)	c (mmol/L)
1	ZJ-176	1,6	143,14	1,86	6
2	ZJ-167_1	1,2	129,12	1,55	6
3	ZJ-70	1,9	258,27	1,23	6
4	NLS-1	2,2	248,19	1,48	6
5	NLS-2	2,2	262,22	1,40	6
6	NLS-5	2,6	262,22	1,65	6
7	NLS-6	1,6	264,02	1,01	6
8	NLS-7	2,2	278,28	1,32	6

Priprava raztopine Asc v topilu 1:

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 60 mM raztopine Asc. V mikrocentrifugirko smo zatehtali 13,0 mg Asc in dodali 1,23 mL topila 1. Za meritve kinetike smo nadalje redčili osnovno raztopino do koncentracije 600 μ M, tako da smo v plastično centrifugirko s pokrovčkom odmerili 14,9 mL topila 1 in dodali 150 μ L 60 mM osnovne raztopine Asc. Vsak dan smo pripravili svežo raztopino Asc.

$$M_{\text{Asc}} = 176,12 \text{ g/mol}$$

Priprava raztopine EDTA v topilu 1:

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 6 mM raztopine EDTA. V plastično centrifugirko s pokrovčkom smo zatehtali 11,8 mg EDTA in dodali 5,27 mL topila 1. Za meritve kinetike smo nadalje redčili osnovno raztopino do koncentracije 200 μM , tako da smo v mikrocentrifugirko odmerili 1,45 mL topila 1 in dodali 50,0 μL 6 mM osnovne raztopine EDTA. Raztopino EDTA smo hranili v hladilniku 1 mesec.

$$M_{\text{EDTA}} = 372,24 \text{ g/mol}$$

Priprava raztopine FeCl₃ v mH₂O:

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 1 mM raztopine FeCl₃. V plastično centrifugirko s pokrovčkom smo zatehtali 0,900 mg FeCl₃ in dodali 5,63 mL H₂O. Za meritve kinetike smo nadalje redčili osnovno raztopino do koncentracije 200 μM , tako da smo v plastično centrifugirko s pokrovčkom odmerili 4,00 mL H₂O in dodali 1,00 mL 1 mM osnovne raztopine FeCl₃. Raztopino FeCl₃ smo hranili v hladilniku 1 mesec.

$$M_{\text{FeCl}_3} = 162,21 \text{ g/mol}$$

Raztopina CCA v topilu 1:

Uporabili smo že pripravljeno in uporabljeno raztopino pri testu inhibicije Fentonove reakcije, katalizirane s Cu²⁺ ioni.

Postopek dela:

Raztopine smo napipetirali na mikrotitrsko ploščico v treh ponovitvah v štirih vrsticah, kot prikazuje preglednica VII.

Preglednica VII: Prikaz pipetiranja raztopin.

A	80 μL CCA + 10 μL topila 1 + 10 μL FeCl ₃ → 100 μL Asc
B	80 μL CCA + 10 μL topila 1 + 10 μL EDTA → 100 μL Asc
C	80 μL CCA + 10 μL EDTA + 10 μL FeCl ₃ → 100 μL Asc
D	80 μL CCA + 10 μL vzorca + 10 μL FeCl ₃ → 100 μL Asc

Askorbinsko kislino smo napipetirali po 30 minutni inkubaciji in takoj začeli z meritvijo, ki je trajala 30 minut. Prav tako smo rezultate pomerili po 24 urah, ko je reakcija že dosegla plato. Intenziteto fluorescence smo merili na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader, ki je podprt z računalniškim programom GEN5.203 (Gen5 Data Analysis Software).

Pogoji merjenja: $\lambda_{\text{ekscitacije}} = 395 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisije}} = 450 \text{ nm}$

T = 25 °C; Odprtina reže = 9,5; Ojačanje = 90

Koncentracije posameznih raztopin v reakcijski zmesi:

CCA: 250 $\mu\text{mol/L}$; Fe^{3+} : 200 $\mu\text{mol/L}$; EDTA: 200 $\mu\text{mol/L}$; Vzorec: 600 $\mu\text{mol/L}$; Asc: 600 $\mu\text{mol/L}$

4.3. FEROZINSKI TEST

Priprava KH_2PO_4 pufra, pH 7,2 (v nadaljevanju **topilo 2**):

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 20 mM raztopine KH_2PO_4 . V 1000 mL merilno čašo smo zatehtali 2,72 g KH_2PO_4 in raztopili v približno 800 mL vode. Nato smo uravnali pH na 7,2 z dodatkom 4 % raztopine NaOH, ki smo jo pripravili tako, da smo zatehtali 4,00 g NaOH v 100 mL bučko in dopolnili z vodo do oznake. Raztopino smo nadalje kvantitativno prenesli v 1000 mL bučo in dopolnili z vodo do oznake.

$M_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 136,09 \text{ g/mol}$

Priprava raztopine ferozina v mH_2O :

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 2 mM raztopine ferozina. V 5 mL penicilinko z zamaškom smo zatehtali 2,30 mg ferozina in dodali 2,34 mL mH_2O . Vsak dan smo pripravili svežo raztopino ferozina.

$M_{\text{Ferozin}} = 492,46 \text{ g/mol}$

Priprava raztopine $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ v mH_2O :

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 2 mM raztopino $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$. V 5 mL penicilinko z zamaškom smo zatehtali 0,890 mg $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ in dodali 2,24 mL mH_2O . Vsak dan smo pripravili svežo raztopino $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$.

$$M_{\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}} = 198,81 \text{ g/mol}$$

Priprava raztopin vzorcev v topilu 2:

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 5 mM raztopine vzorca. V 5 mL penicilinko z zamaškom smo zatehtali ustrezno maso vzorca in dodali ustrezen volumen topila 2 (preglednica VIII). Nekaj minut smo vzorca sonicirali v ultrazvočni kopeli in tako pospešili hitrost raztapljanja. Raztopine vzorcev smo hranili v hladilniku 1 mesec.

Preglednica VIII: Masi vzorcev in ustrezna volumna topila 2, potrebna za pripravo raztopin vzorcev.

Št. Vzorca	Oznaka spojine	Masa (mg)	M (g/mol)	V topila 2 (mL)	c (mmol/L)
1	ZJ-176	3,60	143,14	5,03	5
2	NLS-6	5,36	264,02	4,06	5

Postopek dela:

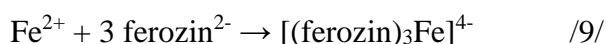
Absorpcijske spektre smo pomerili na UV-Vis spektrometru Cary 50 Conc, Varian, ki je podprt z računalniškim programom Agilent Cary WinUV. Pred meritvijo smo v omenjenem programu v pogovornem oknu »Setup« nastavili območje merjenja absorbance od 200 – 800 nm. Meritev smo izvajali pri sobni temperaturi.

V stekleno kiveto smo odpipetirali 2,5 mL topila 2 in tako odšteli ozadje. Nato smo dodali 75 μL raztopine ferozina in pomerili spekter. Po dodatku 25 μL Fe^{2+} ionov je nastalo vijolično obarvanje v kiveti, saj je potekla reakcija med ferozinom in Fe^{2+} . Nastalemu kompleksu smo prav tako pomerili spekter. Nadalje smo odpipetirali 20 μL raztopine vzorca in inkubirali 15 min. Absorpcijske spektre smo nato pomerili na vsakih 30 min.

Koncentracije posameznih raztopin v kiveti:

Ferozin: 60 $\mu\text{mol/L}$; Fe^{2+} : 20 $\mu\text{mol/L}$; Vzorec: 40 $\mu\text{mol/L}$

Razmerje med ferozinom in Fe^{2+} ioni v kivetu je 3 : 1 /9/.



4.4. STABILNOST KOMPLEKSA FERAZIN- Fe^{2+} BREZ PRISOTNOSTI LIGANDA (VZORCA) IN OB PRISOTNEM LIGANDU

Priprava raztopine ferozina v mH_2O :

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 2 mM raztopine ferozina. V 5 mL penicilinko z zamaškom smo zatehtali 1,95 mg ferozina in dodali 1,98 mL mH_2O .

$$M_{\text{Ferozin}} = 492,46 \text{ g/mol}$$

Priprava raztopine $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ v mH_2O :

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 2 mM raztopine $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$. V 5 mL penicilinko z zamaškom smo zatehtali 0,740 mg $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ in dodali 1,86 mL mH_2O .

$$M_{\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}} = 492,46 \text{ g/mol}$$

Priprava raztopine vzorca ZJ-167-1 v topilu 2:

Najprej smo pripravili osnovno raztopino vzorca koncentracije 5 mM. S pomočjo formule 6 smo izračunali maso vzorca. V 5 mL penicilinko z zamaškom smo zatehtali 3,21 mg vzorca in dodali 4,97 mL topila 2 ter sonicirali nekaj minut v ultrazvočni kopeli. Nadalje smo redčili osnovno raztopino do koncentracije 40 μM , tako da smo v 5 mL penicilinko z zamaškom odmerili 4,96 mL topila 2 in dodali 40 μL 5 mM osnovne raztopine vzorca.

Postopek dela:

1. V stekleno kiveto smo odpipetirali 2,5 mL topila 2 in tako odšteli ozadje. Nato smo dodali 75 μL 60 μM raztopine ferozina in prav tako pomerili spekter. Po dodatku 25 μL 20 μM raztopine Fe^{2+} ionov je nastalo vijolično obarvanje v kivetu, saj je potekla reakcija med ferozinom in Fe^{2+} . Nastalemu kompleksu smo pomerili UV-Vis spekter na vsakih 20 min.

2. V drugem poskusu smo izvedli test s ferozinom v obratnem vrstnem redu, saj smo želeli dokazati, da je ferozin vseeno mogoče močnejši kelator Fe^{2+} ionov od naše spojine.

V stekleno kiveto smo odpipetirali 2,5 mL 40 μM raztopine vzorca ZJ-167_1 in pomerili spekter. Nato smo dodali 25 μL 20 μM raztopine Fe^{2+} ionov (1/3 mola), inkubirali 15 minut in ponovno pomerili spekter. Na koncu smo dodali 75 μL 60 μM raztopine ferozina in pomerili spekter vsakih 20 minut.

4.5. DOLOČITEV STEHIOMETRIJSKEGA RAZMERJA S TITRACIJO Z Fe^{3+} IONI

Priprava raztopine FeCl_3 v 0,1 M HCl:

S pomočjo formule 6 smo izračunali potrebno maso za pripravo 1 mM raztopine FeCl_3 . V plastično centrifugirko smo zatehtali 8,10 mg FeCl_3 in dodali 9,23 mL 0,1 M HCl.

$$M_{\text{FeCl}_3} = 162,21 \text{ g/mol}$$

Priprava raztopin vzorcev v topilu 2:

Uporabili smo že pripravljene 5 mM osnovni raztopini vzorcev (podpoglavje priprave vzorcev pri ferozinskem testu, str. 26). Nadalje smo ju redčili do predpisane koncentracije, kot prikazuje preglednica IX:

Preglednica IX: Prikaz redčenja osnovnih raztopin vzorcev do predpisane koncentracije.

Št. Vzorca	Oznaka spojine	Redčitev	V topila 2 (μL)	V osnovne raztopine vzorca (μL)	Predpisana c ($\mu\text{mol/L}$)
1	ZJ-176	250x	4980	20	20
2	NLS-6	500x	4990	10	10

Postopek dela:

V stekleno kiveto smo odpipetirali 2,5 mL raztopine vzorca in pomerili spekter. Nato smo dodali raztopino FeCl_3 , inkubirali 5 minut in ponovno pomerili spekter. Dodatek raztopine FeCl_3 smo postopoma zviševali, saj smo želeli doseči nasičenje preiskovane spojine z železovimi ioni.

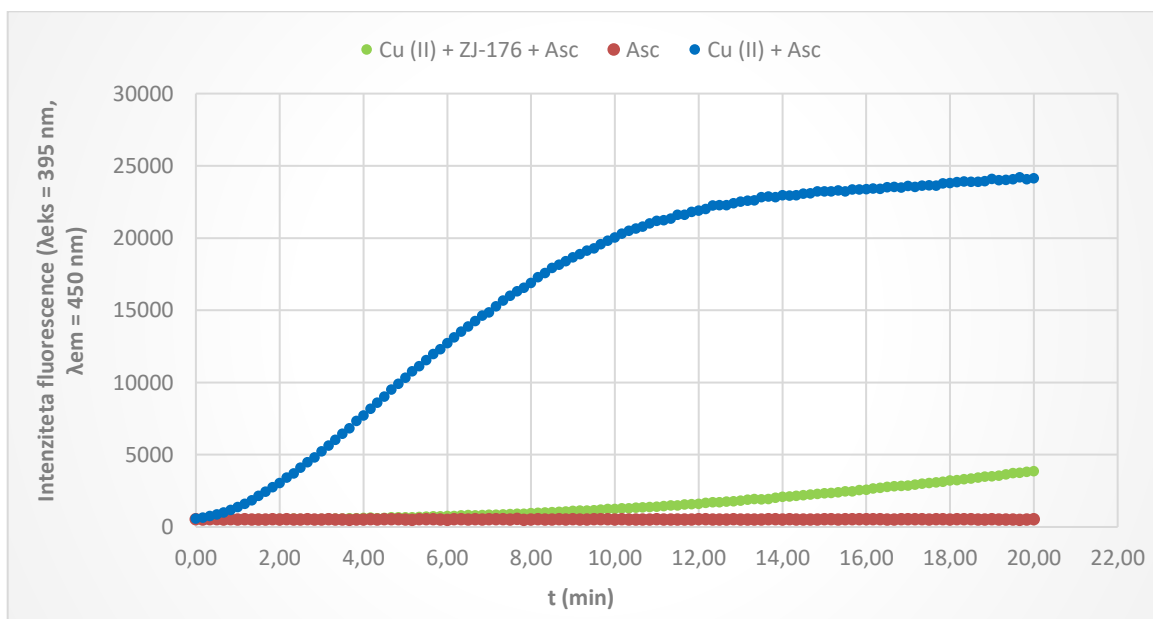
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

S testiranjem spojin smo ugotavljali antioksidativne lastnosti spojin, še zlasti njihov vpliv na potek Fentonove reakcije in sposobnost kelacije kovinskih ionov bakra in železa. Rezultati testiranj kažejo, da imajo spojine ZJ-176, NLS-1, NLS-6 in NLS-7 dobre antioksidativne sposobnosti, saj upočasnijo ali povsem zavrejo Fentonovo reakcijo. Najslabšo sposobnost vezave kovinskih ionov je izkazala spojina ZJ-167_1.

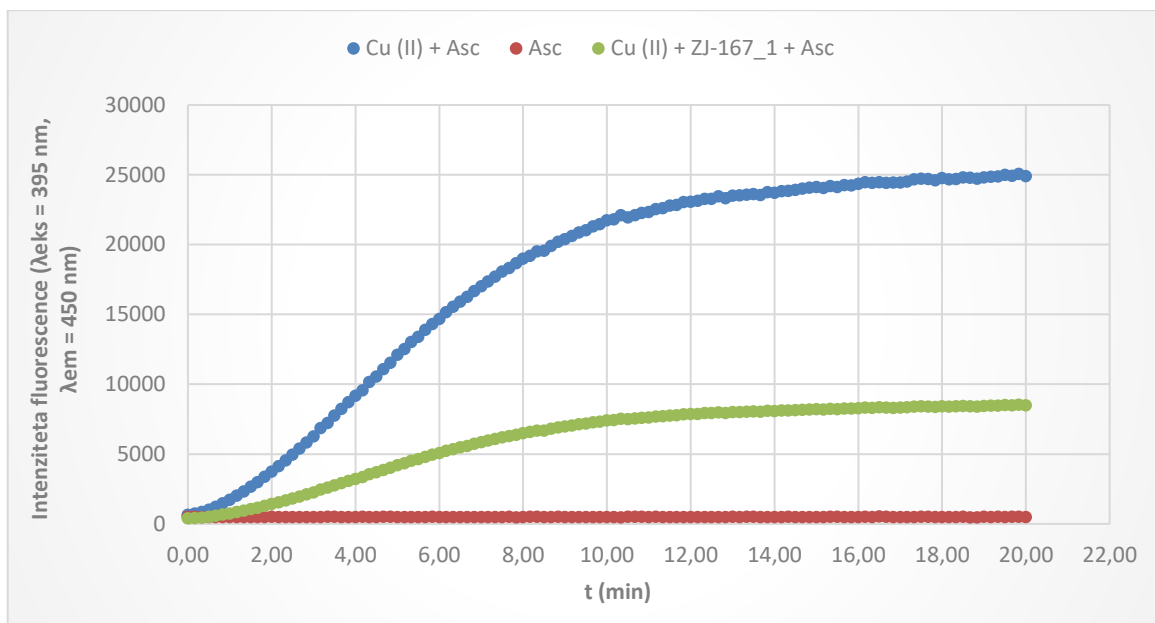
5.1. ASKORBATNI TEST - TEST INHIBICIJE FENTONOVE REAKCIJE, KATALIZIRANE S Cu^{2+} IONI

Z askorbatnim testom smo pri testiranih spojinah ovrednotili zmožnost vezave bakrovih ionov. Potek Fentonove reakcije smo spremljali preko porasta fluorescence. Slike 11 – 18 prikazujejo emisijske spektre testiranih spojin:

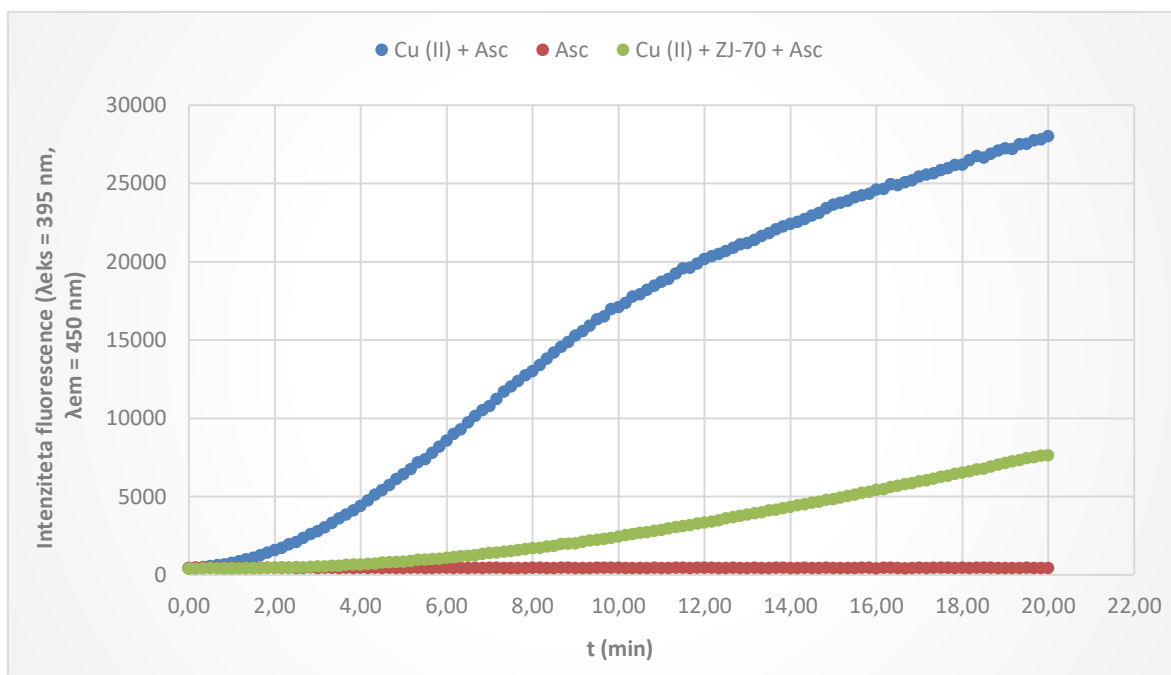
Modre točke predstavljajo meritve pozitivne kontrole in intenziteto fluorescence nastale spojine 7-hidroksi-CCA po inkubaciji CCA z Cu^{2+} ioni in Asc. Rdeče točke predstavljajo meritve negativne kontrole, saj reakcija brez Cu^{2+} ionov ni mogla poteči in tako pričakovano ni bilo porasta fluorescence. Zelene točke pa predstavljajo porast fluorescence v prisotnosti testirane spojine, oziroma sposobnost testirane spojine za vezavo Cu^{2+} ionov in inhibicijo Fentonove reakcije.



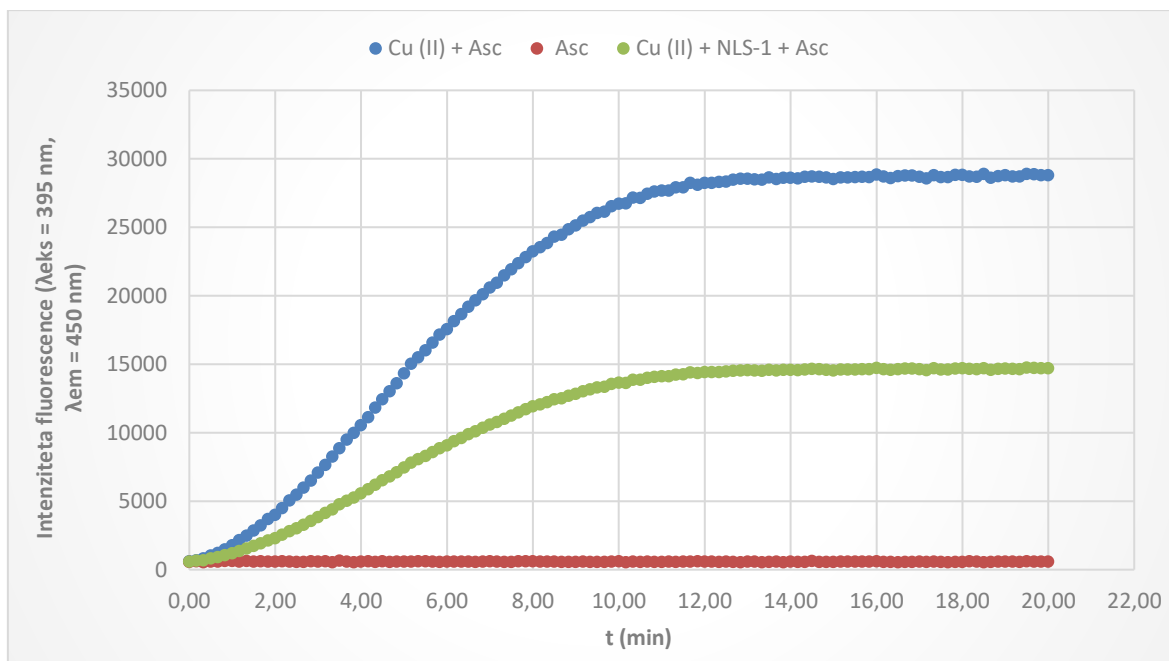
Slika 11: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu^{2+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-176.



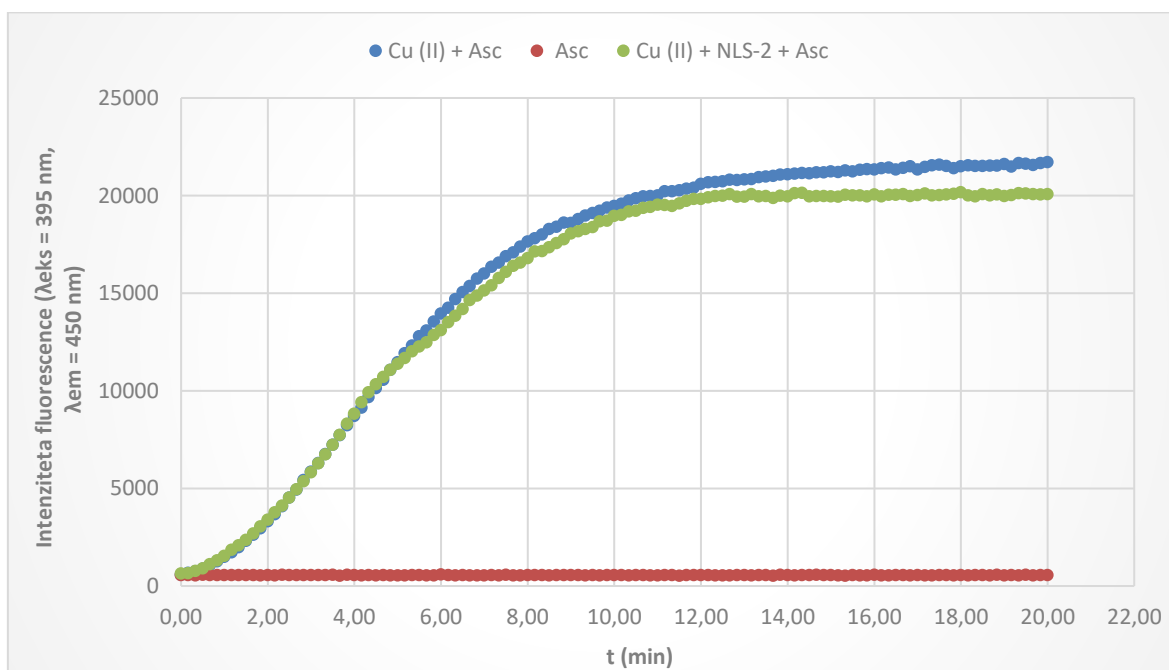
Slika 12: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu^{2+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-167_1.



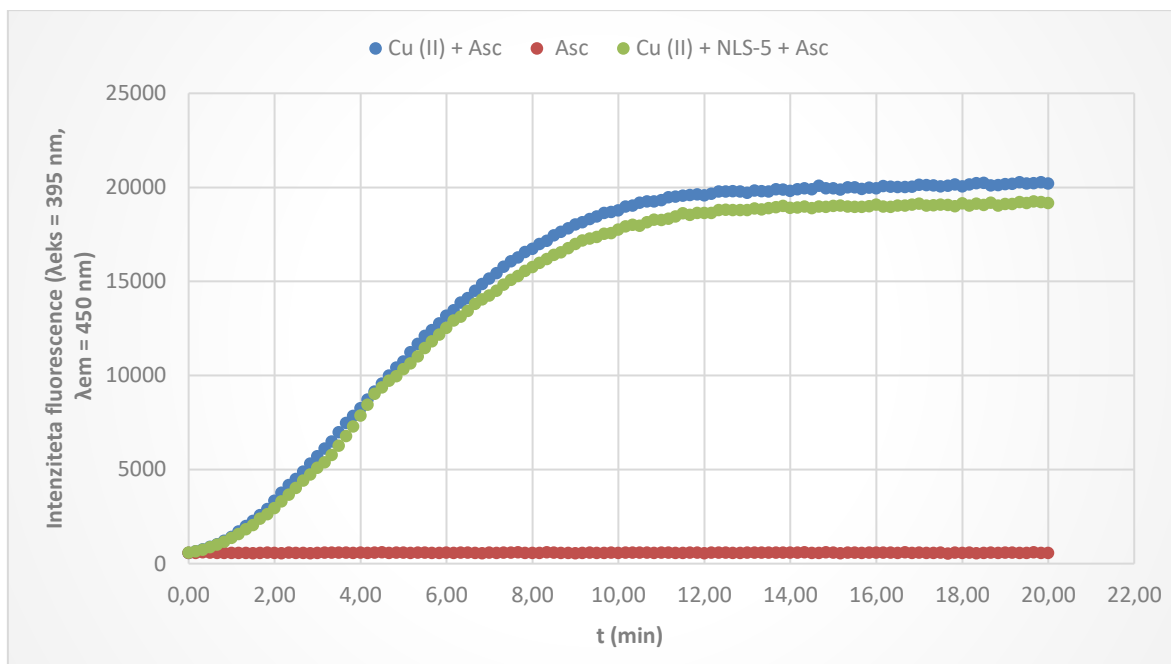
Slika 13: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu^{2+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-70.



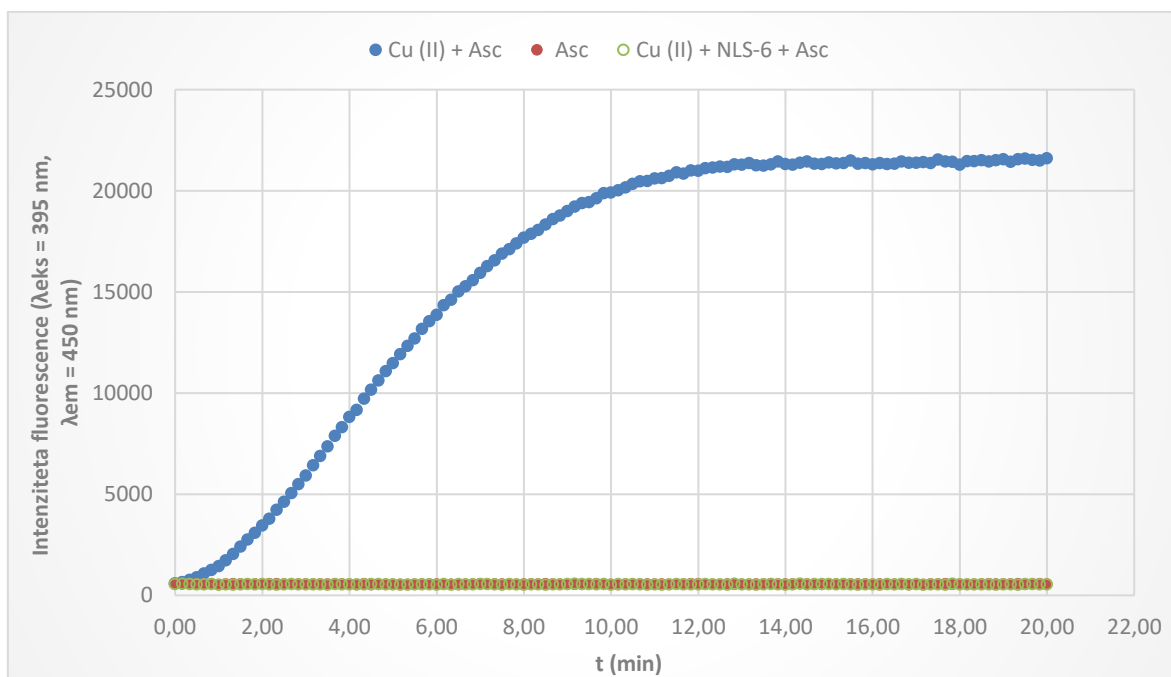
Slika 14: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu^{2+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-1.



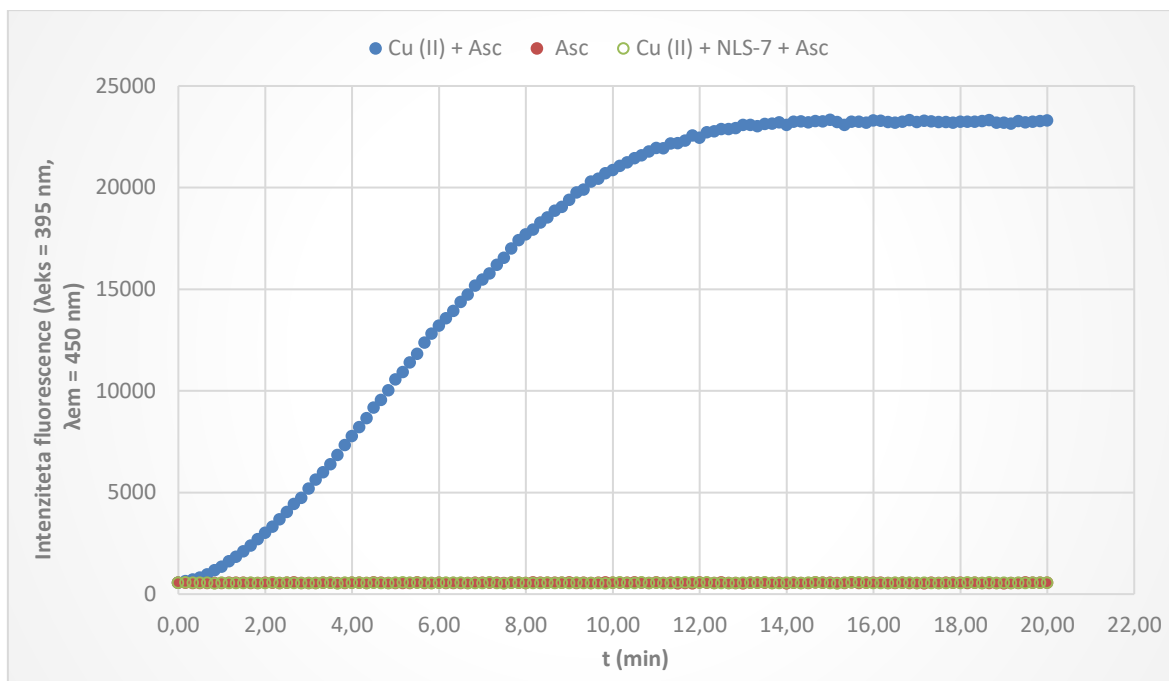
Slika 15: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu^{2+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-2.



Slika 16: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu^{2+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-5.



Slika 17: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu^{2+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-6.



Slika 18: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Cu^{2+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-7.

Sposobnost vezave Cu^{2+} ionov se pri testiranih spojinah razlikuje zaradi različnih funkcionalnih skupin v njihovi strukturi. Spojine z oznako ZJ uvrščamo v skupino oksimov, saj imajo na obroču vezano oskimsko (=NOH) skupino. Spojina s petčlenskim piperidin-2,5-dionskim skeletom (ZJ-167_1) izkazuje slabšo sposobnost vezave Cu^{2+} ionov kot pa spojini, ki imata v svoji strukturi šestčlenski piperidin-2,6-dionski skelet (ZJ-176 in ZJ-70). Spojine z oznako NLS pa uvrščamo med derivate benzilidin pirimidinov in polifenolov, saj imajo v svoji strukturi pirimidindionski in fenolni obroč, ki lahko vežeta kovinske ione. Med seboj smo primerjali spojine s podobno zgradbo in opazili razlike v sposobnosti vezave Cu^{2+} ionov. Pri spojinah NLS-2 in NLS-5, kjer se niz zelenih točk praktično prekriva z modrimi točkami, vidimo slabšo sposobnost vezave Cu^{2+} ionov kot pri spojinah NLS-6 in NLS-7, ki dobro vežeta Cu^{2+} ione zaradi vezanega žveplovega atoma na pirimidindionskem obroču. Pri spojini NLS-1, kjer se niz zelenih točk nahaja vmes med negativno in pozitivno kontrolo, pa lahko rečemo, da delno kelira Cu^{2+} ione in tako upočasni Fentonovo reakcijo. Spojina NLS-6 v primerjavi s spojino NLS-1 bolje veže Cu^{2+} ione, saj ima na pirimidindionskem obroču vezan žveplov atom namesto kisikovega. Iz istega razloga opazimo boljše sposobnost vezave Cu^{2+} ionov pri spojini NLS-7 v

primerjavi s spojino NLS-5. Spojina NLS-1 pa v primerjavi s spojino NLS-2 bolje veže Cu^{2+} ione zaradi dveh prostih hidroksilnih skupin na benzilidenskem obroču.

Preglednica X prikazuje, kako dobro naše spojine vežejo Cu^{2+} ione v odstotkih, glede na pozitivno kontrolo. Vrednost, kjer je pozitivna kontrola dosegla plato pri posamezni spojini (med 20000 in 30000 RFU enot), smo vzeli kot 100% vrednost in nato intenziteto fluorescenc naših spojin primerjali s to vrednostjo.

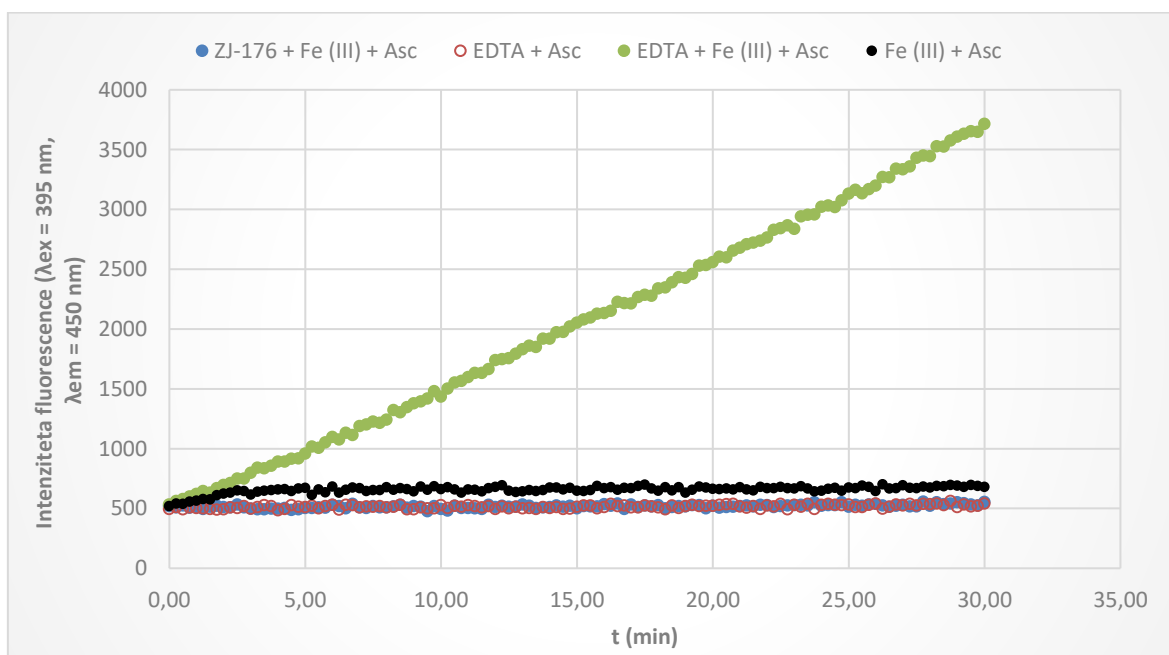
Preglednica X: Prikaz % maksimalne vrednosti po 20 minutah za posamezno spojino.

Spojina	% maks. vrednosti po 20min
ZJ-176	16
ZJ-167_1	60
ZJ-70	27
NLS-1	55
NLS-2	95
NLS-5	95
NLS-6	2
NLS-7	2

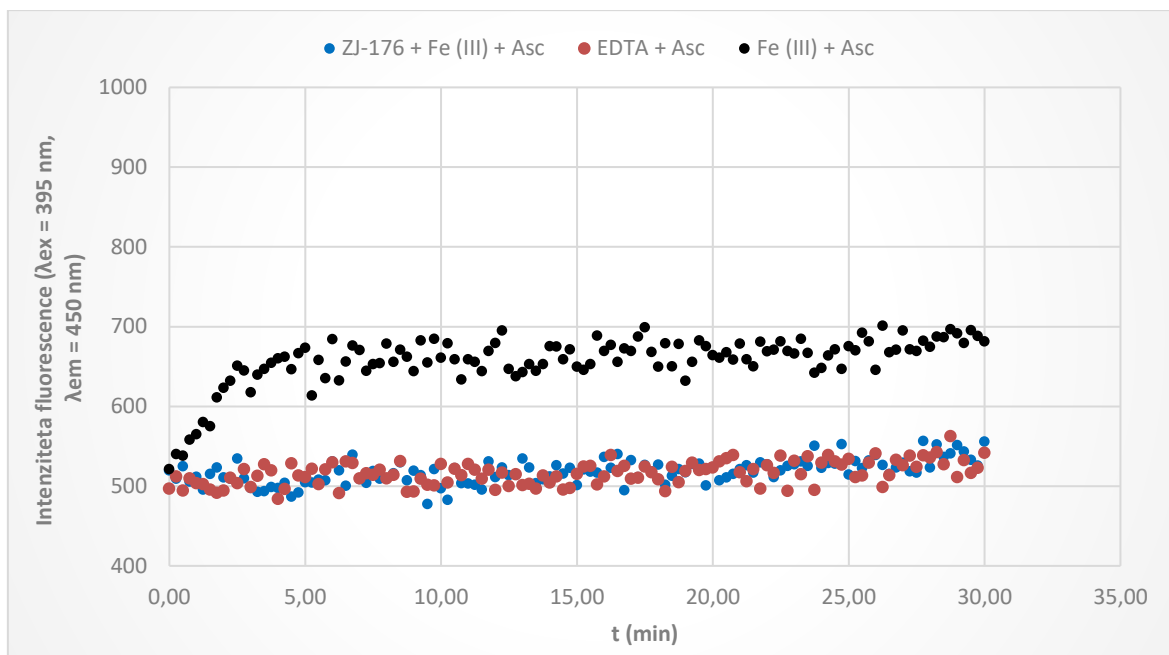
5.2. ASKORBATNI TEST - TEST INHIBICIJE FENTONOVE REAKCIJE, KATALIZIRANE Z Fe^{3+} IONI

Z askorbatnim testom smo pri testiranih spojinah ovrednotili zmožnost vezave železovih ionov. Potek Fentonove reakcije smo spremljali preko porasta fluorescence. Slike 19 – 34 prikazujejo emisijske spektre testiranih spojin:

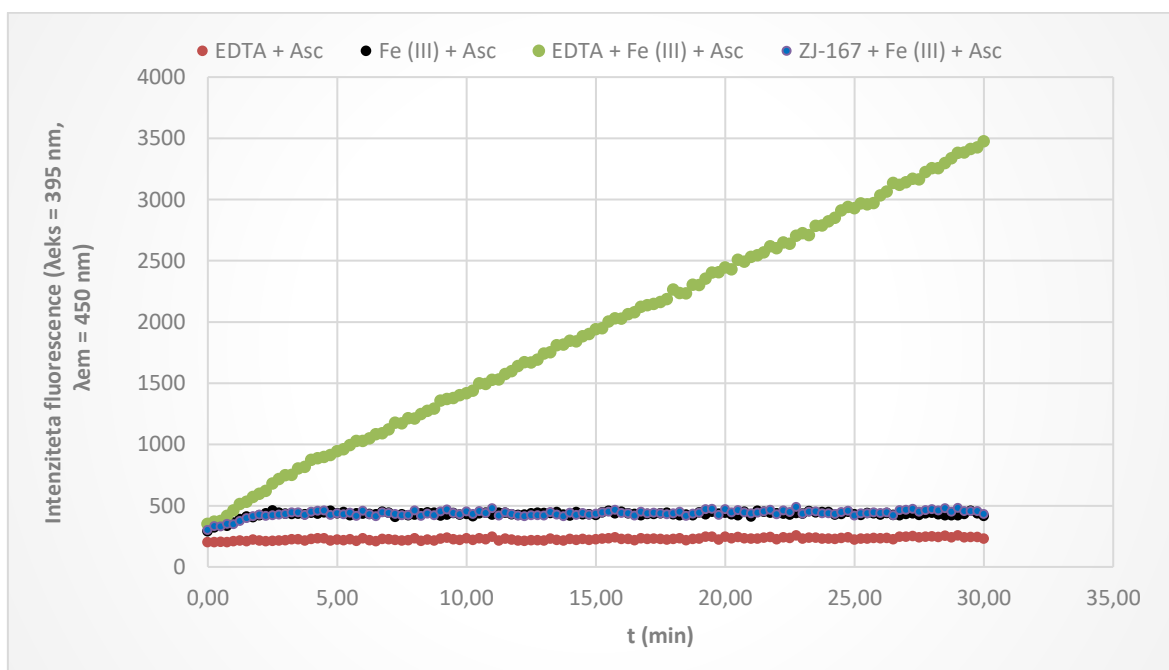
Zelene in črne točke predstavljajo meritve pozitivne kontrole in intenziteto fluorescence nastale koordinacijske spojine med EDTA in Fe^{3+} ioni (zelena), oziroma med CCA in Fe^{3+} ioni ter askorbatom (črna). Za vsako spojino smo dodali še sliko brez pozitivne kontrole z EDTA, saj smo želeli prikazati, da reakcija med EDTA in Fe^{3+} ioni poteka veliko hitreje. Rdeče točke predstavljajo meritve negativne kontrole, saj reakcija brez Fe^{3+} ionov ni mogla poteči in tako pričakovano ni bilo porasta fluorescence. Modre točke pa predstavljajo porast fluorescence v prisotnosti testirane spojine, oziroma sposobnost testirane spojine za vezavo Fe^{3+} ionov in inhibicijo Fentonove reakcije.



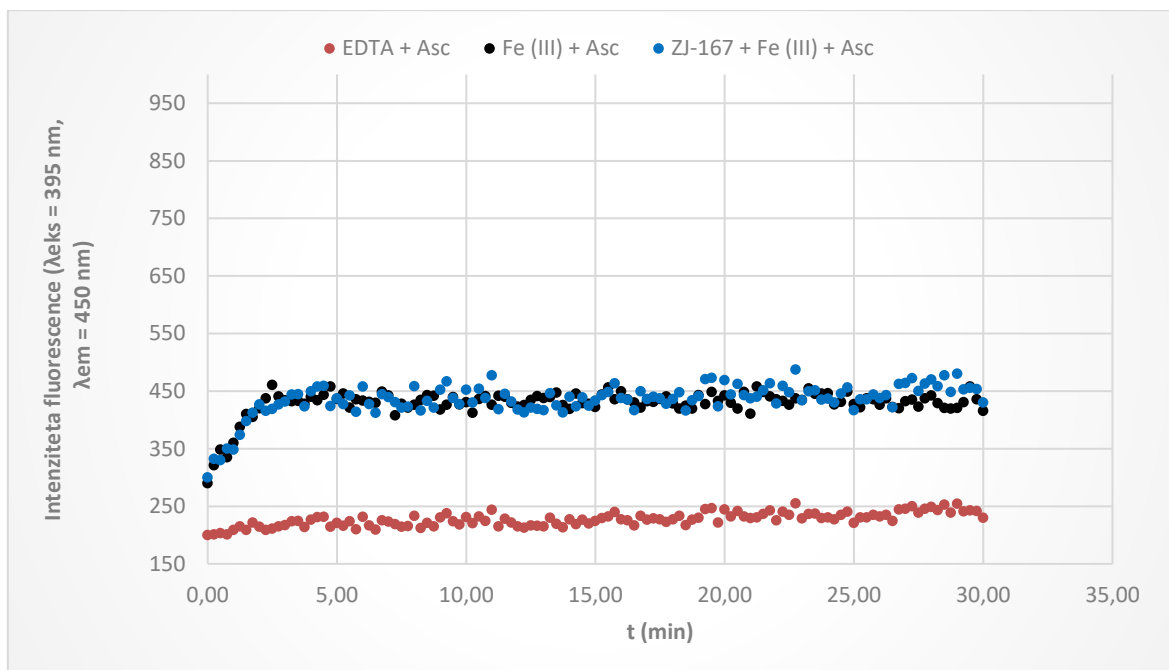
Slika 19: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-176.



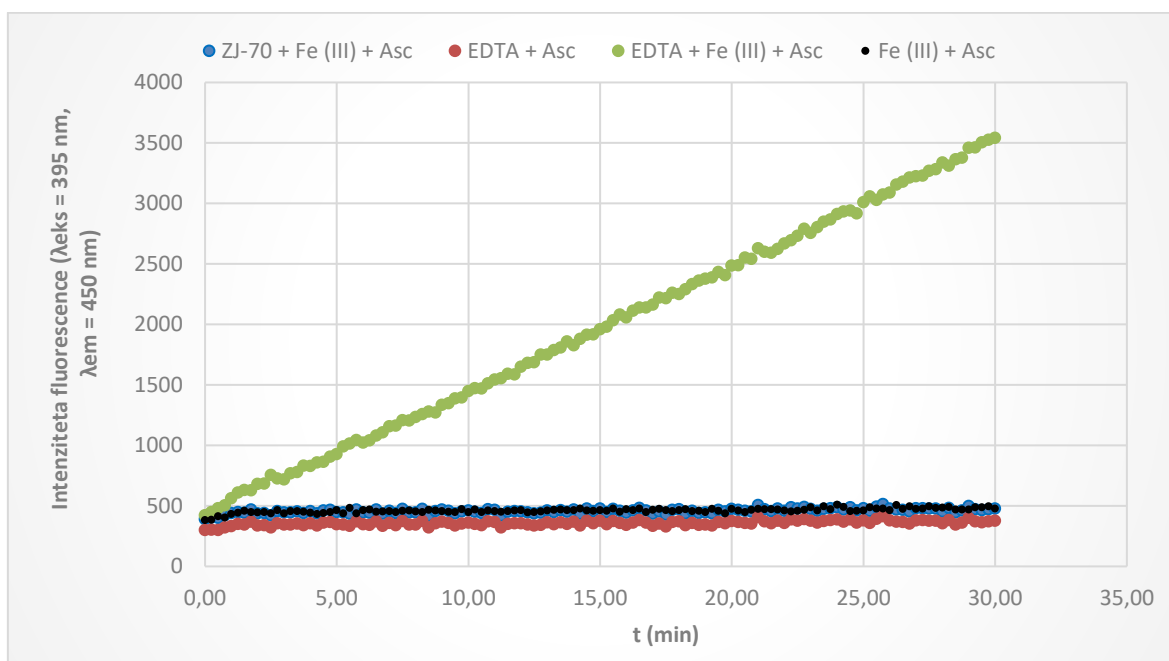
Slika 20: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-176, brez EDTA.



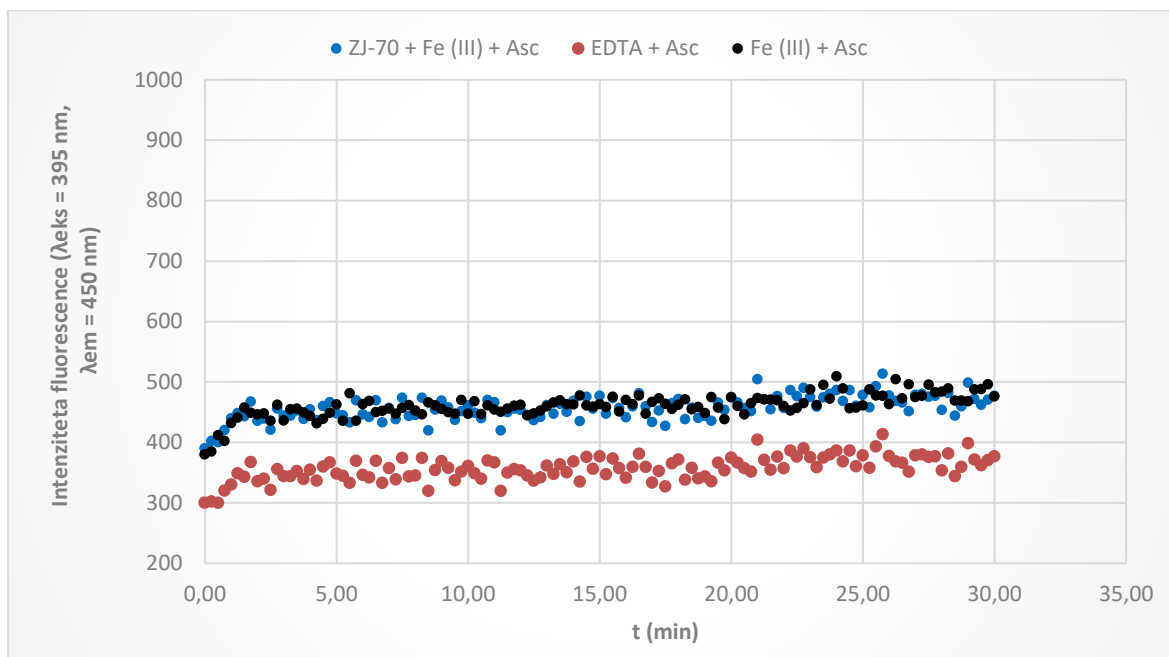
Slika 21: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-167_1.



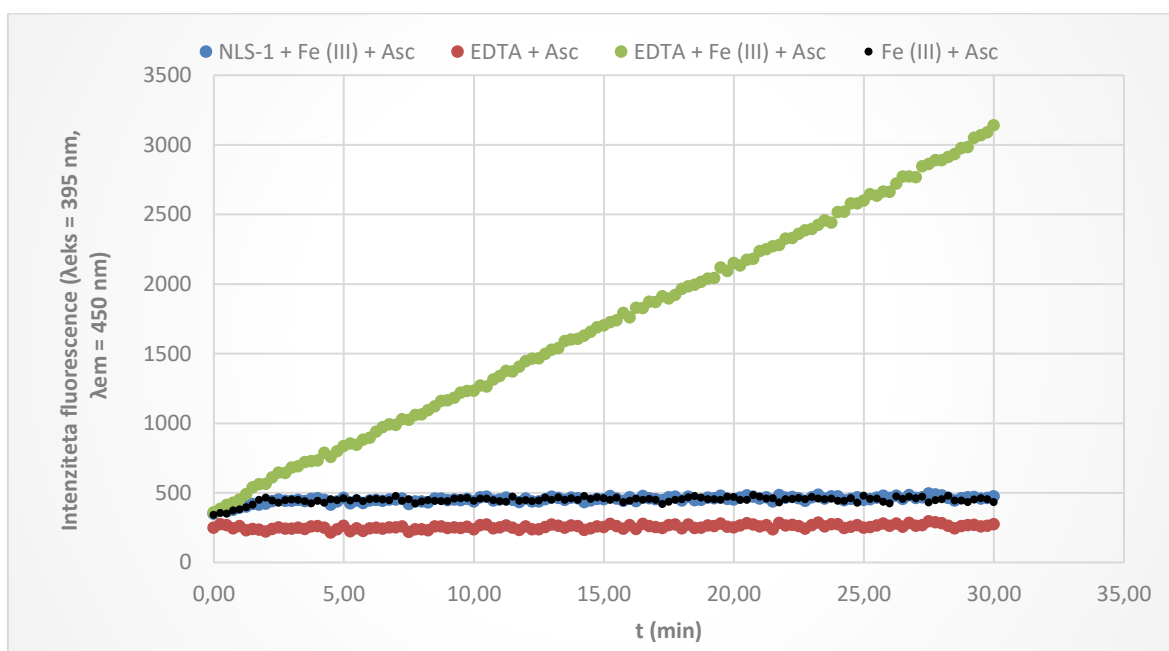
Slika 22: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-167_1, brez EDTA.



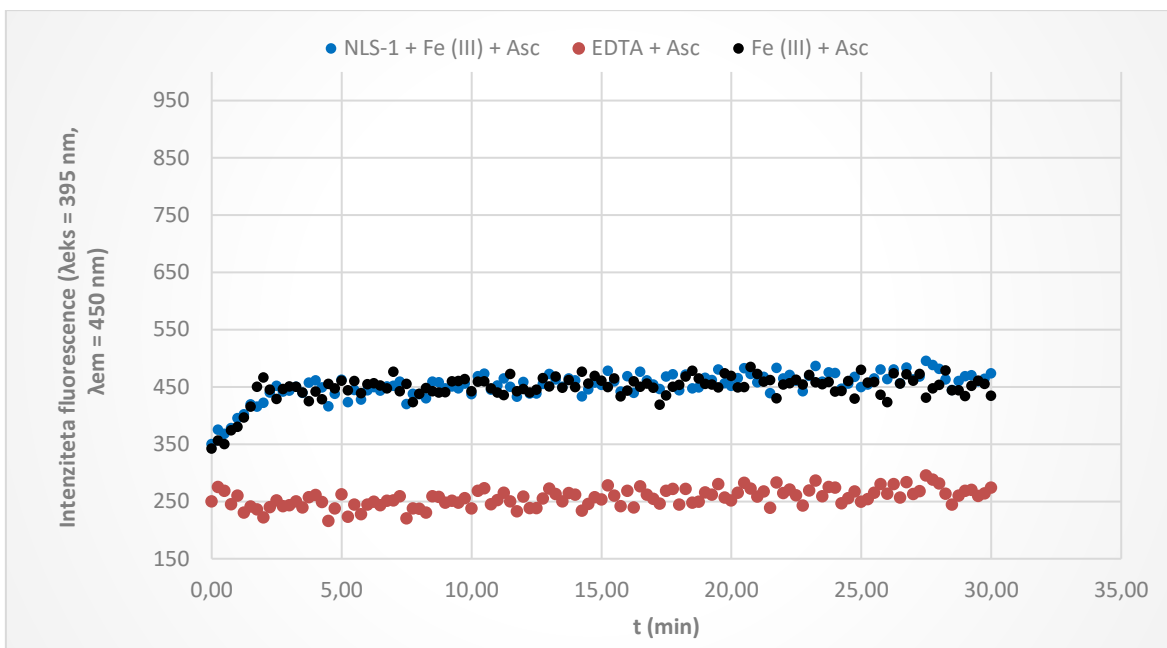
Slika 23: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-70.



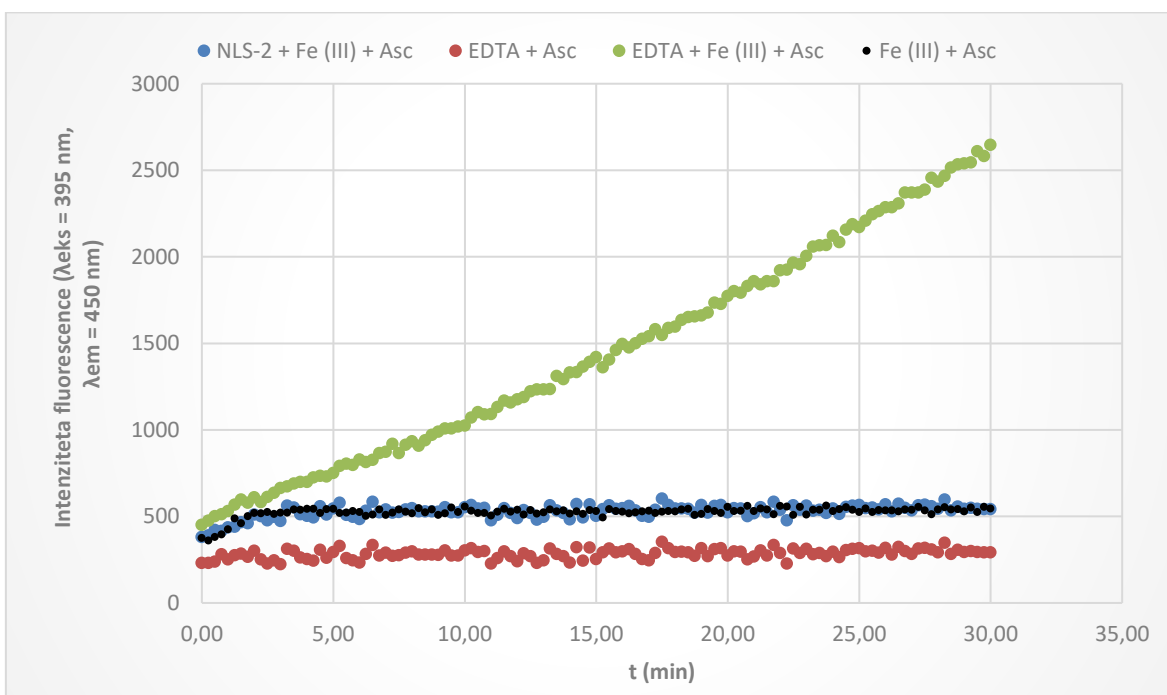
Slika 24: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino ZJ-70, brez EDTA.



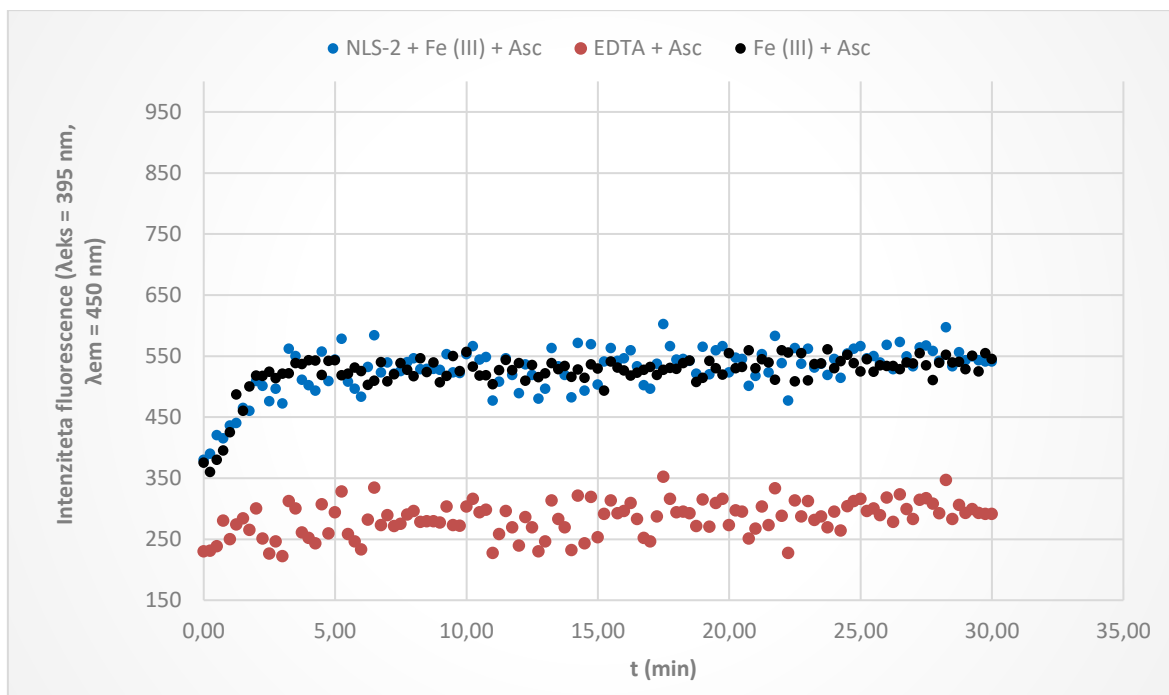
Slika 25: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-1.



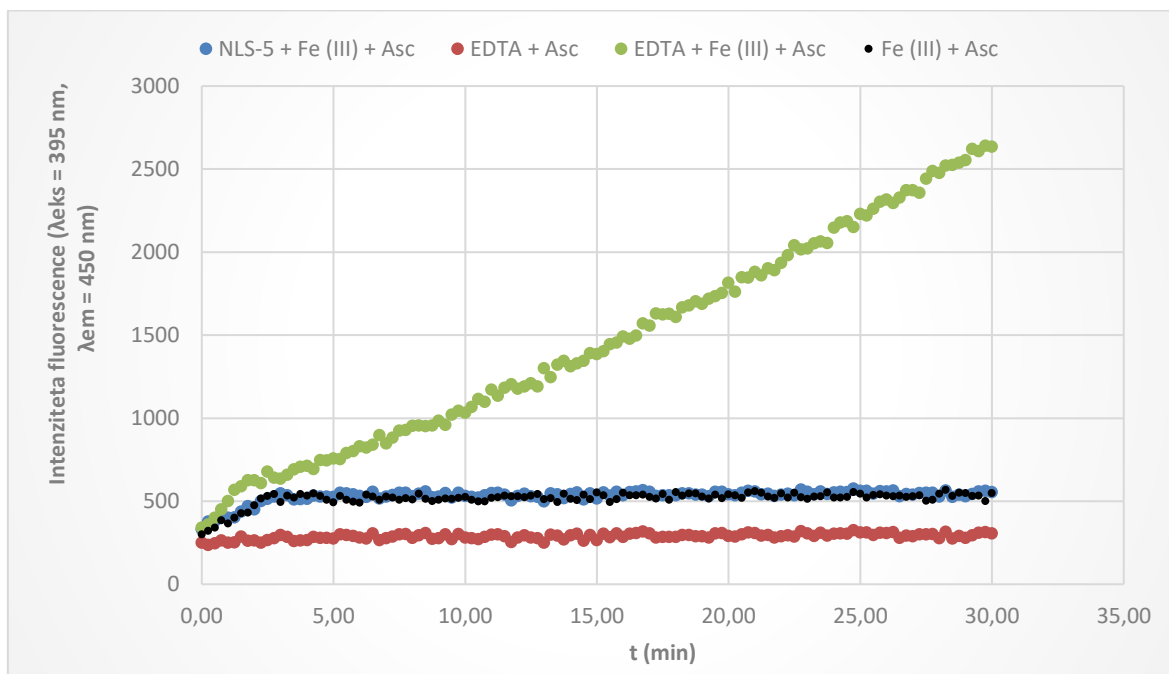
Slika 26: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-1, brez EDTA.



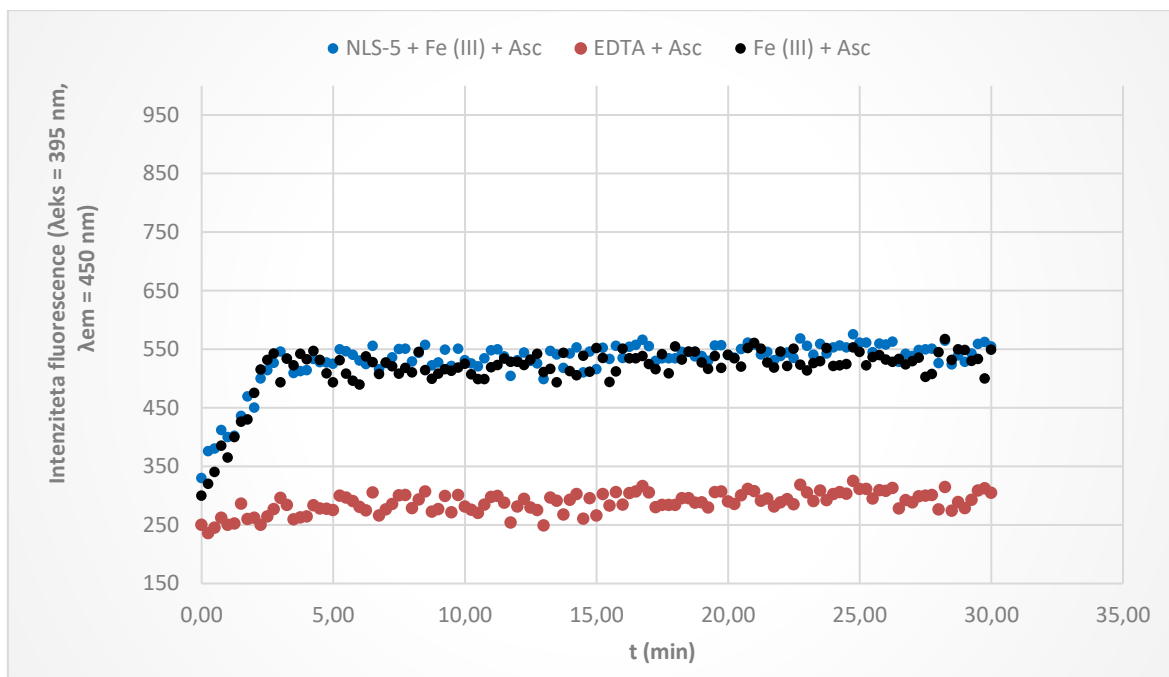
Slika 27: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-2.



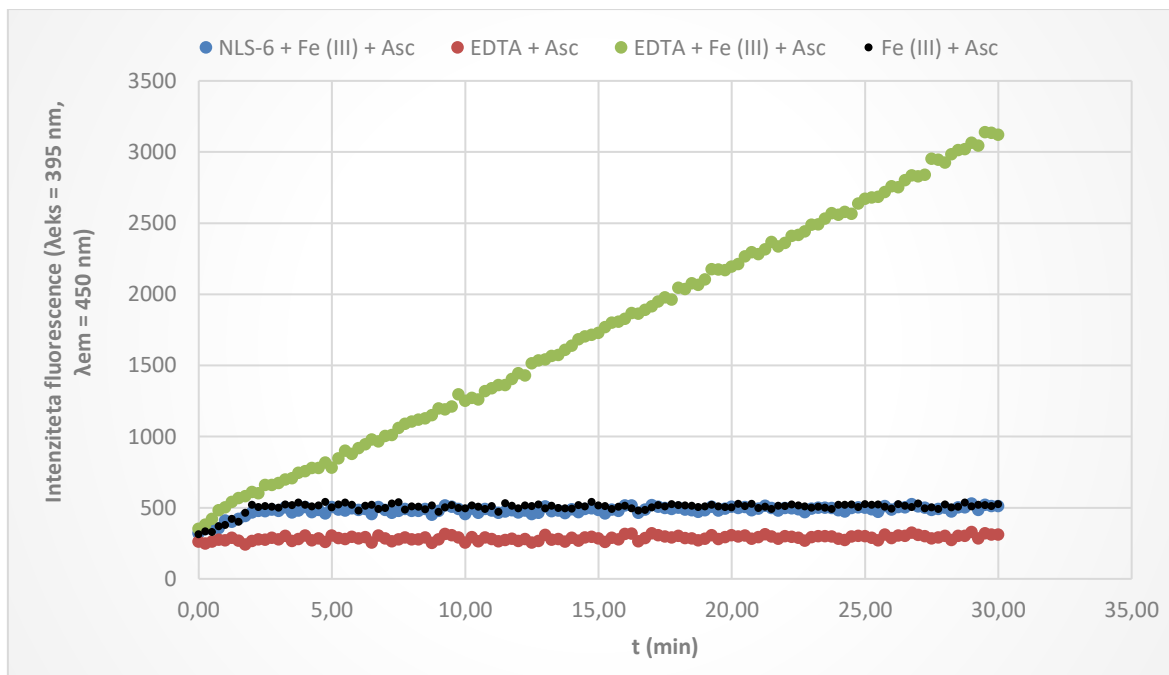
Slika 28: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-2, brez EDTA.



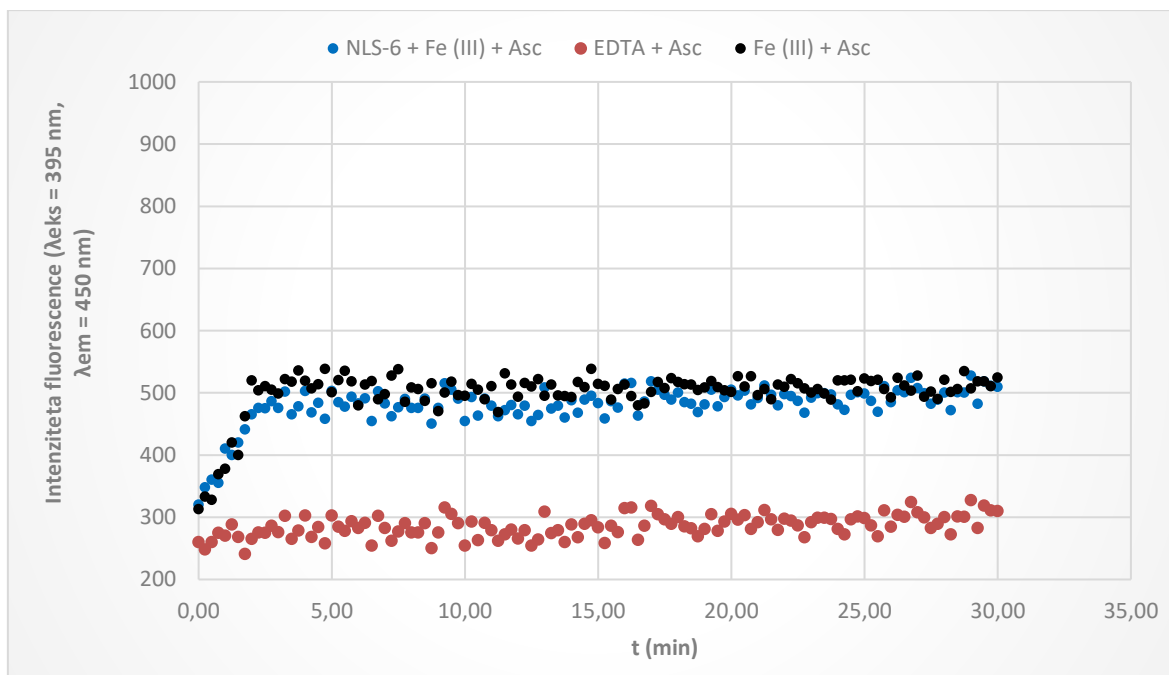
Slika 29: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-5.



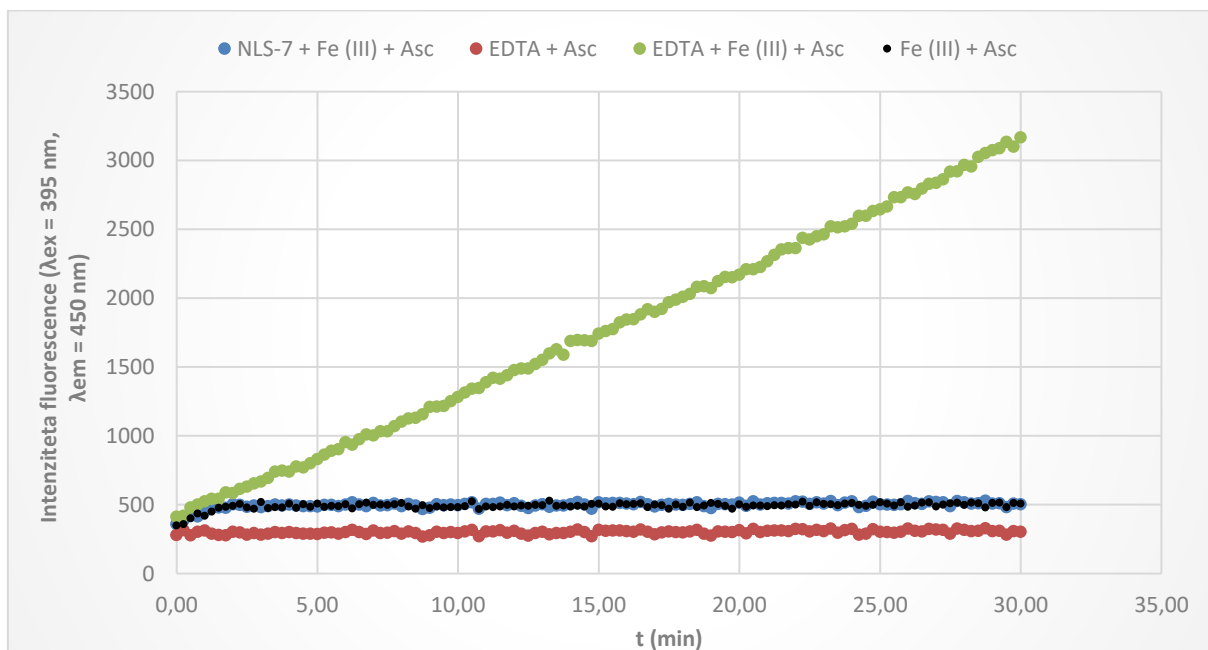
Slika 30: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-5, brez EDTA.



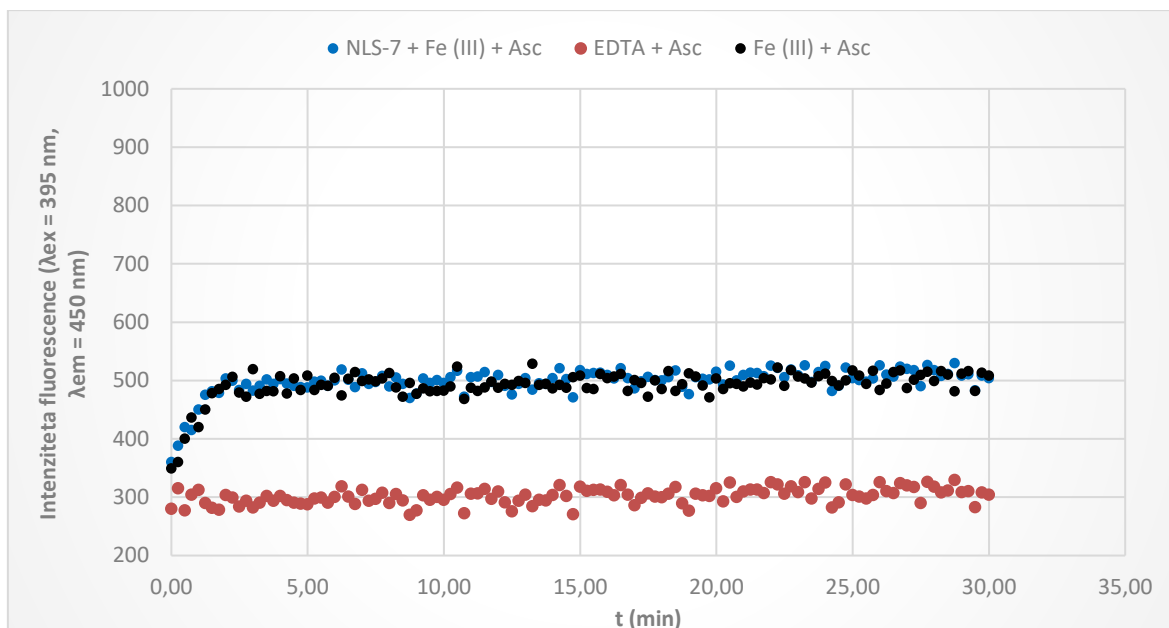
Slika 31: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-6.



Slika 32: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-6, brez EDTA.



Slika 33: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-7.



Slika 34: Intenziteta fluorescenc posameznih raztopin; vpliv vezave Fe^{3+} ionov na potek Fentonove reakcije za spojino NLS-7, brez EDTA.

Iz slik 19-34 je razvidno, da z EDTA kelirani železovi ioni bistveno pospešijo Fentonovo reakcijo (zelene točke) v primerjavi s prostimi železovimi ioni (črne točke), kjer poteka Fentonova reakcija počasneje, kot s prostimi bakrovimi ioni. EDTA namreč spremeni energijo 3d orbital v Fe^{3+} , tako da redoks reakcija poteče hitreje (27).

Sposobnost vezave Fe^{3+} ionov se pri testiranih spojinah razlikuje, saj vsebujejo različne funkcionalne skupine v strukturi. Spojina s petčlenskim piperidin-2,5-dionskim skeletom (ZJ-167_1) izkazuje slabo sposobnost vezave Fe^{3+} , prav tako spojin, ki imata v svoji strukturi šestčlenski piperidin-2,6-dionski skelet (ZJ-176 in ZJ-70). Večjo afiniteto do Fe^{3+} ionov izkazujejo NLS spojine, ki imajo na mestu 2 pirimidindionskega skeleta vezan žveplov oziroma kisikov atom in so hkrati derivati polifenolov. Med seboj smo primerjali spojine s podobno zgradbo in opazili razlike v sposobnosti vezave Fe^{3+} ionov. Spojini NLS-1 in NLS-6 izkazujeta zelo dobro sposobnost vezave Fe^{3+} ionov in s tem inhibicijo Fentonove reakcije, saj imata na B aromatskem obroču vezani dve OH skupini. Spojine NLS-2, 5 in 7, ki imajo na B aromatskem obroču vezano po le eno OH skupino, pa izkazujejo slabšo sposobnost vezave Fe^{3+} ionov. Spojina NLS-6 v primerjavi s spojino NLS-1 bolje veže Fe^{3+} ione, saj ima na pirimidindionskem obroču vezan žveplov atom

namesto kisikovega. Spojina NLS-1 pa v primerjavi s spojino NLS-2 bolje veže Fe^{3+} ione zaradi dveh prostih hidroksilnih skupin na benzilidenskem obroču.

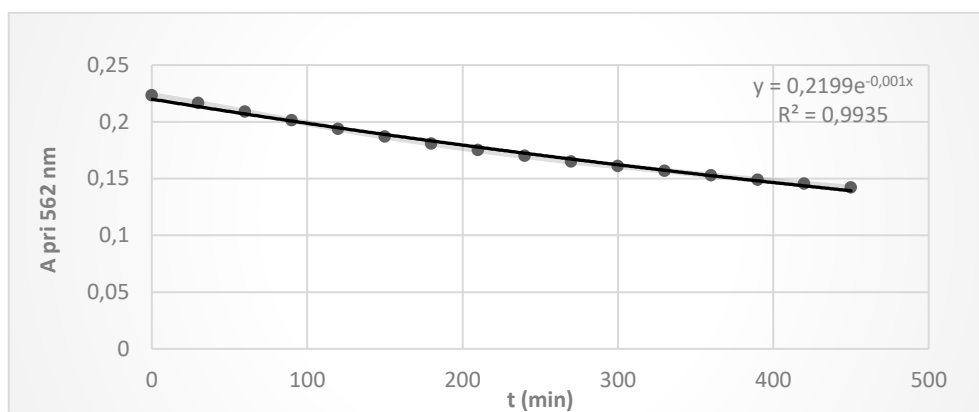
V primerjavi z Cu^{2+} ioni, poteka reakcija z Fe^{3+} ioni približno petdesetkrat počasneje, zato po 30 minutah ni bilo vidnega porasta fluorescence. Reakcijo smo zato ponovno pomerili naslednji dan, po 24 urah in primerjali medsebojne intenzitete fluorescenc. Vrednosti prikazuje preglednica XI.

Preglednica XI: Prikaz intenzitet fluorescenc po 30 minutah in 24 urah za posamezno spojino.

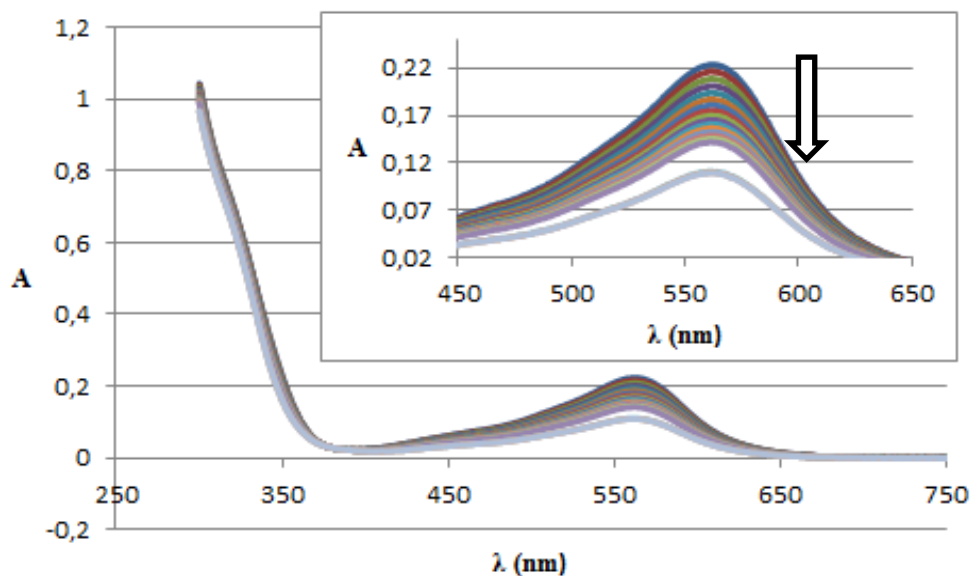
Spojina	Intenziteta fluorescence po 30 min	Intenziteta fluorescence po 24h
ZJ-176	664	6687
ZJ-167_1	439	7993
ZJ-70	463	8419
NLS-1	452	2164
NLS-2	532	5251
NLS-5	527	4928
NLS-6	509	1575
NLS-7	497	5053

5.3. FEROSINSKI TEST

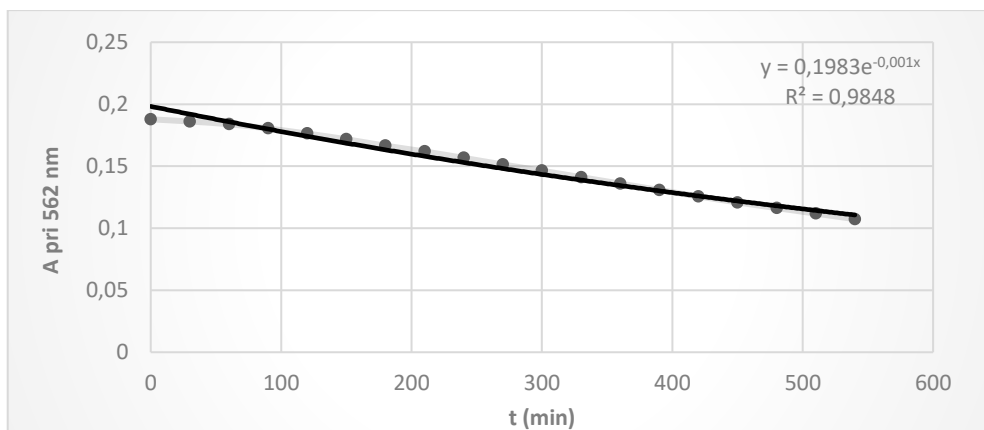
Ferozin tvori z Fe^{2+} ioni kompleks, ki ga zaznamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 562 nm. Ko smo nastalemu kompleksu dodali izbrani spojini in ponovno pomerili spekter, se je absorbanca ferozinskega kompleksa po vsakem merjenju nekoliko znižala. Ker ne vemo, ali naši spojini vežeta Fe^{2+} ione, lahko ta pojav delno pripišemo tudi oksidaciji Fe^{2+} ionov do Fe^{3+} , saj je bila raztopina v kivetki v stiku s kisikom iz zraka med samo meritvijo. Fe^{3+} ione pa naši spojini zelo dobro vežeta. Idealno bi torej bilo, da se spekter ferozinskega kompleksa ne bi nič spremenil.



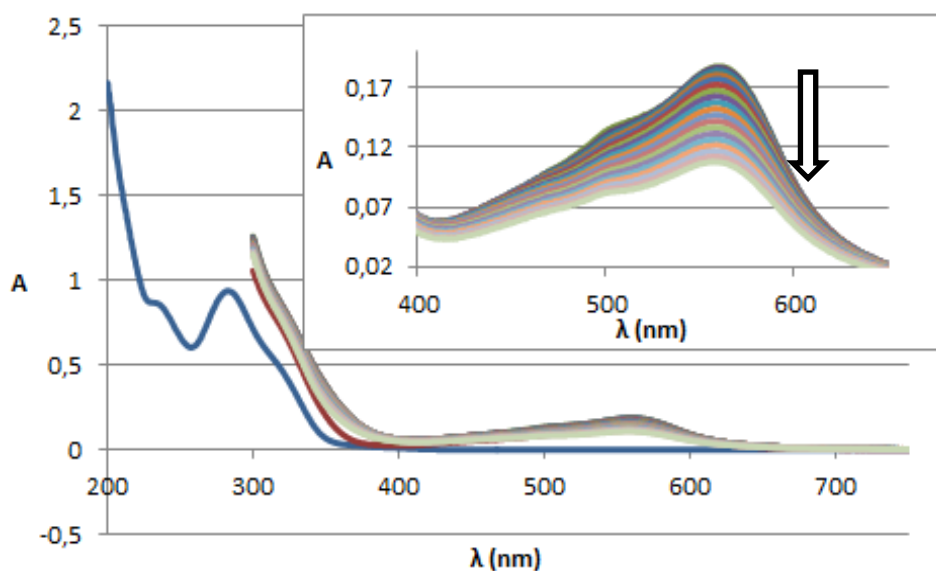
Slika 35: Stabilnost kompleksa ferozin- Fe^{2+} pri 562 nm v prisotnosti spojine ZJ-176.



Slika 36: UV-Vis spektri kompleksa ferozin- Fe^{2+} pri 562 nm v prisotnosti raztopine vzorca ZJ-176, merjeni v 30 minutnih intervalih.



Slika 37: Stabilnost kompleksa ferozin-Fe²⁺ pri 562 nm v prisotnosti spojine NLS-6.



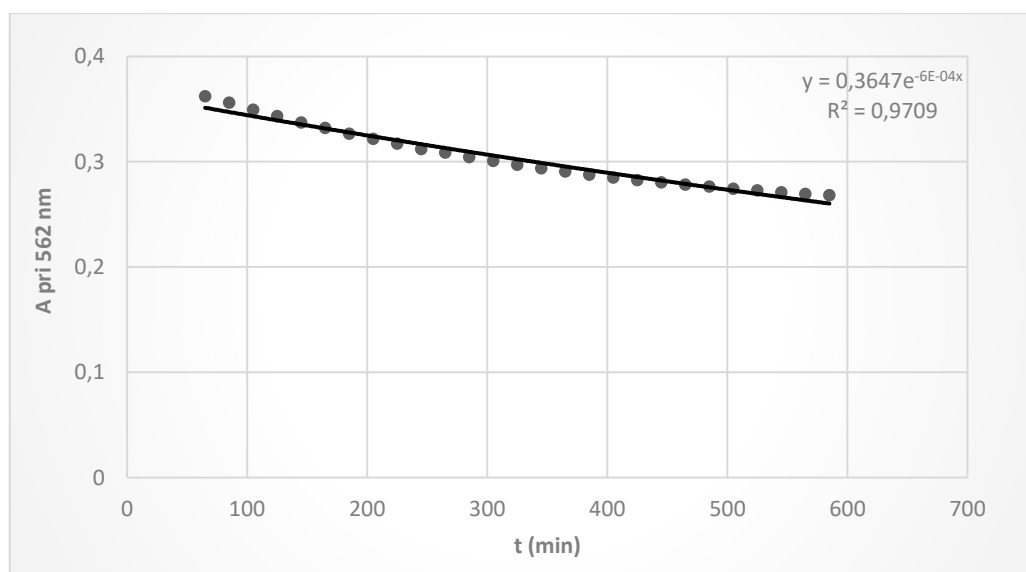
Slika 38: UV-Vis spektri kompleksa ferozin-Fe²⁺ pri 562 nm v prisotnosti raztopine vzorca NLS-6, merjeni v 30 minutnih intervalih.

5.4. STABILNOST KOMPLEKSA FEROZIN-Fe²⁺ BREZ PRISOTNOSTI LIGANDA (VZORCA) IN OB PRISOTNEM LIGANDU

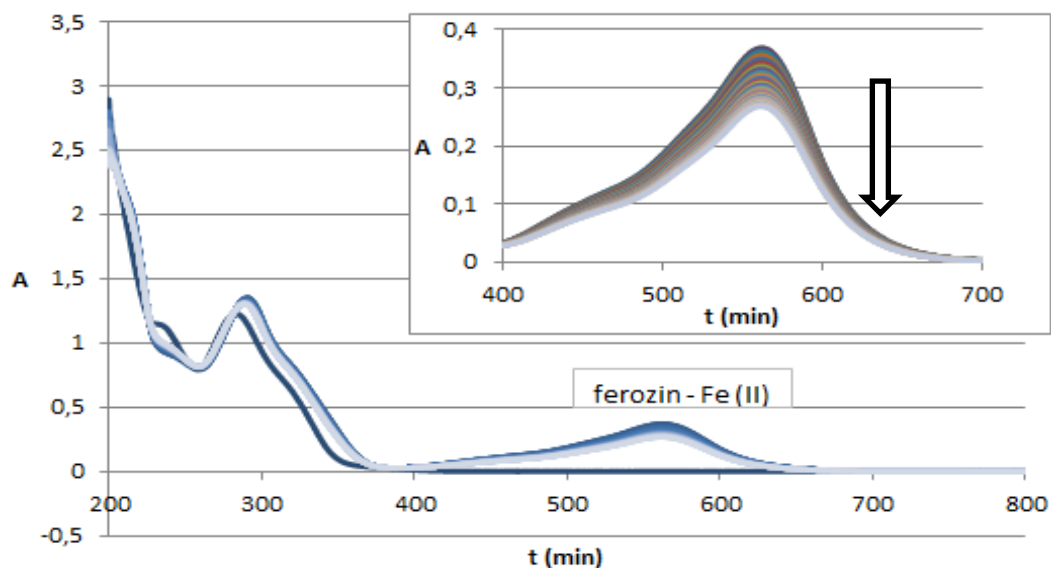
Pri tem testu smo se odločili za spojino ZJ-167_1, saj se je pri askorbatnem testu izkazalo, da ni najboljši kelator železovih ionov. Sklepali smo, da bi tako morda nastal kompleks ferozin-Fe²⁺. V prvem sklopu smo pomerili spektre kompleksa ferozin-Fe²⁺ v 20 minutnih intervalih, v drugem sklopu pa smo nato izvedli test s ferozinom v obratnem vrstnem redu.

1. Absorbanca ferozinskega kompleksa pri 562 nm se je po vsakem merjenju nekoliko znižala, kar pripisujemo pojavu oksidacije Fe²⁺ ionov do Fe³⁺, saj je bila raztopina v kiveti v stiku s kisikom iz zraka med samo meritvijo.

Ker padajoče vrednosti absorbanc izkazujejo lastnosti eksponentne funkcije, smo s pomočjo programa Microsoft Excel 2016 izrisali eksponentno trendno črto. Vrednost R² znaša 0,9709 in prikazuje dobro ujemanje črte s podatki.

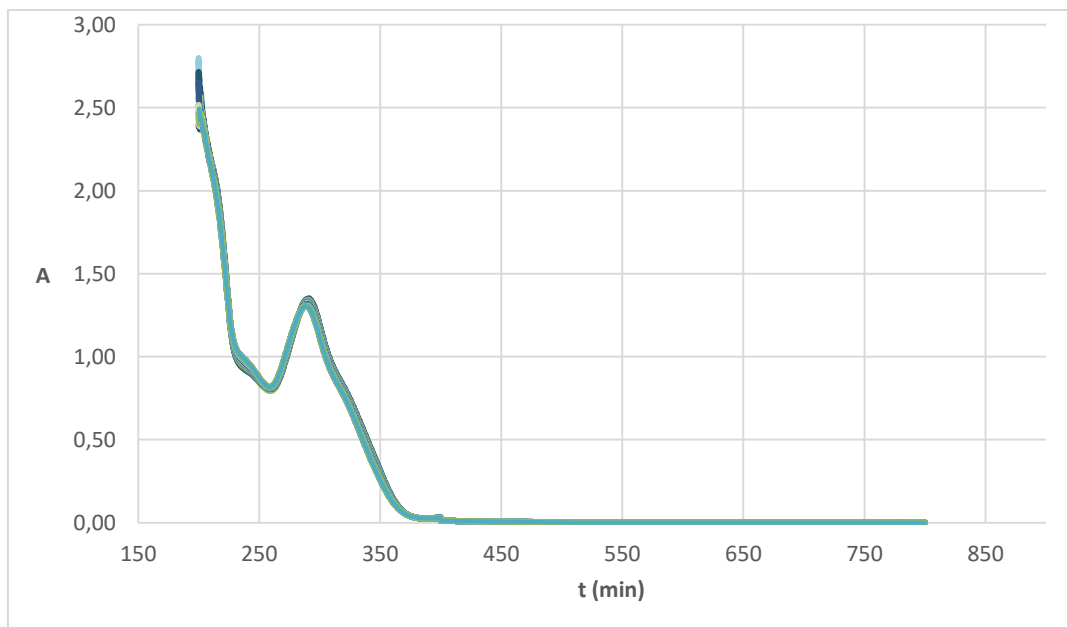


Slika 39: Stabilnost kompleksa ferozin-Fe²⁺ pri 562 nm.



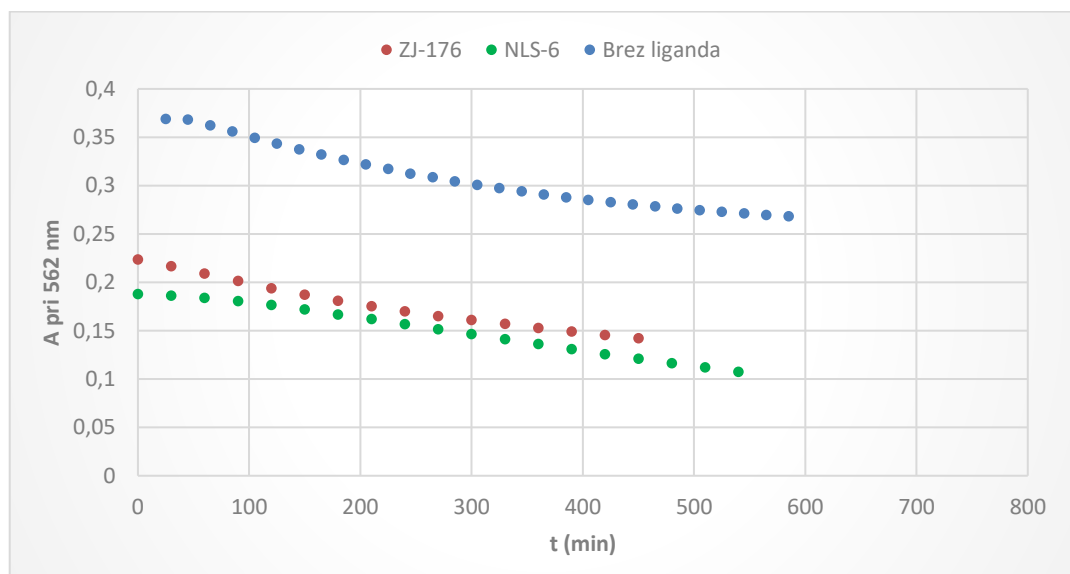
Slika 40: UV-Vis spektri kompleksa ferrozin-Fe²⁺ pri 562 nm, merjeni v 20 minutnih intervalih.

2. V drugem poskusu, kjer smo izvedli test s ferrozinom v obratnem vrstnem redu, kompleks pri 562 nm ni nastal. To pomeni, da je spojina ZJ-167_1 vseeno boljši kelator železovih ionov, kot pa ferrozin.



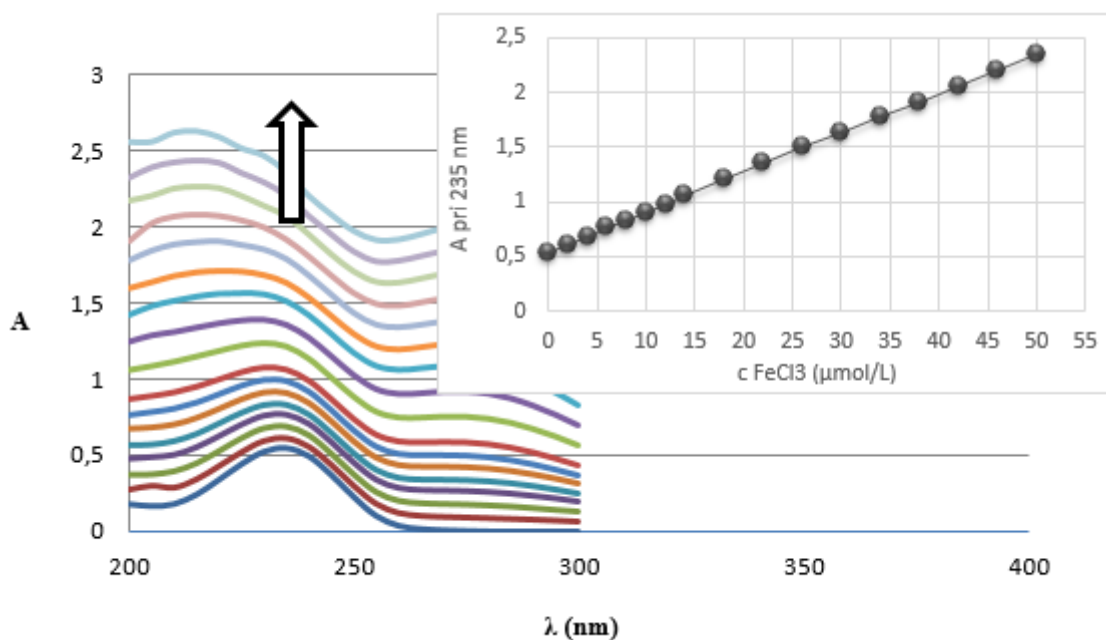
Slika 41: Odsotnost kompleksa ferrozin-Fe²⁺ pri 562 nm.

Iz naklonov krivulj (slika 42) je razvidno, da je pri ferozinskem testu ob prisotnem ligandu nastalo bistveno manj ferozinskega kompleksa, kot pa v njegovi odsotnosti. Prav tako lahko zaključimo, da poteka oksidacija Fe^{2+} ionov do Fe^{3+} v vseh treh primerih najverjetneje z enako hitrostjo, saj je naklon vseh treh krivulj približno enak.



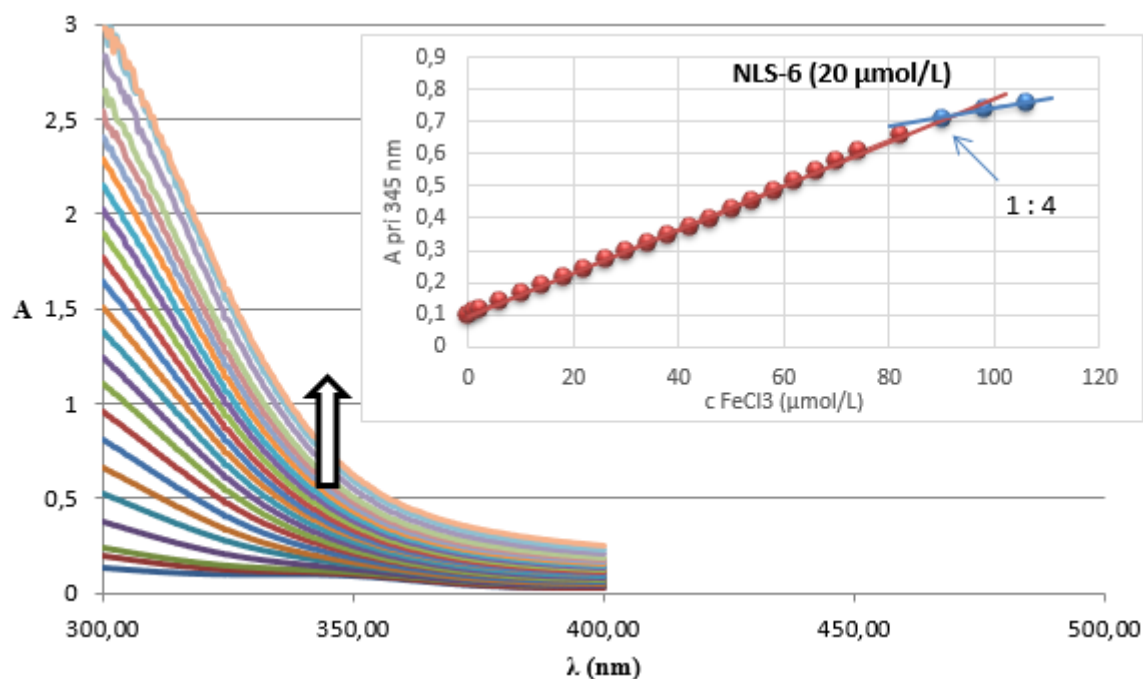
Slika 42: Primerjava naklonov krivulj ob prisotnem ligandu (vzorcu) in brez prisotnega liganda pri 562 nm.

5.5. DOLOČITEV STEHIOMETRIJSKEGA RAZMERJA MED VZORCEM IN Fe^{3+} S TITRACIJO Z Fe^{3+} IONI



Slika 43: A) Spektrofotometrična UV-Vis titracija 20 μM ZJ-176 v prisotnosti 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 in 50 μM FeCl₃. B) Grafični prikaz nastanka kompleksa ZJ-176-Fe³⁺ pri 235 nm.

Absorpcijski spekter spojine ZJ-176 je ves čas naraščal po dodatku Fe^{3+} ionov, vendar pa se oblika spektra ni bistveno spreminjala, niti se ni pojavila izozbestična točka (točka, ki predstavlja specifično valovno dolžino, pri kateri se absorbanca vzorca tekom reakcije več ne spreminja). Pri 235 nm smo izrisali titracijsko krivuljo s pomočjo programa Microsoft Excel 2016, vendar spremembe v naklonu nismo zaznali. To nakazuje na to, da ena molekula ZJ-176 lahko veže več kot tri molekule železa, k naraščanju absorpcijskega spektra pa verjetno prispeva tudi samo železo, saj je raztopina Fe^{3+} obarvana. Dušikovi atomi in hidroksilne skupine v molekuli ZJ-176 namreč predstavljajo zelo dobra vezavna mesta za železove ione, kar pa bi morali potrditi še z uporabo drugih analiznih tehnik (28, 29).

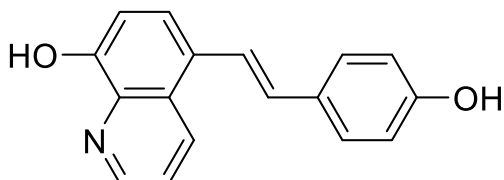


Slika 44: A) Spektrofotometrična UV-Vis titracija 20 μM NLS-6 v prisotnosti 0, 1, 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 82, 90, 98 in 106 μmol/L FeCl₃. B) Grafični prikaz nastanka kompleksa NLS-6-Fe³⁺ pri 345 nm.

Absorpcijski spekter spojine NLS-6 je ves čas naraščal po dodatku Fe³⁺ ionov, vendar pa se oblika spektra ni bistveno spreminjala, niti se ni pojavila izozbestična točka. Pri 345 nm smo izrisali titracijsko krivuljo s pomočjo programa Microsoft Excel 2016, in zaznali spremembo v naklonu. To bi lahko predstavljalo nasičenje spojine z železovimi ioni in nastanek kompleksa NLS-6-Fe³⁺ v razmerju 1 : 4. Lahko rečemo, da spojina NLS-6 veže vsaj 4 molekule železa, kar pa bi morali potrditi še z drugimi analiznimi tehnikami.

Velik izziv v prihodnosti tako predstavlja razvoj zdravilnih učinkovin, ki bi bile z vezavo kovinskih ionov sposobne upočasniti oziroma preprečiti razvoj AD in prezgodnjega staranja. S tovrstnimi študijami se ukvarjajo strokovnjaki po celem svetu, kot tudi Fei Mao s sodelavci (20). Le-ti so namreč prav tako preučevali spojine, ki so izražale sposobnost kelacije kovinskih ionov. Izvedli so askorbatni test z Cu²⁺ ioni in spremljali potek Fentonove reakcije preko porasta fluorescence, nadalje pa so izvedli test z resveratrolom na UV – Vis spektrometru in tako opazovali specifične premike absorbančnih spektrov in določili stehiometrijsko razmerje ligand – kovinski ion. Izsledki njihovih raziskav kažejo, da spojina (*E*)-5-(4-hidroksistiril)kinolin-8-ol (slika 45), ki je prav tako kot naši spojini fenolni derivat in izkazuje zelo dobro sposobnost vezave Cu²⁺ ionov. Prav tako so izvedli

toksikološka testiranja in dokazali, da spojina ne izkazuje akutne toksičnosti na miših in da lahko prehaja skozi krvno-možgansko pregrado, kar je za zdravljenje AD nujno potrebno (20). Zaključimo lahko, da so naši rezultati *in vitro* testiranj antioksidativnih lastnosti primerljivi in bi bilo izbrane spojine smiselno vključiti v nadaljnja testiranja.



Slika 45: Struktura molekule (*E*)-5-(4-hidroksistiril)kinolin-8-ol.

AD trenutno še ni ozdravljiva, saj kljub zdravljenju bolezen počasi napreduje. Kljub temu je zdravljenje z zdravili izredno pomembno, saj tako lajšamo posledice bolezni in upočasnimo njeno napredovanje. Težnja po razvoju novih zdravilnih učinkovin je tako še toliko večja. Najboljšo sposobnost vezave kovinskih ionov je izkazala spojina ZJ-176, ki je zanimiva kot fragment za vezavo kovinskih ionov. Z vgradnjo takšnih fragmentov v znane učinkovine bi lahko razširili paleto njihovih učinkov še na antioksidativno področje.

6. SKLEPI

Pri askorbatnem testu smo z merjenjem porasta fluorescence določili dobro sposobnost vezave železovih in bakrovih ionov pri spojini ZJ-176, NLS-1, -6 in -7. Najslabšo sposobnost vezave pa je izkazala spojina ZJ-167_1.

S ferozinskim testom smo potrdili, da spojini ZJ-176 in NLS-6 vežeta Fe^{3+} ione močnejše, kot pa ferozin. Znižanje absorbančnega spektra po dodatku obeh spojin smo delno pripisali oksidaciji Fe^{2+} do Fe^{3+} ionov, saj je bila kiveta v stiku s kisikom iz zraka med samo meritvijo. Priporočljivo bi bilo torej uporabiti še kakšno drugo metodo za potrditev sposobnosti vezave Fe^{3+} preiskovanih spojin.

Spojina ZJ-167_1 se je pri ferozinskem testu v obratnem vrstnem redu izkazala kot boljši kelator železovih ionov v primerjavi s ferozinom, saj kompleks ferozin- Fe^{2+} pri 562 nm ni nastal.

Pri ferozinskem testu je ob prisotnem ligandu nastalo bistveno manj ferozinskega kompleksa, kot pa v njegovi odsotnosti. Vendar pa poteka oksidacija Fe^{2+} ionov do Fe^{3+} zaradi prisotnosti zračnega kisika v vseh treh primerih najverjetneje z enako hitrostjo, saj je naklon vseh treh krivulj približno enak.

V kompleksu ZJ-176- Fe^{3+} nismo mogli določiti stehiometrijskega razmerja, saj nismo zaznali spremembe v naklonu, oblika spektra pa se ni bistveno spremenila. To nakazuje na to, da ena molekula ZJ-176 lahko šibko veže več kot tri molekule železa.

V kompleksu NLS-6- Fe^{3+} smo zaznali spremembo v naklonu, kar bi lahko predstavljalo nasičenje spojine z železovimi ioni v razmerju 1:4, vendar pa se oblika spektra ni bistveno spremenila. To pomeni, da ena molekula NLS-6 veže vsaj 4 molekule železa.

Spojine ZJ-176, NLS-1, -6 in -7 so izkazale dobre antioksidacijske sposobnosti, zato bi jih bilo smiselno vključiti v nadaljnja testiranja, kot možne funkcionalne skupine za kelacijo kovinskih ionov pri razvoju učinkovin za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni in prezgodnjega staranja.

7. LITERATURA

1. Osredkar J: Oksidativni stres. Zdravniški vestnik 2012; 81: 393-406.
2. Jian-Ming L, Peter H L, Quizhi Y, Changyi C: Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2010; 14(4): 840-860.
3. Halliwell B, Gutteridge J M C: Free radicals in biology and medicine, 4. izdaja, Oxford University Press, New York, 2007: 38-42.
4. De Laat J, Gallard H: Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe(III) in Homogeneous Aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling. Environ. Sci. Technol. 1999; 33: 2726-2732
5. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. Farmaceutski vestnik 2015; 66.
6. Halliwell B, Gutteridge J M C: Free radicals in biology and medicine, 4. izdaja, Oxford University Press, New York, 2007: 81-123, 160-177.
7. Reaktivne kisikove spojine in antioksidanti
<http://www.cenim.se/wellness/reaktivne-kisikove-spojine-in-antioksidanti/>(oktober 2017)
8. Zupančič M: Vrednotenje imid dioksimov z deoksiriboznim in ferozinskim testom, Diplomsko delo, Ljubljana, 2015.
9. Daniel C. Harris: Lehrbuch der Quantitativen Analyse, 1995.
10. De Freitas J, Wintz H, J Hyoun K, Poynton H, Fox T, Vulpe C: Yeast, a model organisms for iron and copper metabolism studies. Biometals 2003; 16: 185-197.
11. Complex Ions
<https://www.chem.fsu.edu/chemlab/chm1046course/complexions.html> (oktober 2017)
12. Kamarulzaman N, Kasim M F, Chayed N F: Elucidation of the highest valence band and lowest conduction shifts using XPS for ZnO and Zn_{0.99}Cu_{0.01}O band gap changes. Results in Physics 6 2016; 217-230
13. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5. izdaja, Washington, 2013.
14. The international Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision, Australian Modification (ICD-10-AM) – Tabular list of diseases, 6. izdaja, Avstralija, 2008.
15. Gendron M: Skrivnost, imenovana Alzheimer, 1. izdaja, Založba Chiara, Ljubljana, 2015: 91-95.

16. Jovanović Z: Oksidativni stres u patogenezi neurodegenerativnih oboljenja. Med. čas. 2011; 45(1): 16-23.
17. Lee H G, Zhu X, Castellani R J, Nunomura A, Perry G, Smith M A: Amyloid- β in Alzheimer Disease: The null versus the alternate hypothesis. J Pharmacol Exp Ther 2007; 321: 823-9.
18. Reven S, Peterlin Mašič L: Alzheimerjeva bolezen: nova spoznanja in učinkovine. Farmaceutski vestnik 2007; 58: 79-85.
19. Vivekanandan S, Brender JR, Lee SY, Ramamoorthy A: A partially folded structure of amyloid-beta in an aqueous environment. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011; 411 (2): 312–6.
20. Fei M, Jun Y, Jianheng L, Xian J, Hui M, Yang S, Ling H, Xingshu L: New multi-target-directed small molecules against Alzheimer`s disease: a combination of resveratrol and clioquinol. Org. Biomol. Chem. 2014; 12: 5936-5944.
21. Trembley M, Vollhardt J H: Use of pyrimidine derivatives for cosmetic purposes. Patent number WO 2006/133876 A1, 21 December 2006
22. Biology Dictionary
<https://biologydictionary.net/pyrimidine/> (november 2017)
23. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 7-28
24. Skoog D, Holler J, Nieman T: Principles of instrumental analysis, 5. izdaja, Harcourt Brace & Company, Orlando, Florida, 1998; 300-305
25. Synergy HT Operator`s Manual
http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Bio-Tek_Synergy_HT_User_Manual.pdf
(november 2017)
26. Varian Cary 50 UV-Vis Spectrophotometer
<https://www.agilent.com/cs/library/specifications/Public/si-0821.pdf> (november 2017)
27. Suckling K E, Suckling C J: Biological chemistry: the molecular approach to biological systems, 1. izdaja, Cambridge University Press, Cambridge, 1980; 187-210
28. Kachur A, Tuttle S, Biaglow J: Autoxidation of ferrous ion complexes: a method for the generation of hydroxyl radicals. Radiation Research 150. 1998; 475-482
29. Guo M, Perez C, Wei Y, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F, Chasteen N: Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry`s bio-effects. Dalton Trans. 2007; 4951-4961