

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA ŽMUC

MAGISTRSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA ŽMUC

**POSTAVITEV DEOKSIRIBOZNEGA TESTA NA MIKROTITRSKI PLOŠČICI IN  
VREDNOTENJE IZBRANIH ANTIOKSIDANTOV**

**TRANSFER OF DEOXYRIBOSE TEST TO MICROTITER PLATE AND  
EVALUATION OF SELECTED ANTIOXIDANTS**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME LABORATORY BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na Katedri za farmaceutsko kemijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

### **Zahvala**

Izrekam veliko zahvalo svojemu mentorjuizr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm., ki mi je omogočil izvajanje magistrske naloge. Zahvaljujem se za vse nasvete, usmeritve, spodbudne besede in novo pridobljena znanja.

Iz srca bi se rada zahvalila tudi staršema, starim staršem in svojemu partnerju, ki so bili vedno moja neomajna podpora, me spodbujali ter verjeli vame. Hvala vam.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom Postavitev deoksiriboznega testa na mikrotitrski ploščici in vrednotenje izbranih antioksidantov izdelala samostojno, pod mentorstvomizr. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Anja Žmuc

**Predsednik komisije:** prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

**Član komisije:**izr. prof. dr. Milan Skitek, spec. med. biokem., svetnik

**Mentor:**izr. prof. dr. Janez Mravljak

## KAZALO VSEBINE

1.0	REAKTIVNE ZVRSTI IN OKSIDATIVNI STRES .....	1
1.1	Reaktivne zvrsti .....	1
1.1.1.	Značilnosti radikalov .....	2
1.2	Oksidativni stres .....	3
2.0	NARAVNA ANTIOKSIDATIVNA OBRAMBA V NAŠEM TELESU .....	5
2.1	Deoksiribozni test .....	8
2.1.1	Deoksiribozni test – PROTOKOL 1 .....	8
2.1.2	Deoksiribozni test – PROTOKOL 2 .....	9
3.0	MATERIALI IN METODE .....	11
3.1	PRIPRAVA RAZTOPIN .....	14
3.1.1	Priprava raztopin za protokol 1 .....	14
3.1.1.1	Priprava fosfatnega pufra.....	14
3.1.1.2	Raztopina 2-deoksi-D-riboze s koncentracijo 33,6 mM.....	14
3.1.1.3	Raztopina EDTA s koncentracijo 1,2 mM .....	14
3.1.1.4	Raztopina FeCl <sub>3</sub> s koncentracijo 300 µM .....	15
3.1.1.5.	Raztopina NaOH s koncentracijo 50 mM .....	15
3.1.1.6	Raztopina vodikovega peroksida s koncentracijo 33,6 mM.....	15
3.1.1.7	Raztopina askorbinske kisline s koncentracijo 1,2 mM .....	15
3.1.1.8	Raztopina tiobarbituratne kisline .....	15
3.1.1.9	Raztopina trikloroocetna kisline.....	16
3.1.2	Priprava raztopin za protokol 2 .....	17
3.1.2.1.	Priprava fosfatnega pufra .....	17
3.1.2.2.	Raztopina 2-deoksi-D-riboze s koncentracijo 5 mM .....	17
3.1.2.3	Raztopina EDTA s koncentracijo 1,2 mM.....	17
3.1.2.4	Raztopina FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O s koncentracijo 10 mM.....	17
3.1.2.5	Raztopina NaOH s koncentracijo 50 mM .....	18

3.1.2.6	1% raztopina tiobarbituratne kisline .....	18
3.1.2.7	2,8% raztopina trikloroocetne kisline.....	18
3.2	PRIPRAVA VZORCEV .....	18
3.2.1	Priprava vzorcev za protokol 1 .....	18
3.2.2	Priprava vzorcev za protokol 2.....	19
3.2.2.1	Spektroskopska meritev absorbance vzorca z nanosom vzorcev v mikroepruvetah.....	20
3.2.2.2	Spektroskopska meritev absorbance vzorca z nanosom vzorcev na mikrotitrsko ploščico.....	21
3.3	PROTOKOL IZVEDBE DEOKSIRIBOZNEGA TESTA.....	21
3.3.1	Protokol 1 .....	21
3.3.1.1	Spektroskopska meritev absorbance vzorca z uporabo kivet .....	21
3.3.1.2	Spektroskopska meritev absorbance vzorca na mikrotitrski ploščici.....	23
3.3.2	Protokol 2 .....	23
3.3.2.1	Spektrofotometrična meritev absorbance vzorca z uporabo mikroepruvet in nanosom na mikrotitrsko ploščico.....	23
3.3.2.2	Spektroskopska meritev absorbance vzorca na mikrotitrski ploščici.....	24
4.0	REZULTATI.....	25
4.1	DEOSKIRIBOZNI TEST .....	25
4.2	REZULTATI – PROTOKOL 1 .....	27
4.2.1	Rezultati izvedbe spektrofotometričnega merjenja absorbance vzorcev v kivetah	27
4.2.1.1	Antioksidant ZJ-70 .....	28
4.2.1.2	Antioksidant ZJ-167_1 .....	29
4.2.1.3	Antioksidant ZJ-176 .....	30
4.2.2	Rezultati izvedbe spektrofotometričnega merjenja absorbance vzorcev na mikrotirski ploščici.....	32
4.2.2.1	Antioksidant ZJ-70 .....	32

4.2.2.2	Antioksidant ZJ-167_1 .....	33
4.2.2.3	Antioksidant ZJ-176 .....	34
4.3	REZULTATI – PROTOKOL 2 .....	35
4.3.1	Krivulja brez dodatka AO.....	36
4.3.2	Antioksidant ZJ-70 .....	38
4.3.3	Antioksidant ZJ-176 .....	38
4.3.4	Antioksidant ZJ-167_1 .....	39
4.3.5	EDTA .....	39
4.3.6	Primerjava rezultatov .....	40
4.4	ABSORBCIJSKI MAKSIMUM.....	41
4.4.1	Protokol 1 - rezultati merjenja absorpcijskega maksimuma.....	41
4.4.2	Protokol 2 - rezultati merjenja absorpcijskega maksimuma.....	43
5.0	RAZPRAVA.....	44
6.0	SKLEP .....	47
7.0	LITERATURA .....	48

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1.</b> Prikaz reakcij različnih radikalov do nastanka kovalentne vezi. ....	2
<b>Slika 2.</b> Primera dveh značilnih radikalskih reakcij. ....	3
<b>Slika 3.</b> Primer reakcije izomerizacije radikala. ....	3
<b>Slika 4.</b> Prikaz delovanja SOD, glutation peroksidaze in glutation reduktze. ....	8
<b>Slika 5.</b> Prikaz sklopa reakcij pri deoksiriboznem testu. ....	9
<b>Slika 6.</b> Inkubacija vzorcev v termostahirani kopeli pri temperaturi 37 °C. ....	26
<b>Slika 7.</b> Mikroepreveti slepih vzorcev z negativno ter s pozitivno reakcijo. ....	27
<b>Slika 8.</b> Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-70, izmerjeno v kivetih. ....	29
<b>Slika 9.</b> Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-167_1 izmerjene v kivetih. ....	30
<b>Slika 10.</b> Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-176 izmerjene v kivetih. ....	31
<b>Slika 11.</b> Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-70 na mikrotitrski ploščici. ....	33
<b>Slika 12.</b> Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-167_1 na mikrotitrski ploščici. ....	34
<b>Slika 13.</b> Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-176 na mikrotitrski ploščici. ....	35
<b>Slika 14.</b> Primer končnega izgleda mikrotitrsko ploščice po izvedbi direktnega nanosa na mikrotitrsko ploščico po protokolu 2. ....	36
<b>Slika 15.</b> Primerjava krivulj vrednosti absorbancev odvisnosti od koncentracije FeCl <sub>2</sub> brez dodatka AO – pripravljeno v mikroeprevetah (brez AO) in direktno nanešeno na mikrotitrsko ploščico (brez AO MP) po protokolu 2. ....	37
<b>Slika 16.</b> Odvisnost absorbance od različnih koncentracij FeCl <sub>2</sub> ob dodatku različnih spojin – reakcija je bila izvedena v mikroeprevetah. ....	40
<b>Slika 17.</b> Odvisnost absorbance od različnih koncentracij FeCl <sub>2</sub> ob dodatku različnih spojin - reakcija je bila izvedena na mikrotitrski ploščici. ....	41
<b>Slika 18.</b> Graf odvisnosti absorbance od valovne dolžine, izmerjena v SL+ na mikrotitrski ploščici (protokol 1). ....	42
<b>Slika 19.</b> Prikaz koordinat absorbicijskega maksimuma (protokol 1). ....	43
<b>Slika 20.</b> Prikaz koordinat absorbicijskega maksimuma (protokol 2). ....	43

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I.</b> Izbrani antioksidanti s pripadajočimi formulami, molskimi masami, kemijskimi strukturami ter imeni spojin.....	11
<b>Preglednica II.</b> Način priprave 120 mM fosfatnega pufra ter pripadajoče koncentracije..	14
<b>Preglednica III.</b> Priprava posameznih redčin vzorcev ZJ-176, ZJ-167_1 ter ZJ-70.....	19
<b>Preglednica IV.</b> Oznake posameznih redčin in pripadajoče koncentracije izbranih antioksidantov.....	19
<b>Preglednica V.</b> Zatehte posameznih antioksidantov s končno koncentracijo 1 mM.....	20
<b>Preglednica VI.</b> Priprava posameznih redčin raztopine železovih ionov - priprava v mikroeprevete (protokol 2).....	20
<b>Preglednica VII.</b> Priprava posameznih redčin raztopine železovih ionov za merjenje na mikrotitrski ploščici (protokol 2).....	21
<b>Preglednica VIII.</b> Koncentracije, povprečna vrednost A ter 1/A za antioksidant ZJ-70, izmerjeno v kivetah. ....	28
<b>Preglednica IX.</b> Koncentracije, povprečne vrednosti A ter 1/A za antioksidant ZJ-167_1, izmerjeno v kivetah. ....	29
<b>Preglednica X.</b> Koncentracije, povprečne vrednosti A ter 1/A za antioksidant ZJ-176, izmerjeno v kivetah. ....	30
<b>Preglednica XI.</b> Koncentracije, povprečne vrednosti A ter 1/A za antioksidant ZJ-70, izmerjeno na mikrotitrski ploščici. ....	32
<b>Preglednica XII.</b> Koncentracije, povprečne vrednosti A ter 1/A za antioksidant za antioksidant ZJ-167_1, izmerjeno na mikrotitrski ploščici. ....	33
<b>Preglednica XIII.</b> Koncentracije, povprečne vrednosti A ter 1/A za antioksidant za antioksidant ZJ-176, izmerjeno na mikrotitrski ploščici. ....	35
<b>Preglednica XIV.</b> Prikaz odvisnosti absorbance od valovne dolžine za različne koncentracije FeCl <sub>2</sub> brez dodatka antioksidanta (AO) izmerjene na mikrotitrski ploščici.	37
<b>Preglednica XV.</b> Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije FeCl <sub>2</sub> in ob dodatku antioksidanta ZJ-70 izmerjene na mikrotitrski ploščici.....	38
<b>Preglednica XVI.</b> Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije FeCl <sub>2</sub> in dodatku antioksidanta ZJ-176 izmerjene na mikrotitrski ploščici.....	38
<b>Preglednica XVII.</b> Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije FeCl <sub>2</sub> in dodatku antioksidanta ZJ-167_1 izmerjene na mikrotitrski ploščici.....	39



<b>Preglednica XVIII.</b> Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije $\text{FeCl}_2$ in ob dodatku EDTA izmerjene na mikrotitrski ploščici.....	39
--	----

## POVZETEK

V našem telesu ves čas potekajo številni fiziološki procesi, ki nam omogočajo življenje. Eden izmed njih je tudi celično dihanje, ki je med drugim povezano z nastankom reaktivnih zvrsti. Povzročajo ireverzibilne poškodbe in okvare glavnih molekul v našem organizmu. Antioksidanti pa nas varujejo pred oksidativnimi poškodbami reaktivnih zvrsti. Namen našega dela je bil poiskati hitrejšo in cenejšo izvedbo deoksiriboznega testa.

V magistrski nalogi smo se lotili postavitve deoksiriboznega testa na mikrotitrski ploščici iz do sedaj znane klasične izvedbe v mikropruvetah in ob uporabi UV-vis spektrofotometra. Za postavitev testa smo uporabili dva različna protokola. Pri protokolu 1 ali klasičnem testu smo spreminjali koncentracije antioksidanta. Pri protokolu 2 ali modificiranem testu pa smo spreminjali koncentracije  $\text{Fe}^{2+}$ . Njuni izvedbi smo med seboj tudi primerjali.

Princip deoksiriboznega testa temelji na nastanku kromofora, preko katerega omogoča spektrofotometrično vrednotenje zaščitne sposobnosti antioksidanta, da zaščiti deoksiribozo pred oksidativnimi poškodbami s hidrosilnimi radikali. Ko hidrosilni radikali poškodujejo 2-deoksiribozo, povzročijo njeno oksidacijo do malonadialdehida in drugih stranskih produktov. Spojina antioksidanta pa tekmuje z deoksiribozo za reakcijo s hidrosilnim radikalom ter s tem ščiti 2-deoksiribozo, da se ne oksidira. Nastali malonadialdehid reagira s tiobarbiturno kislino, pri čemer nastane oranžno-rožnat produkt, kateremu izmerimo absorbanco. Intenziteti obarvanosti produkta z UV/VIS spektroskopijo pri valovni dolžini 532 nm določimo številčno vrednost absorbance, ki je v premosorazmernem odnosu s količino nastalega malondialdehida. Detekcijo rezultatov na mikrotitrski ploščici smo opravili s čitalcem Synergy HT.

Pri vrednotenju zaščitne sposobnosti izbranih antioksidantov smo uporabili štiri različne spojine in ugotovili, da so razlike v njihovi zaščitni sposobnosti majhne. Postavitev deoksiriboznega testa na mikrotitrski ploščici je uspela pri protokolu s spremenljivo koncentracijo  $\text{Fe}^{2+}$  ionov. Prednosti nanosa vzorcev ter reagentov direktno na mikrotitrsko ploščico so predvsem hitrost, manjši volumni reagentov in vzorcev ter manjši vpliv zunanjih dejavnikov, s tem pa tudi nižja cena testa.

**Ključne besede:** deoksiribozni test, oksidativni stres, hidrosilni radikal, Fentonova reakcija, antioksidativna obramba, prenos metode.

## **ABSTRACT**

Many physiological processes in our body keep us alive. One of them is cellular breathing which is associated with the formation of reactive species. They cause irreversible damage and breakdowns of the main molecules in our body. Antioxidants protect us against oxidative damages of reactive species. The purpose of our work was to find a faster and cheaper performance of the deoxyribose test.

In the master's thesis, we did the transfer of a deoxyribose test on a microtiter plate from the so far known classical performance in tubes and using UV-vis spectrophotometer. Two different protocols were used. In protocol 1 or the classic test, the antioxidant concentrations were changed. In protocol 2 or the modified test, we changed the Fe<sup>2+</sup> concentrations. We compared both protocols.

The principle of the deoxyribose test is based on the formation of a chromophore, through which it enables a spectrophotometric evaluation of the antioxidant's protective ability to protect the deoxyribose from oxidative damage to hydroxyl radicals. When hydroxyl radicals damage 2-deoxyribose, this causes its oxidation to malondialdehyde and other by-products. The antioxidant compound then competes with deoxyribose for reaction with the hydroxyl radical, thereby protecting the 2-deoxyribose in order not to oxidize. The malondialdehyde reacts with thiobarbiturate acid, thereby forming an orange-pink product to which the absorbance is measured. The numerical value of the absorbance determines the coloring intensities of the UV-vis spectroscopy product at a wavelength of 532 nm, which is in a proportional relationship with the amount of malondialdehyde produced. Result detection on the microtiter plate was performed with the Synergy HT reader.

In evaluating the protective ability of selected antioxidants, four different compounds were used, and we found that the differences in their protective ability were small.

The transfer of the deoxyribose test on the microtiter plate was successful in a protocol with a variable concentration of Fe<sup>2+</sup> ions. The advantages of applying samples and reagents directly to the microtiter plate are, in particular, speed, smaller volumes of reagents and samples, and lesser influence of external factors.

**Keywords:** deoxyribose test, oxidative stress, hydroxyl radical, Fenton reaction, antioxidant defense, method transfer.

## SEZNAM OKRAJŠAV

2-DR – deoksiriboza (*2-deoxy-d-ribose*)

AO – antioksidant

CAT - katalaza (*catalase*)

EDTA - etilendiamintetraoetna kislina

GPx - glutation peroksidaza (*glutathione peroxidase*)

GSH – glutation

MDA – malondialdehid (*malondialdehyde*)

MW – molekulska masa (*molecular weight*)

PBS – fosfatni pufer (*phosphate-buffered saline*)

RNS - reaktivne dušikove zvrsti (*reactive nitrogen species*)

ROS – reaktivne kisikove zvrsti (*reactive oxygen species*)

SOD – superoksid dismutaza

TBA – tiobarbituratna kislina (*thiobarbituric acid*)

TCA – trikloroocetna kislina (*trichloroacetic acid*)

## **1.0 REAKTIVNE ZVRSTI IN OKSIDATIVNI STRES**

### **1.1 REAKTIVNE ZVRSTI**

V našem telesu ves čas potekajo številni fiziološki procesi, ki nam omogočajo življenje. Eden izmed njih je tudi celično dihanje. Celično dihanje je med drugim povezano z nastankom reaktivnih zvrsti, ki nastajajo nepretrgoma, kot del normalnega metabolizma organizma. Reaktivne zvrsti pa lahko nastajajo tudi pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov, zaradi česar se poruši homeostaza v našem telesu in to privede do oksidativnega stresa. Omenjeni vplivi iz okolja so lahko UV sevanje, pesticidi, vdihavanje onesnaženega zraka, ali pa notranji viri, kot so stresno življenje in kronična vnetja ter še mnogo drugih. Glavni skupini reaktivnih zvrsti so reaktivne kisikove (v nadaljevanju ROS) in reaktivne dušikove zvrsti (RNS) (1,2,3).

Če smo zgoraj našli različne zunanje dejavnike nastanka reaktivnih zvrsti, lahko kisikove reaktivne zvrsti nastajajo tudi endogeno, torej znotraj samih celic, tekom procesov, kot sta na primer:

#### **a) Oksidativna fosforilacija**

Natančneje se to lahko dogaja na nivoju mitohondrijev. Omenjena fosforilacija je bistvenega pomena za nastanek celične energije in sproščanje ROS. Glavni namen oksidativne fosforilacije je tvorba adenozin trifosfata (v nadaljevanju ATP). Za nastanek ATP je potreben prenos elektronov v notranji mitohondrijski membrani, ki so podvrženi stalnim oksidacijsko redukcijskim reakcijam. S tem elektroni pridobivajo vedno večji potencial. Končna molekula transportne verige elektronov pa je ravno molekula kisika, ki se v normalnih pogojih nato reducira do vode. V nepopolnih pogojih pa se lahko reducira do superoksidnega radikala (1, 4).

#### **b) NADPH oksidaza**

NADPH oksidaza je encim, ki se v telesnih celicah nahaja v peroksisomih, mitohondriju, tudi v celični membrani in endoplazmatskem retikulumu. Slednji encim ima v celici vlogo prenašalca elektronov z molekule NADPH na molekulo kisika. To ima za posledico nastanek ROS, in sicer nastane superoksidni anion (1, 5).

### 1.1.1. Značilnosti radikalov

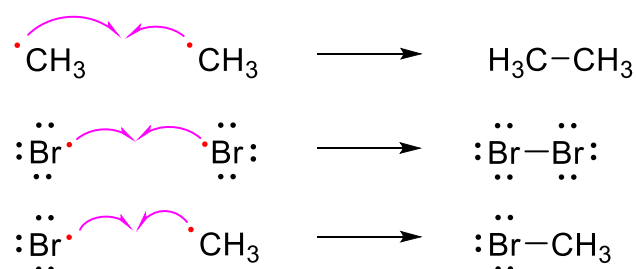
Skupna značilnost vseh radikalov je njihova sposobnost hitre reakcije s širokim naborem različnih molekul, kar botruje k dejstvu, da v našem telesu niso dolgo obstojni. Prav tako jim je skupna prisotnost nesparjenega elektrona v njihovi kemijski strukturi (1, 6).

Značilne reakcije, pri katerih sodelujejo radikali (1):

#### a) nastanek kovalentne vezi

Radikal reagira z drugim radikalom do nastanka kovalentne vezi ter nove spojine. Novo nastala spojina tako izgubi značilnosti radikalskih spojin ter postane stabilnejša, njen razpolovni čas pa se podaljša (1).

Slika 1 prikazuje reakcije različnih radikalov z enakim ali različnim radikalom. V vseh treh primerih nastane nova spojina, ki vsebuje novo kovalentno vez.



**Slika 1.** Prikaz reakcij različnih radikalov do nastanka kovalentne vezi.

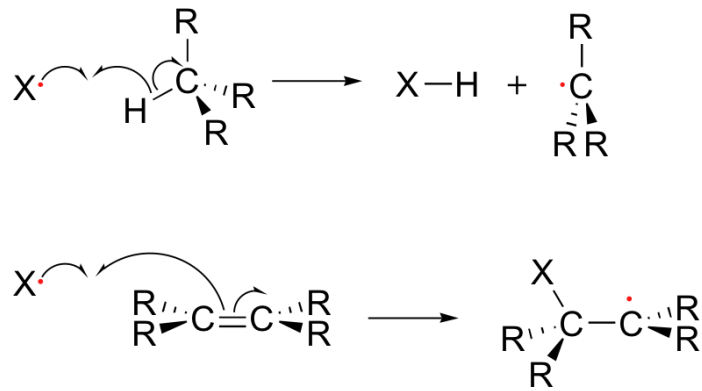
#### b) adicija radikala na dvojno vez

Tarča radikalov so tudi dvojne vezi med dvema ogljikovima atomoma. Na mestu interakcije tako nastane enojna vez in eden od dveh ogljikovih atomov pridobi radikalsko naravo (1).

#### c) odvzem vodikovega atoma

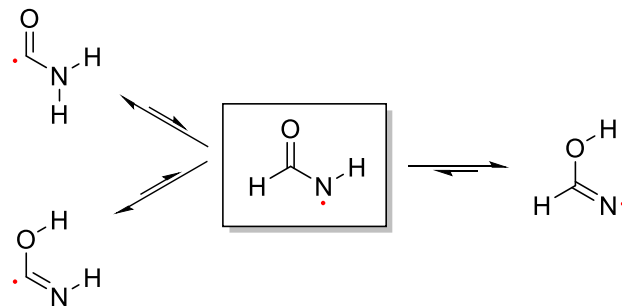
Poteče reakcija, v kateri radikal reagira z drugo spojino, ji odvzame vodikov atom in s tem izgubi radikalske značilnosti, medtem ko jih druga spojina pridobi (1).

Na sliki 2 sta za lažjo predstavbo shematsko prikazana dva zgoraj opisana tipa radikalskih reakcij. Prva reakcija je tako primer, ko radikal drugi spojini odvzame vodikov atom in s tem izgubi radikalske lastnosti. Druga reakcija pa je primer, ko se radikal adira na dvojno vez iz dvojne vezi nastane enojna vez.



**Slika 2.** *Primeri dveh značilnih radikalskih reakcij.*

Radikal je splošno gledano tako zelo reaktivna molekula, da lahko poteče reakcija tudi znotraj same radikalske molekule. V tako imenovani reakciji izomerizacije nesparjeni elektron prehaja znotraj molekule radikala do nastanka stabilnejšega izomera, kar je slikovno prikazovano na sliki 3 (1).



**Slika 3.** *Primer reakcije izomerizacije radikala.*

## 1.2 OKSIDATIVNI STRES

Besedno zvezo oksidativni stres je leta 1985 uvedel H. Sies, in sicer jo je opredelil kot motnjo v ravnovesju med prooksidanti in antioksidanti v korist prvih, kar vodi v možne poškodbe (*Sies H: Oxidative stress: introductory remarks. Academic Press 1985; 1–8.*).

Poznamo dva med seboj neodvisna vzroka, ki botrujeta k nastanku oksidativnega stresa v našem telesu. Bodisi gre za povečano tvorbo reaktivnih zvrsti, bodisi pride do sprememb v antioksidativni obrambi, ki je v tem primeru zmanjšana. Zaradi tega je moteno ravnovesje med nastankom radikalov in antioksidativnim odgovorom nanje. Slednje ima lahko za posledico oksidativne poškodbe različnih tkiv in organov. Moteni so tudi ostali fiziološki

procesu, saj lahko oksidativni stres direktno vpliva na vse glavne molekule v našem organizmu (2,7).

Splošno gledano se toksičnost vseh radikalov ne ustavi samo na nivoju celice. Povzročajo ireverzibilne poškodbe in okvare glavnih molekul v našem organizmu, torej vse od lipidov do proteinov, delujejo celo na nivoju DNA. Rezultat tega so številna kronična obolenja srca, žilja, možganov, sistemske in imunske motnje - miokardni infarkt, ateroskleroza, možganska kap, revmatoidni artritis, sladkorna bolezen, različna vnetja ter šoki (2, 7, 8).

Oksidativni stres bistveno vpliva na pojav lipidne peroksidacije in s tem prisotnost spremenjenih značilnosti lipidne membrane. Predvsem sta na udaru fluidnost membrane in z njenimi spremembami povezana inaktivacija različnih encimov ali receptorjev na njeni površini. Slednje lahko spremeni celično signalizacijo in posledično to vodi v njen propad (1, 7).

Sposobnost povzročitve oksidativnega stresa v našem organizmu imajo reaktivne kisikove in reaktivne dušikove zvrsti (1).

### **Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti**

Proste kisika v naši plazmi je zanemarljivo malo, skoraj v celoti prehaja po našem telesu vezan na hemoglobin ali mioglobin. Reaktivne kisikove zvrsti imajo širok spekter predstavnikov, v grobem pa jih lahko razdelimo v dve večji skupini, na molekule z neparnimi elektroni ter spojine s parnimi elektroni. Prva skupina ima tako značilne karakteristike radikalov, medtem ko molekule druge skupine teh lastnosti nimajo. Reakcije nastanka in kemijske formule najpomembnejših predstavnikov ROS so predstavljene v nadaljevanju (2, 9).

#### a) **Superoksidni anion** s kemijsko formulo $O_2^{\bullet-}$

Superoksidni anion nastane iz molekule kisika ob prisotnosti molekule nikotinamidadeninukleotidfosfat (v nadaljevanju NADPH). Vendar pa mora biti predhodno izpolnjen pogoj, da je v reakciji prisoten še encim NADPH oksidaza, ki je katalizator omenjene kemijske reakcije. V nasprotnem primeru reakcija spontano ne bi potekla. NADPH deluje v reakciji kot donor elektronov. Tekom reakcije se NADPH oksidira v  $NADP^+$ , sprostita se proton ter superoksidni anion (2, 10, 11).



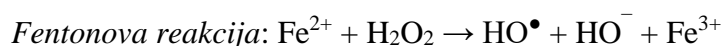
b) **Vodikov peroksid** s kemijsko formulo  $\text{H}_2\text{O}_2$

Poznamo različne poti nastanka vodikovega peroksida v naših celicah. Prvi način nastanka  $\text{H}_2\text{O}_2$  je, če ob prisotnosti dveh protonov v reakcijo vstopita dve molekuli superoksidnega aniona, pri tem pa se sprostijo molekula kisika. Dodati je treba, da omenjeni način za celico nima bistvenega pomena, saj poteka prepočasi, da bi bil učinkovit za odstranjevanje superoksidnega aniona. Možen način nastanka  $\text{H}_2\text{O}_2$  je tudi posledica delovanja ksantin oksidaze, ki ksantin pretvori v sečno kislino in vodikov peroksid (11, 12).

Kot glavno pot nastanka  $\text{H}_2\text{O}_2$  v našem telesu pa lahko opredelimo reakcijo dismutacije superoksidnega radikala do tripletnega kisika in  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Omenjeno kemijsko reakcijo katalizira encim superoksid dismutaza (v nadaljevanju SOD) (1, 11).

c) **Hidroksilni radikal** s kemijsko formulo  $\bullet\text{OH}$

Hidroksilni radikal je najreaktivnejši izmed vse predstavnikov ROS. Nastaja predvsem v prisotnosti železovih ali bakrovih ionov v tako imenovani Fentonovi reakciji. V slednji reakciji poteče oksidacija železovih  $\text{Fe}^{2+}$  ionov v  $\text{Fe}^{3+}$  ter redukcija peroksida. Vodikov peroksid se tako reducira na anion in radikal, tako imenovana hidroksilni anion in hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ). Zaradi svoje reaktivnosti lahko  $\bullet\text{OH}$  v zvišanih koncentracijah v našem telesu povzroči različne anomalije in celične spremembe. Znano je, da  $\bullet\text{OH}$  sodeluje pri pojavu lipidne peroksidacije, pospešuje oksidacijo proteinov, celo pri nekaterih črevesnih obolenjih in nastanku drugih bolezenskih stanj. Primer tega sta ulcerozni gastritis ter revmatoidna obolenja (1, 2, 7, 13, 14).



## 2.0 NARAVNA ANTIOKSIDATIVNA OBRAMBA V NAŠEM TELESU

Naše telo je samo skozi leta in leta razvoja vzpostavilo različne mehanizme, kako se čim učinkoviteje boriti proti učinkom in posledicam oksidativnega stresa (1).

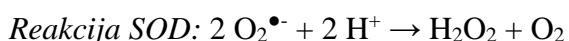
Sistem reakcij naravne antioksidativne obrambe v našem telesu katalizirajo predvsem encimi SOD, katalaze, peroksidaze in glutation reduktaze. Omenjeni encimi so razporejeni po celici in delujejo v različnih delih celice (1, 11).

Glavni encimi, ki so povezani z naravno obrambo pred oksidativnim stresom, so:

- **Superoksid dismutaza**

Naloga encima superoksid dismutaze (SOD) je čim hitrejša pretvorba superoksidnega aniona v vodikov peroksid. Zaradi svojih kemijskih lastnosti in difuznega zakona lahko vodikov peroksid hitro preide preko celične membrane in tako le kratek čas ostane v celici. Glavna prednost omenjene hitre reakcija dismutacije do nastanka vodikovega peroksida in kisika je manjša verjetnost, da bi bila celica izpostavljena negativnim ter škodljivim učinkom superoksidnega aniona. Prav tako je s tem zmanjšana možnost nastanka oksidativnega stresa (1, 11, 14).

Poznamo 3 izoencimske oblike SOD, in sicer SOD 1, SOD 2 ter SOD 3, ki se med seboj razlikujejo po mestu delovanja (v citoplazmi, mitohondriju ali v zunajceličnem prostoru). V primeru povečanih koncentracij hidroksilnega radikala postane delovanje SOD nezadostno, kar botruje k pojavu oksidativnega stresa. Osebe z mutacijo gena za SOD trpijo za različnimi kronični boleznimi. Bolezen, ki je povezana z mutacijo gena za SOD, je amiotrofična lateralna skleroza (1, 15, 16).



- **Katalaza**

Katalaza je encim, ki ima v središču svoje kemijske strukture hemsko vezano železo, encim pa sestavljajo štiri podenote s katalitično aktivnostjo. Primarna naloga katalaze je pretvorba vodikovega peroksida v molekulo vode ter molekulo kisika. To sta dve molekuli, ki našemu organizmu ne predstavljata nevarnosti. Treba je dodati, da je katalaze v eritrocitih bistveno več kot na primer v mitohondrijih. Vendar pa bi bilo delovanje katalaze brez dodatne prisotnosti drugih encimov, predvsem peroksidaz, v določenih organih premalo učinkovito (1, 2, 11, 15).



- **Glutation, glutacion peroksidaze in glutacion reduktaze**

Peroksidaze so encimi, ki imajo podoben način odstranjevanja vodikovega peroksida iz celic kot katalaze. Eden izmed pomembnejših predstavnikov peroksidaz je glutacion peroksidaza, ki povzroči pretvorbo vodikovega peroksida do vode. V našem telesu najdemo 8 variacij glutacion peroksidaze, ki se med seboj razlikujejo po mestu delovanja. Glutacion reduktaze naj bi imele večjo afiniteto do  $\text{H}_2\text{O}_2$  kot katalaze ter naj bi bile zato bistveno bolj učinkovite (1,11, 15).

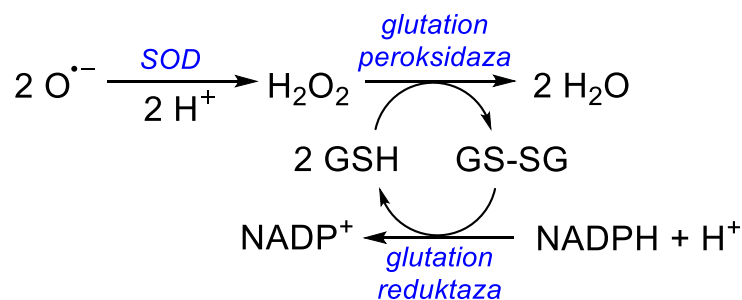
*Reakcija, ki jo katalizira glutacion peroksidaza:  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$*

Za sam potek kemijske reakcije glutacion peroksidaza potrebuje kofaktor – glutacion. Glutacion je v osnovi sestavljen iz treh aminokislin, torej gre za peptid, ena izmed treh aminokislin pa je cistein. Cistein je strukturno gledano aminokislina, katere stranska veriga vsebuje tiolno skupino, zaradi katere glutacion pridobi lastnosti reducenta. Čeprav glutacion ni encim, lahko neposredno reagira z ROS do nastanka tioilnega radikala. Slednje dejstvo ga uvršča med najpomembnejše antioksidante v našem telesu. Glutacion reduktaza za svoj substrat uporablja glutacion disulfid, njena glavna naloga pa je reduciranje molekule glutacion disulfida (v nadaljevanju GSSG) v glutacion sulfhidril (v nadaljevanju GSH). Iz ene molekule GSSG nastaneta dve molekuli GSH (1, 2, 15).

*Reakcija, ki jo katalizira glutacion reduktaza:  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$*

Energija v obliki NADPH, ki se porablja tekom reakcije z glutacion reduktazo, v celici nastaja v različnih fizioloških procesih. V primeru pomanjkanja NADPH ni zmožna obnavljati glutacion, s čimer se v celici zmanjša antioksidativni odziv in pride do pojava oksidativnega stresa (1, 2, 15).

Poenostavljen prikaz sistema delovanja SOD, glutacion peroksidaze in glutacion reduktaze je prikazan na spodnji sliki 4.



**Slika 4.** Prikaz delovanja SOD, glutacion peroksidaze in glutacion reduktaze.

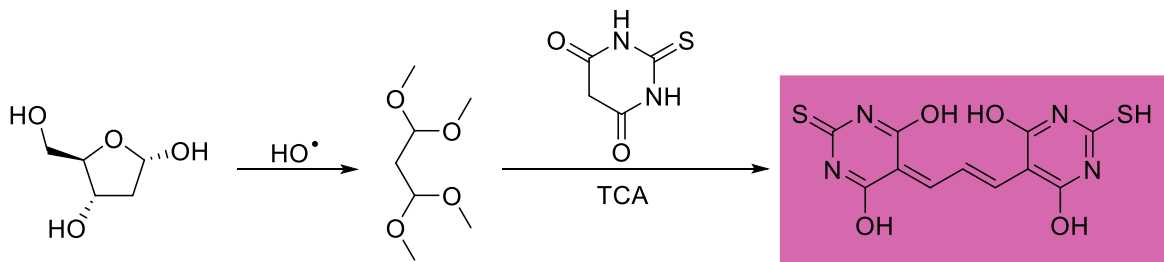
Ostale spojine, ki naravno nastajajo v našem telesu in dopolnjujejo antioksidativno obrambo, so tudi hormon melatonin, ki ščiti DNA pred negativnimi vplivi oksidativnega stresa, piruvat in ketoglutarat, ki se v prisotnosti vodikovega peroksida dekarboksilirata in s tem zaščitita živčne celice pred oksidativnimi poškodbami (1, 2).

## 2.1 DEOKSIRIBOZNI TEST

### 2.1.1 Deoksiribozni test – PROTOKOL 1

Deoksiribozni test je eden zanesljivejših in enostavnejših metod spremljanja reakcij hidroksilnih radikalov. Predvsem se uporablja v povezavi ugotavljanja, kolikšna je zaščitna sposobnost določenega izbranega antioksidanta. Zaščitna sposobnost se kaže v nezmožnosti razgradnje deoksiriboze s strani hidroksilnih radikalov (17).

Princip "klasične izvedbe" deoksiriboznega testa (protokola 1) tvori zaporedje reakcij, ki da na koncu rožnato oranžno obarvan produkt, ki ga merimo z UV/VIS spektroskopijo. Temelji na nastanku hidroksilnih radikalov, kot posledica reakcije vodikovega peroksida s kompleksom [železovi ioni ( $\text{Fe}^{2+}$ ) - EDTA]. Za redukcijo železovih ionov  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$  poskrbi askorbinska kislina. Vodikov peroksid se tako reducira na do hidroksilnega aniona in hidroksilnega radikala. Slednji kompetitivno napade 2-deoksiribožo in poteče reakcija, ki je navedena na sliki 5. Če je prisoten antioksidant, ta tekmuje za reakcijo s hidroksilnim radikalom z deoksiribožo in jo tako zaščiti. S tem prepreči njeno oksidativno razgradnjo s hidroksilnim radikalom (17, 18).



**Slika 5.** Prikaz sklopa reakcij pri deoksiriboznem testu.

Nastali hidroksilni radikali namreč poškodujejo 2-deoksiribozo, s tem da povzročijo njeno oksidacijo do malonadialdehida (v nadaljevanju MDA) in drugih stranskih produktov. Spojina antioksidanta namreč tekmuje z deoksiribozo za reakcijo s hidroksilnim radikalom ter s tem ščiti 2-deoksiribozo, da se ne oksidira naprej (17,18).

Omenjeni MDA je osnova za reakcijo s tiobarbituratno kislino (v nadaljevanju TBA), ki po dodatku trikloroocetne kisline (v nadaljevanju TCA), omogoči nastanek obarvanega produkta, kateremu izmerimo absorbanco. Intenziteti obarvanosti produkta z UV/VIS spektroskopijo določimo številčno vrednost absorbance. Vrednost absorbance je v premosorazmernem odnosu s količino nastalega MDA (17, 19).

Večja, kot je zaščitna sposobnost spojine antioksidanta, da zaščiti 2-deoksiribozo oziroma manjša, kot je nadaljnja oksidacija deoksiriboze, manjša bo količina nastalega MDA ter s tem izmerjena nižja absorbanca, saj bo na razpolago manj produktov, ki bi lahko reagirali s TBA. Vrednost izmerjene absorbance je odvisna od intenzitete barve vzorca. Večja, kot je absorbanca, intenzivnejše je vzorec obarvan in obratno (17, 19).

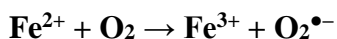
### 2.1.2 Deoksiribozni test – PROTOKOL 2

Princip "modificirane izvedbe" deoksiriboznega testa (protokol 2) se razlikuje od klasične izvedbe (protokol 1): je enostavnejši in hitrejši.

Namen te izvedbe deoksiriboznega testa je odkrivanje močne vezave železovih ionov, ob čemer je preprečen vstop  $\text{Fe}^{2+}$  v Fentonovo reakcijo. Pri tem se spremlja obseg poškodbe deoksiriboze oziroma njena oksidacija do malondialdehida samo v odvisnosti od različnih koncentracij  $\text{Fe}^{2+}$  pri zagotovaljenem pogoju, da se koncentracija antioksidatine spojine ne spreminja. Koncentracije izbranih antioksidantov v končni reakcijski zmesi pred dodatkom

TBA in TCA so 40,1  $\mu\text{M}$ . Ker je koncentracija antioksidativne spojine konstantna, lahko vrednotimo, kateri AO ima boljše zaščitno sposobnost kot drugi pri različnih koncentracijah železovih ionov (20).

Protokol 2 temelji na predpostavki, da se  $\text{Fe}^{2+}$  v prisotnosti kisika avtooksidira do  $\text{Fe}^{3+}$ , pri tem pa nastane še superoskid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (20):



Več superosidov ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) v prisotnosti vodika reagira med seboj, pri čemer tako nastaja vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in situ (20):



V zadnji stopnji Fentonove reakcije in situ nastali  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagira z še nereagiranim  $\text{Fe}^{2+}$  do nastanka hidoksilnega radikala ( $\bullet\text{OH}$ ). Pri tem se  $\text{Fe}^{2+}$  oksidira v  $\text{Fe}^{3+}$  (20):



Tako torej spremljamo vpliv različnih koncentracij železovih ionov ( $\text{FeCl}_2$ ) v oksidacijskem stanju (II) (20).

MDA je tudi pri tem protokolu osnova za reakcijo s TBA, ki po dodatku TCA omogoči nastanek obarvanega produkta, kateremu izmerimo absorbanco. Intenziteti obarvanosti produkta z UV/VIS spektroskopijo določimo številčno vrednost absorbance. Vrednost absorbance je v premosorazmernem odnosu s količino nastalega MDA (17).

### 3.0 MATERIALI IN METODE

Za izvedbo eksperimentalnega dela magistrske naloge smo uporabili različne reagente in raztopine, aparature ter programsko opremo. Po sklopih so navedeni v nadaljevanju.

#### Raztopine in reagenti

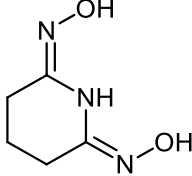
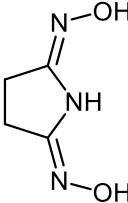
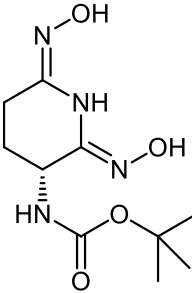
- Monokalijev fosfat, MW: 136,09 g/mol, Sigma-Aldrich
- Dikalijev fosfat, MW: 174,18 g/mol, Sigma-Aldrich
- Natrijev dihidrogen fosfat tetrahidrat, MW: 192,04 g/mol, Sigma-Aldrich
- Natrijev hidrogen fosfat, MW: 141,96 g/mol, Sigma-Aldrich
- Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), MW: 372,24 g/mol, Acros Organics
- 2-deoksi-D-riboza, MW: 134,13 g/mol, Sigma-Aldrich
- Askorbinska kislina, MW: 176,12 g/mol, TCI
- 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vodikov peroksid, MW: 34,01 g/mol, Merck KgaA, Nemčija
- Železov(II) klorid tetrahidrat (FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, M = 198,81 g/mol), Sigma-Aldrich, ZDA
- NaOH, natrijev hidroksid, MW: 39,997 g/mol, Merck KgaA, Nemčija
- Tiobarbiturna kislina (TBA), MW: 144,15 g/mol, Acros Organics
- Trikloroocetna kislina (TCA), MW: 163,40 g/mol, Kemika

Za samo izvedbo deoksiriboznega testa smo dodatno potrebovali še Milli-Q deionizirano vodo, ki smo jo v ta namen pripravili na Fakulteti za farmacijo, in sicer z aparaturo Milli-Q Advantage A10 proizvajalca Millipore.

Spojine, ki so bile osnova spremljanja antioksidativnega delovanja, so znani antioksidanti in so predstavljeni v spodaj navedeni preglednici (*Preglednica 1*). Poleg oznake spojine so dodane še kemijska bruto formula, molska masa in kemijska struktura. Vse tri spojine so bile sintetizirane Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo.

**Preglednica I.** *Izbrani antioksidanti s pripadajočimi formulami, molskimi masami, kemijskimi strukturami ter imeni spojin.*

Številka spojine	Oznaka	Bruto formula	Molekulska masa (g/mol)	Kemijska struktura in ime spojine
------------------	--------	---------------	-------------------------	-----------------------------------

1	ZJ-176	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	143,14	
				2,6-bis(hidroksiimino)piperidin
2	ZJ-167_1	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	129,12	
				2,5-bis(hidroksiimino)pirolidin
3	ZJ-70	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	258,27	
				<i>terc</i> -butil (( <i>R</i> )-2,6-bis(hidroksiimino)piperidin-3-il)karbamat

### Laboratorijska oprema in pribor

- Analitska tehtnica: Mettler Toledo AG245
- Precizna tehtnica: Mettler Toledo PB403
- Polavtomatske pipete: Brand (1 – 10 mL), Brand (0,5 – 5 mL), Thermo scientific (100 – 1000 µL), Thermo scientific (1 – 10 µL)
- Magnetno mešalo: IKA
- Vodna kopel Büchi Heating Bath B-490, Büchi
- Mikrotitrna plošča s 96 vdolbinami: Techno Plastic Products
- Steklovina različnih volumnov in oblik: čaše, bučke, epruvete, merilni valji, penicilinke



- Plastični pribor: nastavki za pipete, plastične žličke, kivete 1,5 mL, proizvajalca semimikro BRAND Tranferpette®
- Plastične mikropruvete: Eppendorf 1,5 mL
- Kovinske spatule in žlice

### **Opis aparatur**

Meritve smo napravili z uporabo dveh aparatov, in sicer s Cary 50 Conc spektrofotometrom za merjenje na klasičen način v kivetah ter s čitalcem Synergy HT za merjenje na mikrotitrskih ploščicah.

Izbrana metoda, s katero smo vzorcem po končanem sklopu reakcij izmerili številčno vrednost, je bila UV/VIS spektroskopija.

Pri Cary 50 Conc spektrofotometru smo vzorce nanesti v plastične kivete. Pred nanosom vzorcev smo preverili, če so stene kivet čiste, saj bi v nasprotnem primeru motilo presevanje žarka in bi tako dobili napačne rezultate. Izvor svetlobe v omenjenem spektrofotometru je ksenonska žarnica. Spektrofotometer smo uporabili za merjenje absorbanc pri točno določeni valovni dolžini, ki je v našem primeru znašala 532 nm. Ustreznost izbrane valovne dolžine smo preverili z merjenjem spektra pozitivne kontrole (v nadaljevanju SL+). Delovanje spektrofotometra smo kontrolirali preko računalniškega programa WinUV (21).

Čitalec Synergy HT smo uporabili za merjenje absorbance vzorcev, ki smo jih nanesti v vdolbinice na mikrotitrskih ploščicah. Ksenonski žarnici kot izvoru svetlobe je dodan še monokromator, s pomočjo katerega vzorce preseva le svetloba izbrane valovne dolžine. Pri Synergy HT smo njegovo delovanje nadzirali preko računalniškega programa Gen5™. Rezultate meritev smo direktno prenesli v program Microsoft Excel 2010, kar nam je omogočilo hitrejšo obdelavo podatkov (22).

### **Programska oprema za obdelavo podatkov**

Pridobljene rezultate posameznih meritev smo prenesli v program MS Excel 2010. S pomočjo omenjenega programa smo meritve pregledno uredili v tabelarno obliko, naredili vse potrebne izračune in preračune ter napravili izris grafov.

Magistrski nalogi smo za boljše razumevanje dodali tudi prikaze poteka kemijskih reakcij, kemijske strukture uporabljenih spojin ter celične strukture, kjer omenjene reakcije potekajo. Za to smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 14.0.

### 3.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

#### 3.1.1 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA PROTOKOL 1

##### 3.1.1.1 Priprava fosfatnega pufra

Osnovna raztopina je bil fosfatni pufer (PBS), ki smo ga z dodajanjem 1 M raztopine NaOH umerili na pH 7,4. Pripravili smo PBS s koncentracijo 120 mM.

1 L 120 mM fosfatnega pufra smo pripravili, kot je razvidno iz spodnje preglednice (*Preglednica 2.*). Kot topilo za raztapljanje zatehtanih soli smo uporabili MilliQ vodo.

**Preglednica II.** Način priprave 120 mM fosfatnega pufra ter pripadajoče koncentracije.

Molekulska oznaka soli	Molska masa (g/mol)	Koncentracija (mmol/L)	Koncentracija (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,09	73,48	10,00
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	141,96	73,47	10,43

##### 3.1.1.2 Raztopina 2-deoksi-D-riboze s koncentracijo 33,6 mM

Za pripravo 33,6 mM raztopine smo v merilno bučko zatehtali 450,7 mg 2-deoksi-D-riboze, raztopili v bidestilirani vodi in dopolnili do končnega volumna 100,0 mL. Omenjeno raztopino smo pripravili vnaprej. Shranjevali smo jo v hladilniku. Pred samo uporabo smo jo vzeli iz hladilnika in počakali, da se je segrela na sobno temperaturo.

##### 3.1.1.3 Raztopina EDTA s koncentracijo 1,2 mM

Zatehtali smo 3,51 mg etilendiamintetraoetne kisline (v nadaljevanju EDTA) v penicilinko in jo raztopili v 10,0 mL deionizirane vode Milli-Q.

EDTA že na začetku pripravimo v večji količini in vnaprej. To lahko storimo, ker je raztopina EDTA stabilna.

#### **3.1.1.4 Raztopina FeCl<sub>3</sub> s koncentracijo 300 μM**

Za pripravo delovne raztopine železovih ionov smo najprej pripravili osnovno raztopino. Natehtali smo 1,622 g FeCl<sub>3</sub>, v merilno bučko, nato smo dodali 1 mL 1 M HCl, s katero smo raztopili FeCl<sub>3</sub>. Le to smo v bučki dopolnili do 10,0 mL z uporabo deionizirane vode Milli-Q. Raztopina je stabilna, zato smo jo pripravili vnaprej in nam je bila osnova za delovno raztopino, ki je morala biti pripravljena vsakič sveža.

Za vsako novo merjenje smo odpipetirali 30 μL osnovne raztopine, torej 0,1 M FeCl<sub>3</sub> / 0,1 M HCl, in jo z deionizirano vodo Milli-Q razredčili do skupnih 10,0 mL.

#### **3.1.1.5. Raztopina NaOH s koncentracijo 50 mM**

Najprej smo pripravili 1 M NaOH, od katere smo v nadaljevanju odpipetirali 2,5 mL in z bidestilirano vodo raztopimo do 50,0 mL. Raztopina je obstojna le 7 dni. Vsak teden pripravimo novo.

#### **3.1.1.6 Raztopina vodikovega peroksida s koncentracijo 33,6 mM**

Odpipetirali smo 33,5 μL 30% vodikovega peroksida (v nadaljevanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in ga z bidestilirano vodo razredčili do skupnega volumna 10,0 mL. Omenjeno raztopino smo pripravljali dnevno sproti.

#### **3.1.1.7 Raztopina askorbinske kisline s koncentracijo 1,2 mM**

V penicilinko smo približno natančno zatehtali 2 mg natehtane askorbinske kisline in jo raztopili v 10,0 mL deionizirane vode Milli-Q. Pri tem smo pozorni, da za tehtanje ne uporabimo kovinske žličke, ampak plastično. Pred začetkom vsakega novega merjenja smo pripravili svežo raztopino askorbinske kisline.

#### **3.1.1.8 Raztopina tiobarbituratne kisline**

Najprej smo izračunali potrebno količino TBA, ki jo moramo zatehtati, saj sta masa TBA in volumen NaOH sorazmerna številu mikropruget. Preračun je dodan v nadaljevanju. Za posamezni sklop meritev smo potrebovali 22 mikropruget. V vsako mikroprugeto pa smo odpipetirali 480 μL TBA.

Preračun mase zatehte TBA:

20 mikropruget:

$$20 \times 480 \mu\text{L} = 9600 \mu\text{L} = 9,6 \text{ mL} \approx 10 \text{ mL}$$

100 mg TBA ..... 10 mL NaOH

22 mikropruget:

$$22 \times 480 \mu\text{L} = 10560 \mu\text{L} = 10,56 \text{ mL} \approx 11 \text{ mL}$$

x mg TBA ..... 11 mL NaOH

$$x \text{ mg TBA} = (100 \text{ mg TBA} \times 11 \text{ mL}) / 10 \text{ mL} = 110 \text{ mg TBA}$$

Glede na število vzorcev smo tako v penicilinko natehtali 110 mg TBA in dodali 11 mL NaOH.

Dobljeno raztopino smo sonificirali, da se je TBA v celoti raztopila.

### **3.1.1.9 Raztopina trikloroocetna kisline**

Najprej smo izračunali potrebno količino TCA, ki jo moramo zatehtati, in določiti pripadajoči volumen bidestilarne vode, saj sta, tako kot pri TBA, sorazmerna številu mikropruget. Preračun je dodan v nadaljevanju. Za posamezni sklop meritev smo potrebovali 22 mikropruget. V vsako mikroprugeto smo odpipetirali po 480  $\mu\text{L}$  TCA.

Preračun mase zatehte TCA:

20 mikropruget:

$$20 \times 480 \mu\text{L} = 9600 \mu\text{L} = 9,6 \text{ mL} \approx 10 \text{ mL}$$

280 mg TCA ..... 10 mL MilliQ

22 mikropruget:

$$22 \times 480 \mu\text{L} = 10560 \mu\text{L} = 10,56 \text{ mL} \approx 11 \text{ mL}$$

x mg TCA ..... 11 mL MilliQ

$$x \text{ mg TCA} = (280 \text{ mg TCA} \times 11 \text{ mL}) / 10 \text{ mL} = 308 \text{ mg TCA}$$

Glede na število vzorcev smo tako v penicilinko natehtali smo 308 mg TCA in dodali 11 mL bidestilirane vode.

Dobljeno raztopino smo sonicirali, da se je TCA v celoti raztopila.

### **3.1.2 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA PROTOKOL 2**

#### **3.1.2.1. Priprava fosfatnega pufra**

Osnovna raztopina je bil (PBS), ki smo ga z dodajanjem 1 M raztopine NaOH umerili na pH 7,4. Protokol je predpisal PBS s koncentracijo 50 mM.

Za pripravo 100 mL 50 mM fosfatnega pufra smo natehtali 594,3 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ter 155,9 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  v časo. Dodali smo 90 ml MilliQ vode, da so se soli v celoti raztopile, smo uporabili magnetno mešalo. Uravnali smo pH na 7,4, prelili v bučko z volumnom 100,0 mL ter do oznake dopolnili s preostankom MilliQ vode.

#### **3.1.2.2. Raztopina 2-deoksi-D-riboze s koncentracijo 5 mM**

Za pripravo 5 mM raztopine smo v merilno bučko zatehtali 67,1 mg 2-deoksi-D-riboze, raztopili v bidestilirani vodi in dopolnili do končnega volumna 100,0 mL. Omenjeno raztopino smo pripravili vnaprej. Shranjevali smo jo v hladilniku. Pred samo uporabo pa smo jo vzeli iz hladilnika in počakali, da se je segrela na sobno temperaturo.

#### **3.1.2.3 Raztopina EDTA s koncentracijo 1,2 mM**

Zatehtali smo 3,51 mg etilendiamintetraoetne kisline (v nadaljevanju EDTA) v penicilinko in jo raztopili v 10,0 mL deionizirane vode Milli-Q.

EDTA že na začetku pripravimo v večji količini in vnaprej. To lahko storimo, ker je raztopina EDTA stabilna.

#### **3.1.2.4 Raztopina $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ s koncentracijo 10 mM**

V bučko smo zatehtali 208,29 mg  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ter zraven dodali še 10 mg elementarnega železa. Do oznake 100,0 mL smo dopolnili z 10 mM HCl. Bučko smo zaprli, vsebino premešali ter počakali 20 minut.

Tik pred nanosom v mikroeprovete oziroma na mikrotitrsko ploščico smo iz prvotne bučke odpipetirali 10 mL pripravljene raztopine, jih prenesli v drugo bučko ter z MilliQ vodo dopolnili do oznake 100,0 mL.

### **3.1.2.5 Raztopina NaOH s koncentracijo 50 mM**

Najprej smo pripravili 1 M NaOH, od katere smo v nadaljevanju odpipetirali 2,5 mL in z bidestilirano vodo dopolnili do 50,0 mL. Raztopina je obstojna le 7 dni. Vsak teden pripravimo novo.

### **3.1.2.6 1% raztopina tiobarbituratne kisline**

Za pripravo 1% raztopine TBA smo natehtali 250 mg TBA v bučko z volumnom 25 mL. Do oznake smo natehtani TBA dodali raztopino NaOH s koncentracijo 50 mM. Dobljeno raztopino smo sonicirali v ultrazvočni kopeli, da se je TBA v celoti raztopila.

### **3.1.2.7 2,8% raztopina trikloroocetne kisline**

Za pripravo 2,8% raztopine TBA smo natehtali 700 mg TBA v bučko z volumnom 25 mL. Do oznake smo natehtani TCA dodali bidestilirano vodo. Dobljeno raztopino smo sonicirali v ultrazvočni kopeli, da se je TCA v celoti raztopila.

## **3.2 PRIPRAVA VZORCEV**

### **3.2.1 Priprava vzorcev za protokol 1**

V 10 mL penicilinko smo približno natančno zatehtali 2 mg vzorca. Koncentracija ZJ-176 je znašala 1,40 mM, koncentracija ZJ-167\_1 je bila 1,55 mM ter koncentracija ZJ-70 0,77 mM. Penicilinke smo predhodno enoznačno označili. Zatehtane vzorce smo raztopili v PBS do skupnega volumna 10 mL. Nato smo iz te raztopine odpipetirali 0,5 mL posamezne pripravljene raztopine antioksidantov ter prenesli v 4,5 mL PBS. Ponovno smo dobro premešali na vorteksu. Dobili smo raztopine ZJ-176 s koncentracijo 0,140 mM, ZJ-167\_1 s 0,155 mM in ZJ-70 s 0,077 mM.

Priprava nadaljnjih redčim, ki smo jih odpipetirali v ustrezne mikroeprovete, je pregledno predstavljena s pomočjo preglednice (*Preglednica III*). Volumen vzorcev je ostal enak, torej 300  $\mu$ L, spreminjale so se le njihove koncentracije. Za vsako posamično koncentracijo smo izvedli meritev v triplikatu. Za topilo smo ponovno vzeli PBS.

**Preglednica III.** Priprava posameznih redčin vzorcev ZJ-176, ZJ-167\_1 ter ZJ-70.

Oznaka redčine	Volumen ZJ-176/ ZJ-167_1/ZJ-70 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen PBS ( $\mu\text{L}$ )
1-, 1A+, 1B+, 1C+	2	298
2-, 2A+, 2B+, 2C+	10	290
3-, 3A+, 3B+, 3C+	25	275
4-, 4A+, 4B+, 4C+	75	225
5-, 5A+, 5B+, 5C+	150	150

Na podlagi preglednice III smo naredili tudi preračune, kakšne so koncentracije izbranih antioksidantov v končni reakcijski zmesi pred dodatkom TBA in TCA. Končne koncentracije vzorčnih spojin so podane v nadaljevanju.

**Preglednica IV.** Oznake posameznih redčin in pripadajoče koncentracije izbranih antioksidantov.

Oznaka redčine	Končna konc. ZJ 176 ( $\mu\text{M}$ )	Končna konc. ZJ 167_1 ( $\mu\text{M}$ )	Končna konc. ZJ 70 ( $\mu\text{M}$ )
1-, 1A+, 1B+, 1C+	0,52	0,57	0,29
2-, 2A+, 2B+, 2C+	2,87	2,87	1,43
3-, 3A+, 3B+, 3C+	6,47	7,17	3,59
4-, 4A+, 4B+, 4C+	19,41	21,51	10,76
5-, 5A+, 5B+, 5C+	38,81	43,03	21,51

Potrebovali smo še dva slepa vzorca (SL- in SL+), ki nista vsebovala testirane spojine. Testirano spojino smo v tem primeru nadomestili z ustreznim volumnom PBS. SL- nam je predstavljala ozadje vzorcev, SL+ pa smo uporabili za kontrolo kakovosti same izvedbe eksperimenta, da so bili uporabljeni vsi reagenti in v pravilnem zaporedju.

### 3.2.2 Priprava vzorcev za protokol 2

V 10 mL penicilinko smo približno natančno zatehtali različne mase vzorcev izbranih antioksidantov. Penicilinke smo predhodno enoznačno označili. Zatehtane vzorce smo raztopili v MilliQ do koncentracije 1 mM. Pripravljene raztopine smo dobro premešali na vorteksu.

**Preglednica V.** Zatehte posameznih antioksidantov s končno koncentracijo 1 mM.

Oznaka AO	Molska masa (g/mol)	Masa (mg)	Končna konc. AO (mM)
ZJ-176	143,14	1,43	1
ZJ-167_1	129,12	1,29	1
ZJ-70	258,27	2,58	1

### 3.2.2.1 Spektroskopska meritev absorbance vzorca z nanosom vzorcev v mikroepruvetah

V protokolu je koncentracija spojine antioksidanta ostala nespremenjena. Spreminjala se je koncentracija železovih ionov.

Priprava potrebnih redčim raztopine železovih ionov, ki smo jih odpipetirali v ustrezne mikroepruvete, je pregledno predstavljena s pomočjo spodnje preglednice. Volumen [FeCl<sub>2</sub> + PBS] je v vseh primerih ostal enak, torej 335 μL, spreminjale so se le končne koncentracije Fe<sup>2+</sup>. Za vsako posamično koncentracijo Fe<sup>2+</sup> smo izvedli meritev v triplikatu.

**Preglednica VI.** Priprava posameznih redčin raztopine železovih ionov - priprava v mikroepruvete (protokol 2).

Oznaka redčine	Volumen FcCl <sub>2</sub> (μL)	Volumen PBS (μL)
1A+, 1B+, 1C+	0	335
2A+, 2B+, 2C+	5	330
3A+, 3B+, 3C+	10	325
4A+, 4B+, 4C+	20	315
5A+, 5B+, 5C+	30	305
6A+, 6B+, 6C+	40	295
7A+, 7B+, 7C+	50	285
8A+, 8B+, 8C+	60	275
9A+, 9B+, 9C+	70	265
10A+, 10B+, 10C+	80	255

Na podlagi preglednice VI smo naredili tudi preračune, kakšne so koncentracije izbranih antioksidantov v končni reakcijski zmesi. Končne koncentracije vzorčnih spojin so podane v nadaljevanju.



### 3.2.2.2 Spektroskopska meritev absorbance vzorca z nanosom vzorcev na mikrotitrsko ploščico

Priprava redčim, ki pa smo jih odpipetirali v ustrezne vdolbinice na mikrotitrski ploščici, je pregledno zapisana v spodnji preglednici VII. Volumen [FeCl<sub>2</sub> + PBS] je v vseh primerih ostal enak, torej 100 μL, spreminjale so se le končne koncentracije Fe<sup>2+</sup>. Za vsako posamično koncentracijo smo ivedli meritev v triplikatu.

**Preglednica VII.** Priprava posameznih redčin raztopine železovih ionov za merjenje na mikrotitrski ploščici (protokol 2).

Oznaka redčine	Volumen FeCl <sub>2</sub> (μL)	Volumen PBS (μL)
1A+, 1B+, 1C+	0	100,0
2A+, 2B+, 2C+	1,5	98,5
3A+, 3B+, 3C+	3	97,0
4A+, 4B+, 4C+	6	94,0
5A+, 5B+, 5C+	9	91,0
6A+, 6B+, 6C+	12	88,0
7A+, 7B+, 7C+	15	85,0
8A+, 8B+, 8C+	18	82,0
9A+, 9B+, 9C+	21	79,0
10A+, 10B+, 10C+	24	76,0

V obeh primerih smo potrebovali še slepi vzorec (SL-), ki ni vseboval železovih ionov. Testirano spojino smo v tem primeru nadomestili z ustreznim volumnom MilliQ. SL- nam je predstavljala ozadje vzorcev.

## 3.3 PROTOKOL IZVEDBE DEOKSIRIBOZNEGA TESTA

### 3.3.1 Protokol 1

#### 3.3.1.1 Spektroskopska meritev absorbance vzorca z uporabo kivet

Uporabili smo sledeči protokol:

1. Mikropruvete z volumnom 1,5 mL smo jasno in enoznačno označili. S tem smo poskrbeli za še dodatno sledljivost in preglednost, za kateri vzorec gre.
2. Pričeli smo s pipetiranjem potrebnih reagentov, in sicer s 40 μL 120 mM fosfatnega pufru (v nadaljevanju PBS). Dodali smo enak volumen pripravljene raztopine

- deoksiriboze. Omenjena reagenta smo v mikroepreveta dobro premešali na vorteksu.
3. Sledil je dodatek 40  $\mu\text{L}$  30% vodikovega peroksida (v nadaljevanju  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).  $\text{H}_2\text{O}_2$  nismo dodali v SL-, 1-, 2-, 3-, 4- in 5-. V omenjenih mikroeprevetah smo izostanek  $\text{H}_2\text{O}_2$  nadomestili z enakim volumnom vode. Ponovno smo premešali na vorteksu.
  4. V mikroeprevete smo odpipetirali 40  $\mu\text{L}$  raztopine EDTA, ki je služila kot kelator. Pred vorteksiranjem smo dodali še 40  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$ .  $\text{FeCl}_3$  smo izpustili v primeru vzorcev z oznakami SL-, 1-, 2-, 3-, 4- in 5-. Izostanek smo nadomestili z enakim volumnom vode. Raztopine v mikroeprevetah smo pustili stati par minut, potem smo jih premešali na vorteksu.
  5. Nadaljevali smo z nanosom 300  $\mu\text{L}$  izbranega vzorca ustreznih koncentracij. Vzorcev nismo nanegli v mikroeprevetah z oznakama SL- in SL+. Pri SL- in SL+ smo manjkajoči vzorec nadomestili z enakim volumnom PBS.
  6. Dodali smo 40  $\mu\text{L}$  1.2 mM sveže pripravljene raztopine askorbinske kisline. Ponovno smo z vorteksom premešali vsebino.
  7. Raztopine v dobro zaprtih mikroeprevetah smo centrifugirali 1 minuto, s tem smo premaknili morebitne kapljice reagentov, ki so ostale na stenah in pokrovu, v konjico mikroeprevete.
  8. Vzorce smo inkubirali v vodni kopeli, ki je bila vnaprej ogreta na temperaturo 37 °C. Čas inkubacije je bil 1 uro.
  9. Ohladili smo jih in ponovno centrifugirali 1 minuto.
  10. Nadaljevali smo z dodatkom reagentov. Najprej smo dodali 480  $\mu\text{L}$  TBA, temu je sledilo še 480  $\mu\text{L}$  TCA. Vorteksirali smo 1 minuto.
  11. Sledila je 20-minutna inkubacija, in sicer pri temperaturi 90 °C. Pazili smo, da so celoten čas inkubacije mikroeprevete ostale dobro zaprte.
  12. Ohlajene mikroeprevete smo ponovno premešali na vorteksu in na hitro centrifugirali.
  13. Vzorce smo enega za drugim prenesli v kivete.
  14. Vzorcem smo izmerili absorbanco.

### **3.3.1.2 Spektroskopska meritev absorbance vzorca na mikrotitrski ploščici**

Protokol sledi protokolu z uporabo kivet, le da smo volumne reagentov in vzorcev prilagodili volumnom vdolbinic na mikrotitrskih ploščica. To pomeni, da smo vse volumne delili s faktorjem 4. Maksimalni volumen vsake vdolbinice je znašal 300  $\mu\text{L}$ .

1. Mikrotitrsko ploščico smo jasno in enoznačno označili, tako da smo na pokrovu označili razporeditev vzorcev.
2. Pričeli smo s pipetiranjem potrebnih reagentov, in sicer z 8  $\mu\text{L}$  120 mM PBS. Dodali smo enak volumen pripravljene raztopine deoksiriboze.
3. Sledil je dodatek 8  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  nismo dodali v SL-, 1-, 2-, 3-, 4- in 5-. V omenjenih vdolbinicah smo izostanek  $\text{H}_2\text{O}_2$  nadomestili z enakim volumnom vode.
4. Odpipetirali smo 8  $\mu\text{L}$  raztopine EDTA, ki služi kot kelator Fe ionov. Nato smo dodali še 8  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$ .  $\text{FeCl}_3$  smo izpustili v primeru vzorcev z oznakami SL-, 1-, 2-, 3-, 4- in 5-. Izostanek smo nadomestili z enakim volumnom vode. Počakali smo par minut.
5. Nadaljevali smo z nanosom ustreznih koncentracij izbranega vzorca. Volumen vzorca je bil v vsakem primeru 60  $\mu\text{L}$ . Vzorcev nismo nanegli v vdolbinici z oznakama SL- in SL+.
6. Dodali smo 8  $\mu\text{L}$  sveže pripravljene askorbinske kisline.
7. Vzorce smo inkubirali v sušilniku pri temperaturi 37  $^{\circ}\text{C}$ . Čas inkubacije je bil 1 ura.
8. Ploščice smo ohladili.
9. Nadaljevali smo z dodatkom reagentov. Najprej smo odpipetirali 96  $\mu\text{L}$  TBA, temu je sledilo še 96  $\mu\text{L}$  TCA.
10. Sledila je 20-minutna inkubacija, in sicer pri temperaturi 90  $^{\circ}\text{C}$ .
11. Počakali smo, da se je ploščica ohladila.
12. Vzorcem smo izmerili absorbanco.

### **3.3.2 Protokol 2**

#### **3.3.2.1 Spektrofotometrična meritev absorbance vzorca z uporabo mikroepruvet in nanosom na mikrotitrsko ploščico**

Protokol:

1. Mikropruvete z volumnom 1,5 mL smo jasno in enoznačno označili. S tem smo poskrbeli za še dodatno sledljivost in preglednost, za kateri vzorec gre.
2. Pričeli smo s pipetiranjem potrebnih reagentov, in sicer s 125  $\mu\text{L}$  5 mM deoksiriboze.
3. Sledil je dodatek  $(335 - x)$   $\mu\text{L}$  50 mM PBS.
4. V mikropruvete smo odpipetirali 40  $\mu\text{L}$  raztopine izbrane spojine antioksidanta.
5. Nadaljevali smo z nanosom ustreznih koncentracij raztopine železovih ionov. Nanašali smo različne redčine z naraščajočim volumnom ( $x = 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80$ ). Vzorcev nismo nanесли v mikropruvete z oznako SL-. Pri SL- smo manjkajoči vzorec nadomestili z enakim volumnom MilliQ vode.
6. Vzorce smo inkubirali v vodni kopeli, ki je bila vnaprej ogreta na temperaturo 37 °C. Čas inkubacije je bil 1 uro.
7. Nadaljevali smo z dodatkom reagentov. Najprej smo dodali 250  $\mu\text{L}$  TBA, temu je sledilo še 250  $\mu\text{L}$  TCA. Vorteksirali smo 1 minuto.
8. Sledila je 20-minutna inkubacija, in sicer pri temperaturi 90 °C. Pazili smo, da so celoten čas inkubacije mikropruvete ostale dobro zaprte.
9. Mikropruvete smo ohladili.
10. Vzorce smo enega za drugim prenesli na mikrotitrsko ploščico.
11. Vzorcem smo izmerili absorbanco s čitalcem Synergy HT

### 3.3.2.2 Spektroskopska meritev absorbance vzorca na mikrotitrski ploščici

Protokol sledi protokolu z uporabo kivet, le da smo volumne reagentov in vzorcev prilagodili volumnom vdolbinic na mikrotitrski ploščici. To pomeni, da smo vse volumne delili s faktorjem 3,33. Maksimalni volumen vsake vdolbinice je lahko 300  $\mu\text{L}$ , mi smo nanašali volumen 299,2  $\mu\text{L}$ , da smo ohranili razmerje med posameznimi reagenti.

Za vsako posamično koncentracijo  $\text{Fe}^{2+}$  smo izvedli meritev v triplikatu.

Protokol:

1. Mikrotitrsko ploščico smo jasno in enoznačno označili, tako da smo na pokrovu označili razporeditev vzorcev.
2. Pričeli smo s pipetiranjem potrebnih reagentov, in sicer s 37  $\mu\text{L}$  5 mM deoksiriboze.

3. Sledil je dodatek  $(100 - x)$   $\mu\text{L}$  50 mM PBS.
4. Na mikrotitrsko ploščico smo odpipetirali 12  $\mu\text{L}$  raztopine izbrane spojine antioksidanta.
5. Nadaljevali smo z nanosom ustreznih koncentracij raztopine železovih ionov. Nanašali smo različne redčine z naraščajočim volumnom ( $x = 0, 1,5, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24$ ). Vzorcev nismo nanegli v vdolbinicah s SL-. Pri SL- smo manjkajoči vzorec nadomestili z enakim volumnom MilliQ vode.
6. Vzorce smo inkubirali pri temperaturi 37 °C. Čas inkubacije je bil 1 uro.
7. Nadaljevali smo z dodatkom reagentov. Najprej smo dodali 75,1  $\mu\text{L}$  TBA, temu je sledilo še 75,1  $\mu\text{L}$  TCA.
8. Sledila je 20-minutna inkubacija v stresalniku za mikrotitrsko ploščice, in sicer pri temperaturi 90 °C.
9. Mikrotitrsko ploščico smo ohladili.
10. Vzorcem smo izmerili absorbanco s čitalcem Synergy HT.

## **4.0 REZULTATI**

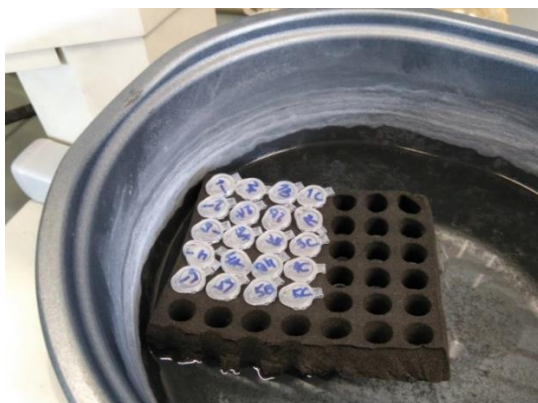
### **4.1 DEOSKIRIBOZNI TEST**

Postopek dela smo pripravili glede na opise v literaturi, saj tako omogoča preglednejši, organiziran in sistematičen pristop k pripravi vzorcev. Pripravili smo tudi tabelo z oznakami, količino in koncentracijo vzorcev in pregledno sestavo reakcijske mešanice v posamezni mikropruveti.

Princip metode tvori zaporedje reakcij, ki da na koncu rožnato oranžno obarvan produkt, ki mu izmerimo absorbanco z UV/VIS spektroskopijo (shema zaporedja reakcij je prikazana v poglavju 2.1). Hidroksilni radikali oksidirajo 2-deoksiribožo do MDA in drugih stranskih produktov. Omenjeni MDA je osnova za reakcijo s tiobarbituratno kislino, ki po dodatku trikloroocentne kisline omogoči nastanek obarvanega produkta, ki mu izmerimo absorbanco. Intenziteti obarvanosti produkta z UV/VIS spektroskopijo določimo številčno vrednost absorbance. Vrednost absorbance je v premosorazmernem odnosu s količino nastalega MDA pri valovni dolžini 532 nm (17, 18, 19).

Vodikov peroksid, ki ga dodamo v reakcijsko mešanico, reagira s kompleksom [železovi ioni ( $\text{Fe}^{2+}$ ) - EDTA]. Za redukcijo železovih ionov  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$  poskrbi askorbinska kislina. Pri tem se sprostita hidroksilni ion in hidroksilni radikal. Slednji kompetitivno napade 2-deoksiriboza. Če je prisoten antioksidant, ta tekmuje za reakcijo s hidroksilnim radikalom z deoksiriboza in jo tako zaščiti. S tem prepreči njeno oksidativno razgradnjo s hidroksilnim radikalom. Slednje poteka med inkubacijo pri temperaturi 37 °C. Nastanejo različni produkti, med drugimi tudi MDA. Po končani inkubaciji dodamo še TBA in TCA. TBA dodamo z namenom, da reagira z MDA do obarvanega produkta, medtem ko TCA prekine reakcijo med hidroksilnim radikalom ter 2-DR. Večja, kot je zaščitna sposobnost spojine antioksidanta, da zaščiti 2-deoksiriboza, manjša bo količina nastalega MDA ter s tem izmerjena nižja absorbanca (17, 18).

Pri 37 °C in 90 °C potečeta inkubaciji, prva traja eno uro ter druga dvajset minut. Časa trajanja inkubacije in navedenih dveh temperatur se je treba striktno držati, saj le tako zagotavljamo ustrezne pogoje za potek sklopa reakcij in dobro ponovljivost rezultatov.

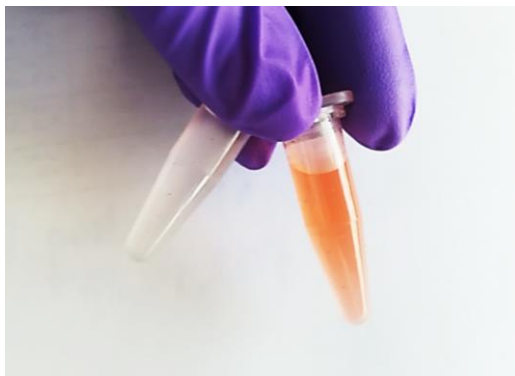


**Slika 6.** Inkubacija vzorcev v termostahirani kopeli pri temperaturi 37 °C.

Potrebujemo še dva slepa vzorca (v nadaljevanju oznaki SL- in SL+), ki nista vsebovala izbranega antioksidanta. Sestava SL- ni vsebovala  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{FeCl}_3$ , kar smo nadomestili z ustreznim volumnom deionizirane vode Milli-Q. S tem je bila onemogočena Fentonova reakcija in nastanek hidroksilnega radikala. Zato nam je SL- predstavljal ozadje vzorcev, ki smo ga morali odšteti od končne vrednosti absorbance. SL+ pa nam je služil kot pozitivna kontrola, da je reakcija potekla in na katero smo potem primerjali, v kolikšni meri je prišla do izraza antioksidativna sposobnost izbrane spojine.

Če povzamemo zgornji protokol, je razvidno, da smo pri negativni kontroli (SL-), 1-, 2-, 3-, 4- in 5- izpustili dodatek  $H_2O_2$  in  $FeCl_3$ , kar smo nadomestili z ustreznim volumnom deionizirane vode Milli-Q. Pri pozitivni kontroli (SL+) pa smo dodali vse reagente, le vzorec antioksidanta smo izpustili in ga nadomestili z ustreznim volumnom PBS.

V nadaljevanju je slikovno predstavljen primer končnega izgleda SL- in SL+ za lažjo predstavo. SL- ustreza levi mikroepruveti in SL+ desni (slika 8).



**Slika 7.** Mikroepruveti slepih vzorcev z negativno ter s pozitivno reakcijo.

## **4.2 REZULTATI – PROTOKOL 1**

### **4.2.1 Rezultati izvedbe spektrofotometričnega merjenja absorbance vzorcev v kivetah**

Preden smo opravili meritve, smo morali vzorce še redčiti, in sicer za faktor 2, saj so bile drugače meritve zunaj linearnega območja absorbanc, ki daje zanesljive meritve. Linearno območje aparata se nahaja med vrednostmi absorbanc 0,1 in 1,0. Prav tako smo uporabili SL-, da smo odstranili ozadje, ki je bilo enako vsem vzorcem in s tem umerili aparat na vrednost 0,0. Nato smo izvedli meritve. Da smo dobili končne rezultate, smo morali dobljene meritve pomnožiti s faktorjem redčenja.

V nadaljevanju so podani rezultati izmerjenih absorbanc vzorcev v kivetah za posamezni obravnavani antioksidant. Meritve smo opravili na UV-vis spektrofotometru Cary 50 Conc in pri valovni dolžini 532 nm. Skupni volumen, ki smo ga nanjali v 1,5 mL mikroepruveto, je znašal 1,5 mL.

#### 4.2.1.1 Antioksidant ZJ-70

V spodnji tabeli so zbrani podatki, ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbance vzorcev z različnimi koncentracijami antioksidativne spojine ZJ-70 v kivetah.

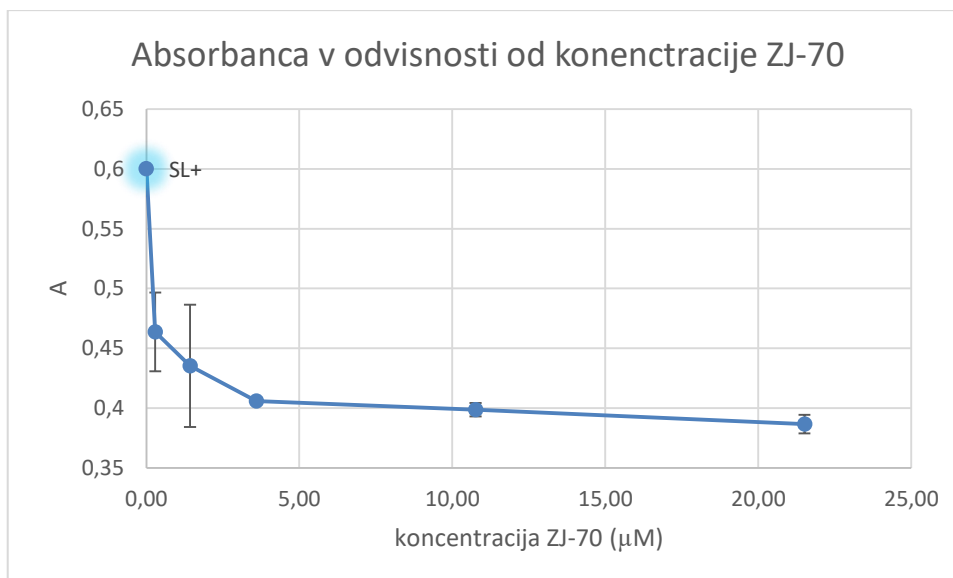
Vrednost absorbance za SL+ je znašala 1,6030.

**Preglednica VIII.** *Koncentracije, povprečna vrednost A ter 1/A za antioksidant ZJ-70, izmerjeno v kivetah.*

ZJ-70	Koncentracija ZJ-70 ( $\mu\text{M}$ )	Povprečje A	1/A
1A+, 1B+, 1C+	0,29	$1,572 \pm 0.030$	0,63624
2A+, 2B+, 2C+	1,43	$1,541 \pm 0.023$	0,64893
3A+, 3B+, 3C+	3,59	$1,451 \pm 0.018$	0,68915
4A+, 4B+, 4C+	10,76	$1,328 \pm 0.034$	0,75290
5A+, 5B+, 5C+	21,51	$1,228 \pm 0.055$	0,81411

Iz podatkov je razvidno, da vrednost absorbance pada, recipročna vrednost 1/A pa narašča. Odnos med izmerjenimi absorbancami ni linearen, kot smo pričakovali, temveč prej eksponenten, saj se z večanjem koncentracije antioksidanta ZJ-70 razlike med absorbancami zmanjšujejo; približujemo se platoju. Verjetno bi plato dosegli pri vrednosti absorbance 1,2. Slednje je razvidno tudi iz izrisanih grafov. Padec absorbance je v primeru antioksidanta ZJ-70 bistveno večji, kot je le ta v preostalih dveh izmerjenih točkah. Če bi dodali še dve ali več merilnih točk, bi bil plato še bistveno bolj poudarjen. Na drugem grafu, kjer je prikazana odvisnost vrednosti 1/A od koncentracije antioksidanta ZJ-70, pa velja vse zgoraj omenjeno, le da vrednosti naraščajo in se tako bližamo dosegu platoja pri višjih absorbancah.





**Slika 8.** Graf odvisnosti absorbanca od koncentracije za antioksidant ZJ-70, izmerjeno v kivetih.

Od vseh treh izbranih antioksidantov (ZJ-70, ZJ-167\_1 in ZJ-176) ima antioksidant ZJ-70 **najvišjo** začetno absorbanco in **najmanjšo** razliko med začetno in končno absorbanco pri podobnih koncentracijah antioksidatne spojine.

#### 4.2.1.2 Antioksidant ZJ-167\_1

V spodnji tabeli (preglednica IX) so zbrani podatki, ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbce vzorcev z različnimi koncentracijami antioksidativne spojine ZJ-167\_1 v kivetah.

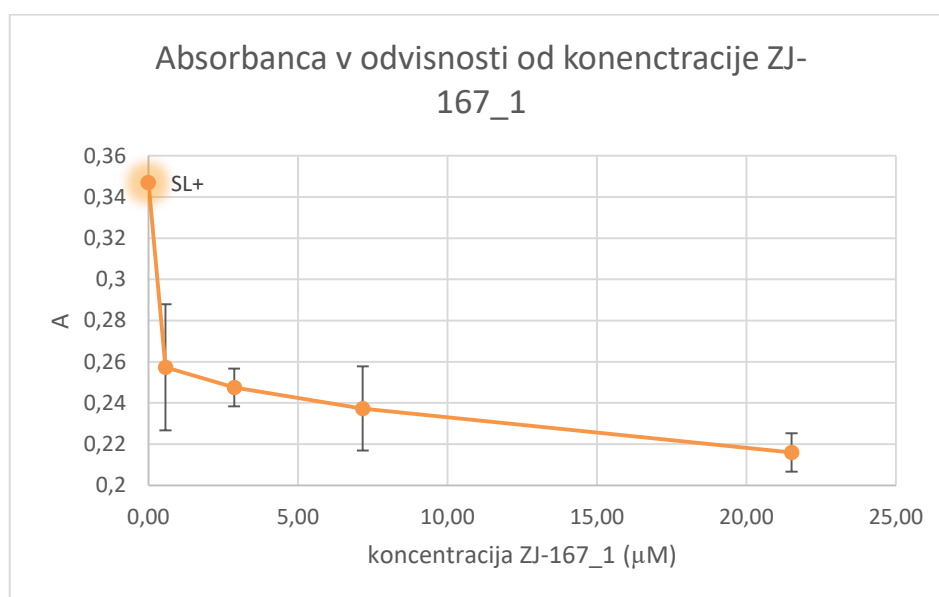
Vrednost absorbanca za SL+ je znašala 1,4148.

**Preglednica IX.** Koncentracije, povprečne vrednosti A ter 1/A za antioksidant ZJ-167\_1, izmerjeno v kivetah.

ZJ-167_1	Koncentracija ZJ-167_1 (µM)	Povprečje A	1/A
1A+, 1B+, 1C+	0,57	1,253 ± 0.049	0,797829903
2A+, 2B+, 2C+	2,87	1,229 ± 0.025	0,814022901
3A+, 3B+, 3C+	7,17	0,861 ± 0.061	1,161260355
4A+, 4B+, 4C+	21,51	0,819 ± 0.010	1,221299463
5A+, 5B+, 5C+	43,03	0,804 ± 0.001	1,244400199

Tudi pri antioksidantu ZJ-167\_1 odnos med izmerjenimi absorbancami ni linearen, temveč bolj eksponenten, saj se tudi tu z večanjem koncentracije antioksidanta ZJ-167\_1, razlike

med absorbancami zmanjšujejo in približujemo nastanku platoja. Slednje je razvidno tudi iz izrisanih grafov. Podobnost s prejšnjim antioksidantom se kaže v obliki krivulje. Padec krivulje je v primeru odvisnosti absorbance od koncentracije antioksidanta ZJ-167\_1 prav tako bistveno večji, kot je ta v preostalih dveh izmerjenih točkah. Če bi dodali še dve ali več merilnih točk, bi bil plato bistveno bolj poudarjen. Na drugem grafu, kjer je prikazana odvisnost vrednosti  $1/A$  od koncentracije antioksidanta ZJ-70, pa velja vse zgoraj omenjeno, le da vrednosti naraščajo in se tako bližamo dosegu platoja pri višjih absorbancah.



**Slika 9.** Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-167\_1 izmerjene v kivetih.

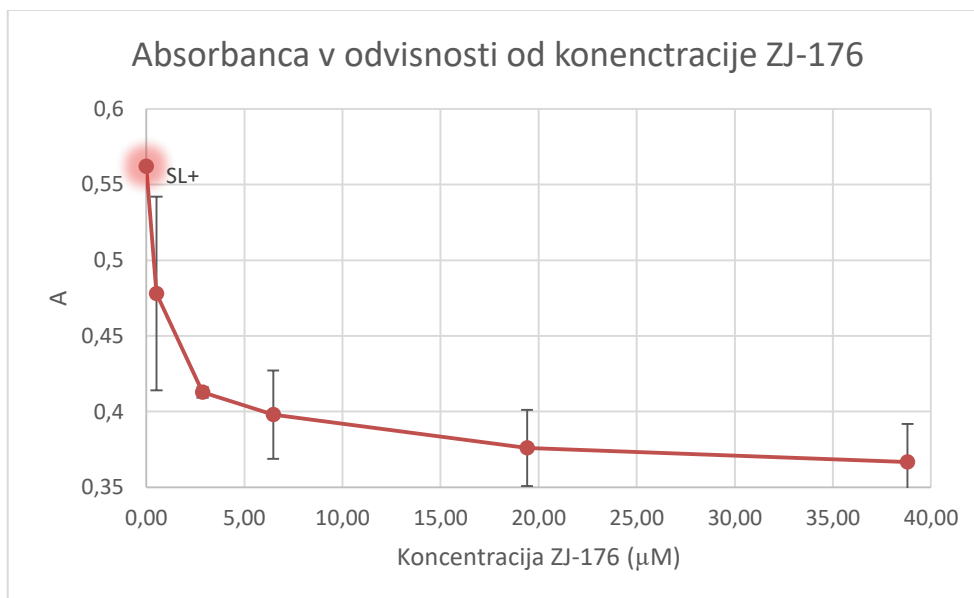
#### 4.2.1.3 Antioksidant ZJ-176

Zbrani so podatki, ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbce vzorcev z različnimi koncentracijami antioksidativne spojine ZJ-176 v kivetah.

**Preglednica X.** Koncentracije, povprečne vrednosti  $A$  ter  $1/A$  za antioksidant ZJ-176, izmerjeno v kivetah.

ZJ-176	Koncentracija ZJ-176 (µM)	Povprečje A	1/A
1A+, 1B+, 1C+	0,52	$1,371 \pm 0,004$	0,729678455
2A+, 2B+, 2C+	2,87	$1,313 \pm 0,020$	0,761459973
3A+, 3B+, 3C+	6,47	$1,306 \pm 0,017$	0,765579544
4A+, 4B+, 4C+	19,41	$1,168 \pm 0,042$	0,855920114
5A+, 5B+, 5C+	38,81	$0,984 \pm 0,001$	1,016053648

Skupno jim je, da z večanjem koncentracije antioksidanta pada vrednost absorbance in narašča vrednost  $1/A$ . Razlike med absorbancami zmanjšujejo in približujemo nastanku platoja. Padec absorbance se večja s koncentracijo antioksidanta ZJ-176. Obratno velja za krivuljo  $1/A$  v odvisnosti od koncentracije antioksidanta, kjer so z večanjem koncentracije, razlike med absorbancami vedno večje. Slednje je razvidno in priloženih grafov.



**Slika 10.** Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-176 izmerjene v kivetih.

Pri protokolu 1 smo ugotovili, da je pri spektrofotometričnem merjenju absorbance vzorcev v kivetah od vseh treh izbranih antioksidantov (ZJ-70, ZJ-167\_1 in ZJ-176) imel antioksidant ZJ-70 najvišjo začetno absorbenco in najmanjšo razliko med začetno in končno absorbenco pri podobnih koncentracijah antioksidatne spojine. Od vseh je imel antioksidant ZJ-167\_1 najmanjšo začetno absorbenco in največjo razliko med začetno in končno absorbenco pri podobnih koncentracijah antioksidatne spojine. Antioksidant ZJ-176 je imel napram drugima dvema antioksidantoma bistveno bolj linearen odnos, ZJ-70 in ZJ-167\_1 sta imela eksponenten odnos med absorbenco ter njuno koncentracijo. Zato nismo mogli določiti hitrostne konstante, kot je bilo to opisano v članku *Halliweel et al, 1987 (17)*.

#### 4.2.2 Rezultati izvedbe spektrofotometričnega merjenja absorbance vzorcev na mikrotitrski ploščici

Rezultati spektrofotometričnega merjenja absorbance vzorcev, ki so navedeni v nadaljevanju, se od zgoraj navedenih rezultatov merjenja v kivetah razlikujejo v koncentraciji in posledično tudi v vrednostih absorbanc. Temu je botrovalo dejstvo, da smo šele po večkratnem poskušanju vendarle uspeli pridobiti rezultate, ki so znotraj linearne območja čitalca, in sicer med 0,1 in 1,0. Da smo zadostili temu pogoju, smo morali bistveno prilagoditi koncentracije vzorcev ter razlike med posameznimi koncentracijami, saj drugače meritve niso bile znotraj linearne območja aparature in niso dajale značilno različnih vrednosti absorbance.

Meritve smo opravili na čitalcu Synergy HT in pri valovni dolžini 532 nm.

Maksimalen volumen vzorca, ki ga lahko nanese v eno merilno vdolbinico na mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami znaša 300  $\mu\text{L}$ . V ta namen smo prilagodili tudi volumne posameznih reagentov in vzorca. Na mikrotitrsko ploščico smo nanašali 5-krat manjše volumne, kot smo jih sicer porabili za merjenje v kivetah. Skupni volumen, ki smo ga nanese v vdolbinico, je tako znašal 296  $\mu\text{L}$ .

Pri vseh antioksidantih smo iz pridobljenih podatkov najprej izračunali povprečno vrednost absorbanc za posamezno koncentracijo antioksidanta ter nato izračunali še recipročno vrednost  $1/A$ . Sledil je izris grafov.

##### 4.2.2.1 Antioksidant ZJ-70

V spodnji tabeli (preglednica XI) so zbrani podatki, ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbance vzorcev z različnimi koncentracijami antioksidativne spojine ZJ-70 na mikrotitrski ploščici.

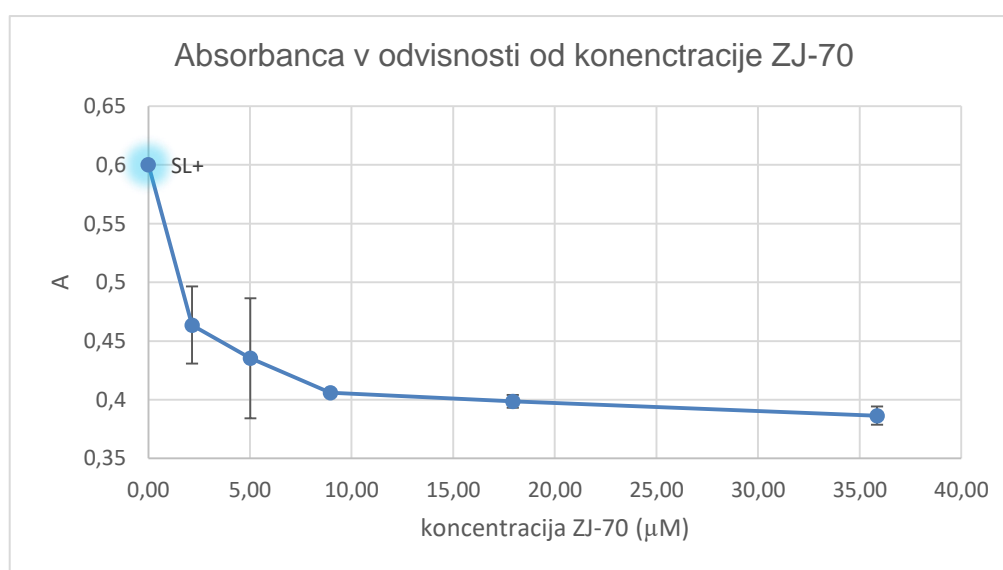
Vrednost absorbance za SL+ je znašala 0,600.

**Preglednica XI.** Koncentracije, povprečne vrednosti  $A$  ter  $1/A$  za antioksidant ZJ-70, izmerjeno na mikrotitrski ploščici.

ZJ-70	Koncentracija ZJ-70 ( $\mu\text{M}$ )	povprečje $A$	$1/A$
1A+, 1B+, 1C+	2,15	$0,4637 \pm 0.033$	2,1567
2A+, 2B+, 2C+	5,02	$0,4353 \pm 0.051$	2,2971
3A+, 3B+, 3C+	8,96	$0,4060 \pm 0.001$	2,4631

4A+, 4B+, 4C+	17,93	$0,3987 \pm 0.006$	2,5084
5A+, 5B+, 5C+	35,85	$0,3865 \pm 0.008$	2,5873

Sledeči graf predstavlja odvisnost vrednosti absorbance od koncentracije izbranega antioksidanta ZJ-70. Iz omenjenega grafa lahko razberemo, da z večanjem koncentracije antioksidanta pada vrednost absorbance. Takšne rezultate smo tudi pričakovali. Pri prvih treh koncentracijah antioksidanta je bil padec bistveno večji, kot je bil pri naslednjih dveh. Če bi pomerili še točko ali dve več, in sicer pri višjih koncentracijah, bi dosegli plato. To pomeni, da bistvenih sprememb v vrednosti absorbance ne bi več zaznali.



**Slika 11.** Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-70 na mikrotitrski ploščici.

#### 4.2.2.2 Antioksidant ZJ-167\_1

Spodnja preglednica XII prikazuje podatke, ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbance vzorcev z različnimi koncentracijami antioksidativne spojine ZJ-167\_1.

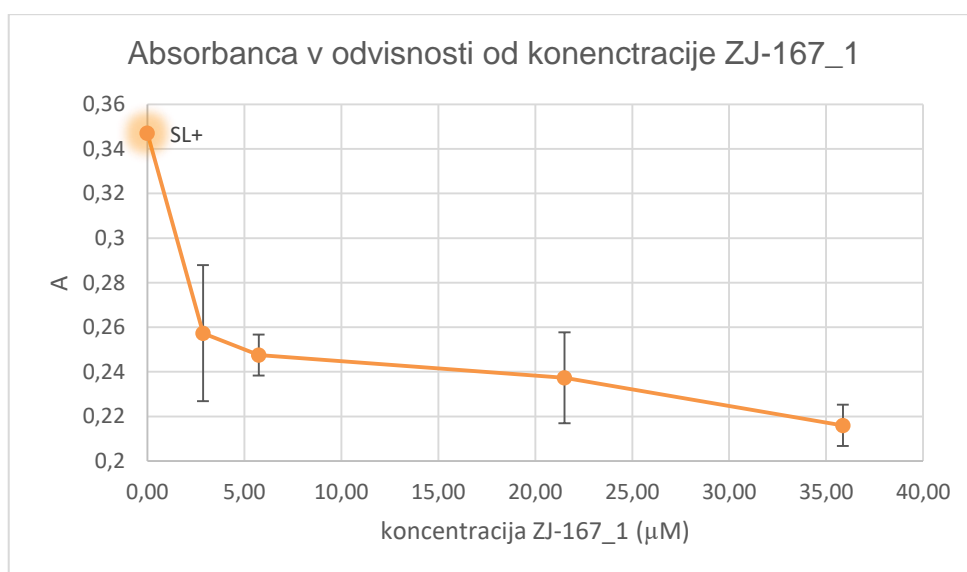
Vrednost absorbance za SL+ je znašala 0,347.

**Preglednica XII.** Koncentracije, povprečne vrednosti A ter 1/A za antioksidant za antioksidant ZJ-167\_1, izmerjeno na mikrotitrski ploščici.

ZJ-167_1	Koncentracija ZJ-167_1(μM)	povprečje A	1/A
1A+, 1B+, 1C+	2,87	$0,274 \pm 0.031$	3,650

2A+, 2B+, 2C+	5,74	$0,248 \pm 0.009$	4,040
3A+, 3B+, 3C+	21,51	$0,237 \pm 0.020$	4,213
4A+, 4B+, 4C+	35,86	$0,216 \pm 0.009$	4,630

Sledeči graf predstavlja odvisnost vrednosti absorbance od koncentracije izbranega antioksidanta ZJ-167\_1. Iz omenjenega grafa lahko razberemo, da z večanjem koncentracije antioksidanta prav tako pada vrednost absorbance, kot je bilo pričakovano. Tukaj smo imeli merljive podatke le pri štirih različnih koncentracijah omenjenega antioksidanta. Če bi pomerili še točko ali dve več, in sicer pri višjih koncentracijah, bi dosegli plato. To pomeni, da bistvenih sprememb v vrednosti absorbance ne bi več zaznali.



**Slika 12.** Graf odvisnosti absorbance od koncentracije za antioksidant ZJ-167\_1 na mikrotitrski ploščici.

#### 4.2.2.3 Antioksidant ZJ-176

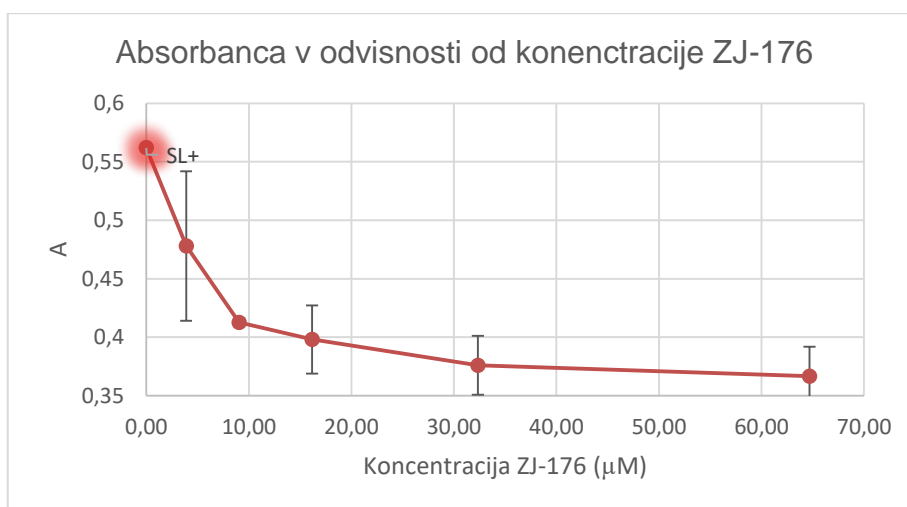
V tabeli smo zbrali podatke, ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbance vzorcev z različnimi koncentracijami antioksidativne spojine ZJ-176 na mikrotitrski ploščici.

Vrednost absorbance za SL+ je znašala SL+ 0,562.

**Preglednica XIII.** Koncentracije, povprečne vrednosti  $A$  ter  $1/A$  za antioksidant za antioksidant ZJ-176, izmerjeno na mikrotitrski ploščici.

ZJ-176	Koncentracija ZJ-176 ( $\mu\text{M}$ )	povprečje $A$	$1/A$
1A+, 1B+, 1C+	3,88	$0,4780 \pm 0,064$	2,092
2A+, 2B+, 2C+	9,06	$0,4127 \pm 0,004$	2,423
3A+, 3B+, 3C+	16,17	$0,3980 \pm 0,029$	2,513
4A+, 4B+, 4C+	32,34	$0,3760 \pm 0,025$	2,660
5A+, 5B+, 5C+	64,69	$0,3667 \pm 0,025$	2,727

Pri antioksidantu ZJ-176 odnos med izmerjenimi absorbancami ni linearen, temveč eksponenten, saj se z večanjem koncentracije antioksidanta ZJ-167\_1, razlike med absorbancami zmanjšujejo in približujemo nastanku platoja. Tudi v primeru antioksidanta ZJ-176 je bil pri prvih treh koncentracijah antioksidanta padec bistveno večji, kot je bil pri naslednjih dveh. Če bi pomerili še točko ali dve več, in sicer pri višjih koncentracijah, bi dosegli plato.



**Slika 13.** Graf odvisnosti absorbanca od koncentracije za antioksidant ZJ-176 na mikrotitrski ploščici.

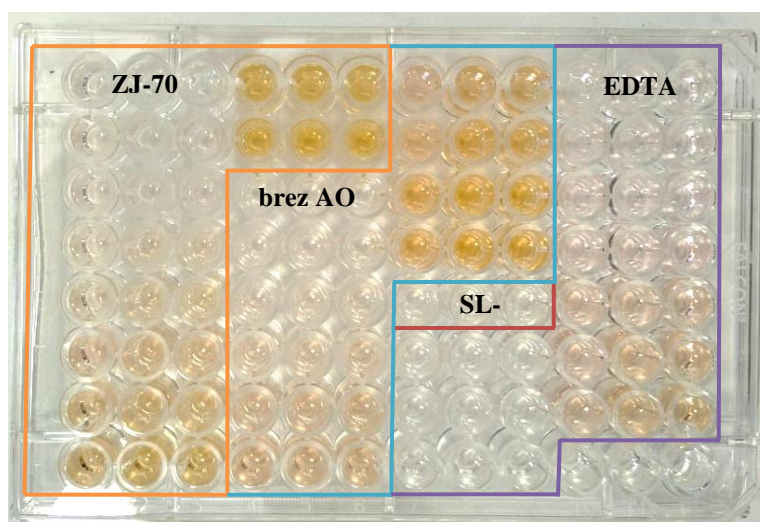
### 4.3 REZULTATI – PROTOKOL 2

V nadaljevanju so podani rezultati izmerjenih absorbancc vzorcev pripravljenih v mikroeprevetah in nato nanašenih na mikrotitrsko ploščico. Zraven so dodani tudi rezultati izmerjenih absorbancc vzorcev nanešenih direktno na mikrotitrsko ploščico. Rezultati so tabelarično urejeni glede na spojino, katere vpliv na vrednost absorbanca smo spremljali.

Vsako različno koncentracijo raztopine železovih ionov smo pomerili v triplikatih. Meritev za SL- smo prav tako izmerili v triplikatih. Pomerili smo 10 različnih koncentracij.

Dobljeni rezultati so bili znotraj merilnega območja aparata, in sicer med 0,1 in 1,0. V 1,5 mL mikropruvete smo nanesti reakcijsko mešanico z volumnom 1 mL. Maksimalen volumen vzorca, ki smo ga lahko nanesti v eno merilno vdolbinico na mikrotitrski ploščici, je znašal 300  $\mu\text{L}$ . Skupni volumen, ki smo ga nanesti v vdolbinico, je tako znašal 299,2  $\mu\text{L}$ .

Za vse dodane spojine smo iz pridobljenih podatkov najprej izračunali povprečno vrednost absorbanc za posamezno koncentracijo železovih ionov in izračunali standardno napako. Vrednosti, ki smo jih pridobili z uporabo enega ali drugega načina izvedbe metode, smo prikazali na skupnem grafu.



**Slika 14.** Primer končnega izgleda mikrotitrsko ploščice po izvedbi direktnega nanosa na mikrotitrsko ploščico po protokolu 2.

#### 4.3.1 Krivulja brez dodatka AO

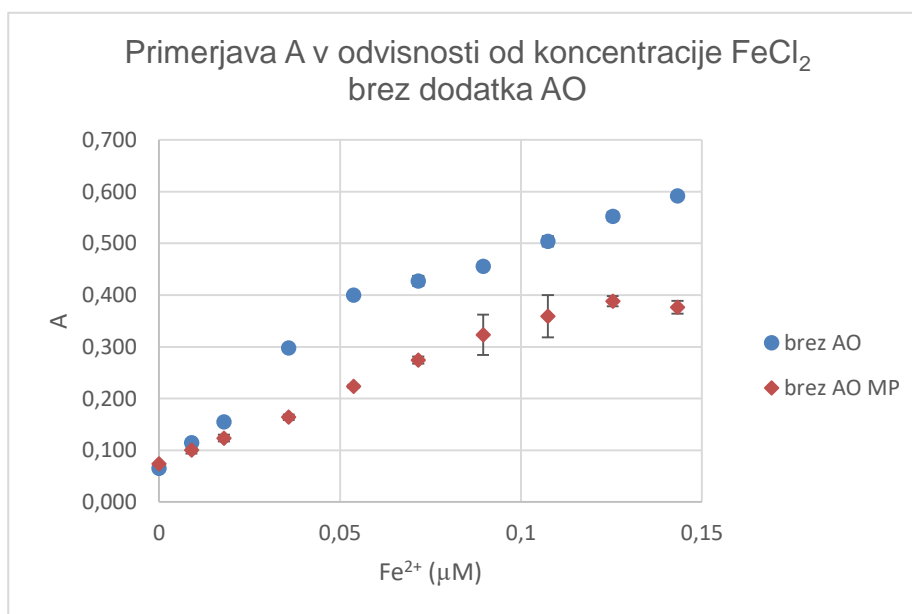
Predstavljeni so podatki (preglednica XIV), ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbance vzorcev z različnimi koncentracijami  $\text{FeCl}_2$ . V tem primeru nismo dodali nobene antioksidativne spojine, saj smo želeli ugotoviti, kakšen vpliv imajo različne koncentracije železovih ionov na vrednost absorbance.



**Preglednica XIV.** Prikaz odvisnosti absorbance od valovne dolžine za različne koncentracije  $FeCl_2$  brez dodatka antioksidanta (AO) izmerjene na mikrotitrski ploščici.

Brez AO	Koncentracija $FeCl_2$ ( $\mu M$ )	Povprečje A - MC	Povprečje A - MP
1A+, 1B+, 1C+	0,000	$0,065 \pm 0,001$	$0,074 \pm 0,001$
2A+, 2B+, 2C+	0,009	$0,115 \pm 0,004$	$0,100 \pm 0,006$
3A+, 3B+, 3C+	0,018	$0,155 \pm 0,004$	$0,124 \pm 0,006$
4A+, 4B+, 4C+	0,036	$0,298 \pm 0,003$	$0,164 \pm 0,005$
5A+, 5B+, 5C+	0,054	$0,400 \pm 0,005$	$0,224 \pm 0,003$
6A+, 6B+, 6C+	0,072	$0,427 \pm 0,012$	$0,274 \pm 0,007$
7A+, 7B+, 7C+	0,090	$0,456 \pm 0,009$	$0,323 \pm 0,039$
8A+, 8B+, 8C+	0,107	$0,504 \pm 0,012$	$0,359 \pm 0,041$
9A+, 9B+, 9C+	0,125	$0,552 \pm 0,010$	$0,388 \pm 0,010$
10A+, 10B+, 10C+	0,143	$0,592 \pm 0,002$	$0,376 \pm 0,012$

Spodnja slika 15 predstavlja primerjavo krivulj vrednosti absorbance (A) v odvisnosti od koncentracije  $FeCl_2$  brez dodatka antioksidanta (AO) po protokolu 2. V prvem primeru smo nanesli vzorce in reagente v mikroeprevete, kar predstavlja krivulja z oznako "brez AO". V drugem primeru pa smo vzorce in reagente nanesli direktno na mikrotitrsko ploščico, temu načinu ustreza krivulja z oznako "brez AO MP".



**Slika 15.** Primerjava krivulj vrednosti absorbancev odvisnosti od koncentracije  $FeCl_2$  brez dodatka AO – pripravljeno v mikroeprevetah (brez AO) in direktno nanešeno na mikrotitrsko ploščico (brez AO MP) po protokolu 2.

### 4.3.2 Antioksidant ZJ-70

Tabelarično so zbrani podatki, ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbance vzorcev z različnimi koncentracijami FeCl<sub>2</sub> in dodatkom antioksidativne spojine ZJ-70.

**Preglednica XV.** Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije FeCl<sub>2</sub> in ob dodatku antioksidanta ZJ-70 izmerjene na mikrotitrski ploščici.

ZJ-70	Koncentracija FeCl <sub>2</sub> (μM)	Povprečje A - MC	Povprečje A - MP
1A+, 1B+, 1C+	0	0,061 ± 0,000	0,080 ± 0,005
2A+, 2B+, 2C+	9	0,104 ± 0,001	0,149 ± 0,007
3A+, 3B+, 3C+	18	0,127 ± 0,001	0,168 ± 0,015
4A+, 4B+, 4C+	36	0,244 ± 0,005	0,154 ± 0,008
5A+, 5B+, 5C+	54	0,317 ± 0,004	0,174 ± 0,004
6A+, 6B+, 6C+	72	0,342 ± 0,010	0,228 ± 0,006
7A+, 7B+, 7C+	90	0,382 ± 0,004	0,242 ± 0,006
8A+, 8B+, 8C+	107	0,396 ± 0,001	0,268 ± 0,006
9A+, 9B+, 9C+	125	0,440 ± 0,006	0,312 ± 0,008
10A+, 10B+, 10C+	143	0,459 ± 0,003	0,350 ± 0,005

### 4.3.3 Antioksidant ZJ-176

Podatki, ki smo jih zbrali s spektrofotometričnim merjenjem absorbance vzorcev z različnimi koncentracijami FeCl<sub>2</sub> in dodatkom antioksidativne spojine ZJ-176, so predstavljeni v preglednici XVI.

**Preglednica XVI.** Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije FeCl<sub>2</sub> in dodatku antioksidanta ZJ-176 izmerjene na mikrotitrski ploščici.

ZJ-176	Koncentracija FeCl <sub>2</sub> (μM)	Povprečje A - MC	Povprečje A - MP
1A+, 1B+, 1C+	0	0,066 ± 0,000	0,057 ± 0,004
2A+, 2B+, 2C+	9	0,114 ± 0,001	0,082 ± 0,023
3A+, 3B+, 3C+	18	0,130 ± 0,000	0,092 ± 0,030
4A+, 4B+, 4C+	36	0,226 ± 0,004	0,169 ± 0,023
5A+, 5B+, 5C+	54	0,290 ± 0,001	0,229 ± 0,009
6A+, 6B+, 6C+	72	0,377 ± 0,009	0,251 ± 0,012
7A+, 7B+, 7C+	90	0,401 ± 0,003	0,277 ± 0,011
8A+, 8B+, 8C+	107	0,421 ± 0,001	0,308 ± 0,015
9A+, 9B+, 9C+	125	0,479 ± 0,001	0,322 ± 0,009

10A+, 10B+, 10C+	143	0,498 ± 0,013	0,315 ± 0,006
------------------	-----	---------------	---------------

#### 4.3.4 Antioksidant ZJ-167\_1

Zbrani so podatki, ki smo jih dobili s spektrofotometričnim merjenjem absorbance vzorcev z različnimi koncentracijami FeCl<sub>2</sub> in dodatkom antioksidativne spojine ZJ-167\_1 z nanosom v mikroevruvete (MC) ter z direktnim nanosom na mikrotitrsko ploščico (MP).

**Preglednica XVII.** Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije FeCl<sub>2</sub> in dodatku antioksidanta ZJ-167\_1 izmerjene na mikrotitrski ploščici.

ZJ-167_1	Koncentracija FeCl <sub>2</sub> (μM)	Povprečje A - MC	Povprečje A - MP
1A+, 1B+, 1C+	0	0,066 ± 0,001	0,056 ± 0,002
2A+, 2B+, 2C+	9	0,096 ± 0,001	0,066 ± 0,004
3A+, 3B+, 3C+	18	0,126 ± 0,001	0,080 ± 0,006
4A+, 4B+, 4C+	36	0,208 ± 0,007	0,133 ± 0,013
5A+, 5B+, 5C+	54	0,275 ± 0,001	0,162 ± 0,020
6A+, 6B+, 6C+	72	0,338 ± 0,001	0,202 ± 0,012
7A+, 7B+, 7C+	90	0,357 ± 0,005	0,216 ± 0,002
8A+, 8B+, 8C+	107	0,393 ± 0,001	0,232 ± 0,005
9A+, 9B+, 9C+	125	0,422 ± 0,002	0,262 ± 0,011
10A+, 10B+, 10C+	143	0,445 ± 0,008	0,283 ± 0,007

#### 4.3.5 EDTA

Poleg omenjenih AO smo se odločili testirati vpliv še EDTA, ki ima dvojno naravo delovanja – kot kelator, ki pospeši Fentonovo reakcijo ali kot AO, ki ragora s hidroksilnimi radikali. Podatke smo zbrali v preglednici XVIII.

**Preglednica XVIII.** Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije FeCl<sub>2</sub> in ob dodatku EDTA izmerjene na mikrotitrski ploščici.

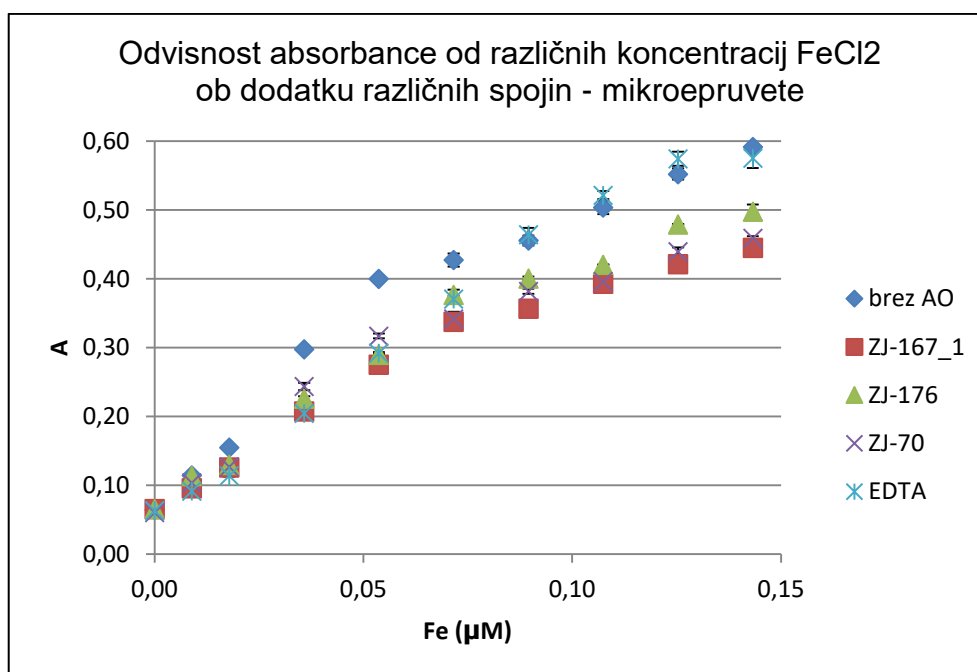
EDTA	Koncentracija FeCl <sub>2</sub> (μM)	Povprečje A - MC	Povprečje A - MP
1A+, 1B+, 1C+	0	0,064 ± 0,001	0,077 ± 0,002
2A+, 2B+, 2C+	9	0,092 ± 0,001	0,086 ± 0,003
3A+, 3B+, 3C+	18	0,114 ± 0,002	0,097 ± 0,003
4A+, 4B+, 4C+	36	0,205 ± 0,005	0,119 ± 0,022
5A+, 5B+, 5C+	54	0,292 ± 0,002	0,135 ± 0,013
6A+, 6B+, 6C+	72	0,371 ± 0,005	0,187 ± 0,013

7A+, 7B+, 7C+	90	$0,464 \pm 0,012$	$0,226 \pm 0,022$
8A+, 8B+, 8C+	107	$0,522 \pm 0,007$	$0,218 \pm 0,013$
9A+, 9B+, 9C+	125	$0,575 \pm 0,012$	$0,244 \pm 0,023$
10A+, 10B+, 10C+	143	$0,576 \pm 0,018$	$0,245 \pm 0,027$

#### 4.3.6 Primerjava rezultatov

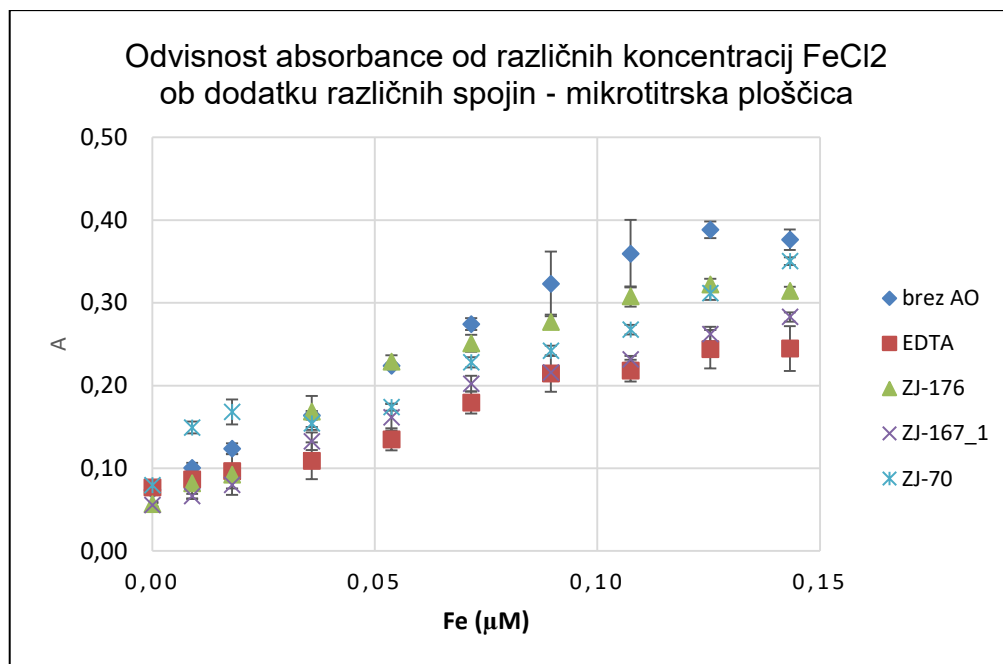
Vse pridobljene rezultate smo nanesli na en graf, odvisno od metode dela, ki smo jo uporabili. To smo naredili, da bi lahko med seboj primerjali antioksidativno sposobnost ZJ-176, ZJ-167\_7, ZJ-70 ter EDTA pri enakih koncentracijah redčin železovih ionov.

Najprej smo narisali graf, na katerem so bili rezultati izmerjenih absorbancc vzorcev pripravljenih v mikropruvetah in nato nanašenih na mikrotitrsko ploščico.



**Slika 16.** Odvisnost absorbancc od različnih koncentracij  $FeCl_2$  ob dodatku različnih spojin – reakcija je bila izvedena v mikropruvetah.

Ko pa smo vzorce nanesli direktno na mikrotitrsko ploščico ter pomerili absorbanco, smo dobili sledeč graf na sliki 18:

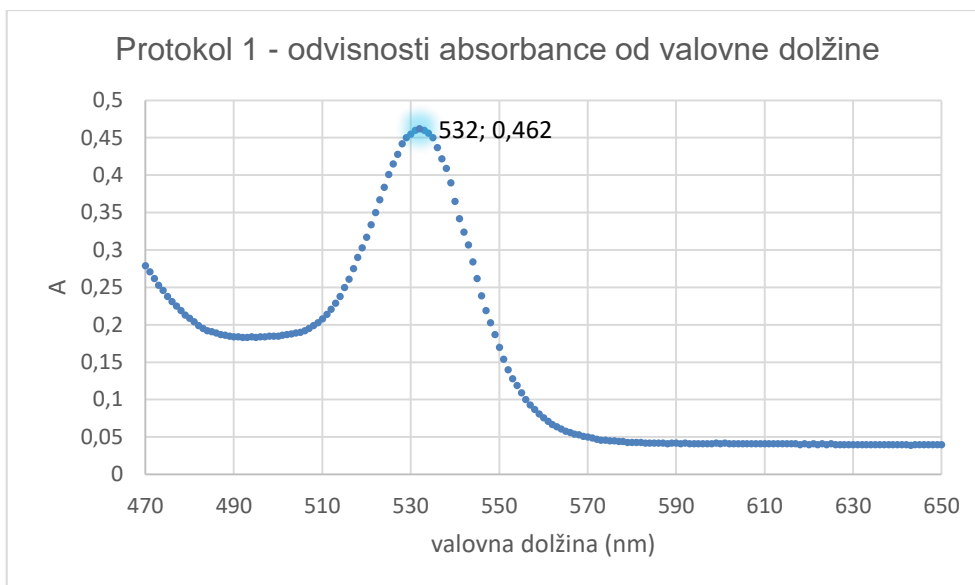


**Slika 17.** *Odvisnost absorbance od različnih koncentracij FeCl<sub>2</sub> ob dodatku različnih spojin - reakcija je bila izvedena direktno na mikrotitrski ploščici.*

#### 4.4 ABSORBCIJSKI MAKSIMUM

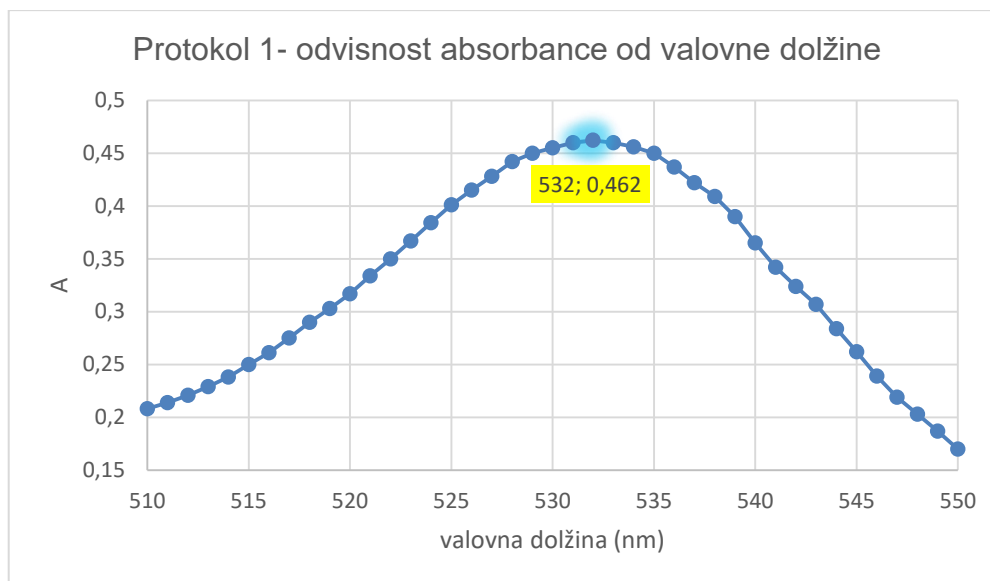
##### 4.4.1 Protokol 1 - rezultati merjenja absorpcijskega maksimuma

Na mikrotitrski ploščici smo z merjenjem absorbance v pozitivni kontroli, v našem primeru SL+, želeli preveriti ustreznost valovne dolžine, ki jo izbrana metoda predpostavlja. V ta namen smo posneli UV-vis spekter med valovnima dolžinama 470 nm in 650 nm. Posamezni intervali merjenja so se med seboj razlikovali za 1 nm. Podatke za vsako posamezno valovno dolžino in pripadajočo vrednost absorbance smo tabelarično zbrali ter izrisali graf. Graf predstavlja vrednost absorbance v odvisnosti od valovne dolžine.



**Slika 18.** Graf odvisnosti absorbance od valovne dolžine, izmerjena v SL+ na mikrotitrski ploščici (protokol 1).

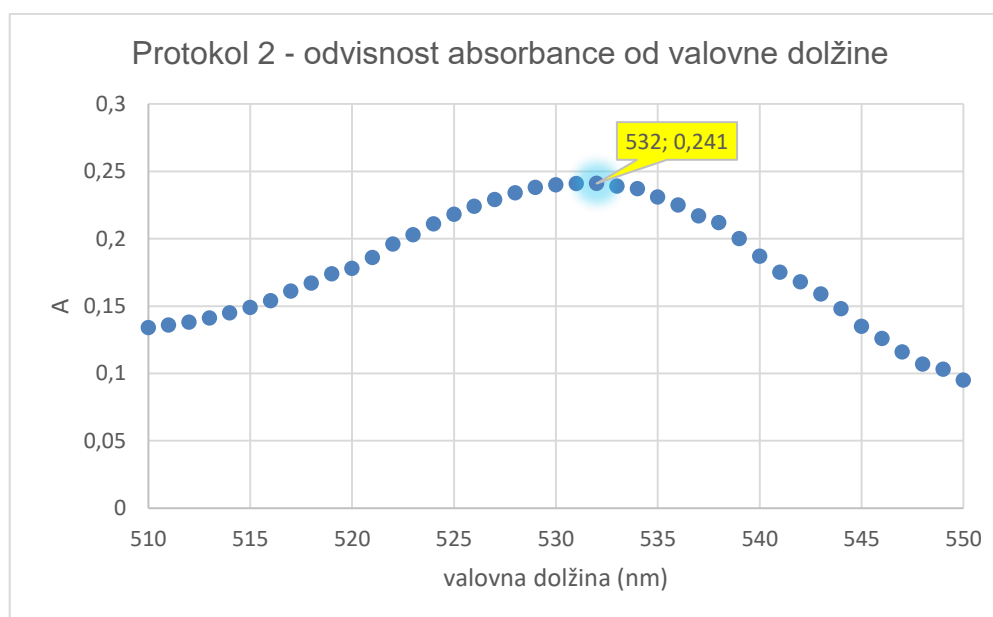
Za jasn prikaz točne vrednosti absorpcijskega maksimuma smo interval omejili na valovne dolžine med 510 nm in 550 nm. Ponovno smo izrisali graf odvisnosti vrednosti absorbance od valovne dolžine. Točka, ki je na spodnjem grafu obarvana z rumeno barvo, označuje točko, kjer je absorbanca največja. To je torej točka našega absorpcijskega maksimuma. Pod obarvano točko sta izpisani njeni koordinati, ki sta 532 nm in vrednost absorbance 0,462. S to meritvijo smo potrdili ustreznost valovne dolžine merjenje absorbanc vzorce, ki jo predvideva naša izbrana metoda.



**Slika 19.** Prikaz koordinat absorpcijskega maksimuma (protokol 1).

#### 4.4.2 Protokol 2 - rezultati merjenja absorpcijskega maksimuma

Tudi pri protokolu 2 smo želeli preveriti ustreznost valovne dolžine, ki jo izbrana metoda predpostavlja. V najintenzivnejše obarvani točki (redčina 10A+) smo posneli absorpcijski spekter, in sicer med valovnima dolžinama 510 nm ter 550 nm. Posamezni intervali merjenja so se med seboj razlikovali za 1 nm. Podatke za vsako posamezno valovno dolžino in pripadajočo vrednost absorbance smo tabelarično uredili in narisali graf vrednosti absorbance v odvisnosti od določene valovne dolžine.



**Slika 20.** Prikaz koordinat absorpcijskega maksimuma (protokol 2).

Potrdili smo, da je absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 532 nm, absorbanca v tej točki je bila najvišja in je znašala 0,241.

## 5.0 RAZPRAVA

Kot smo že omenili, je hidroksilni radikal najreaktivnejši predstavnik ROS in nastaja predvsem v prisotnosti železovih ali bakrovih ionov v tako imenovani Fentonovi reakciji, ki je potekla tudi v našem primeru. In ravno zaradi svoje močno reaktivne narave lahko  $\bullet\text{OH}$  v zvišanih koncentracijah v našem telesu povzroči različne anomalije in celične spremembe. Zato je antioksidativna obramba v našem telesu zelo pomemben faktor zaščite pred oksidativnim stresom.

Ker je ravno deoksiribozni test eden zanesljivejših in enostavnejših metod spremljanja reakcij hidroksilnih radikalov, smo ga uporabili v tej magistrski nalogi. Z njim smo ovrednotili, kolikšna je zaščitna sposobnost določenega izbranega antioksidanta. V nalogi smo preizkusili prenos metode deoksiriboznega testa na mikrotitrsko ploščici po dveh različnih protokolih, protokolu 1 in protokolu 2.

Pri protokolu 1 je do različnih koncentracij AO pri enakih redčinah prišlo, ker smo predpostavili enako maso AO, torej 2 mg, vendar pa se je njihova molekulska masa razlikovala, da molarne koncentracije niso bile enake. Ko pa smo meritve protokola 1 napravili po nanosu na mikrotitrsko ploščico, se je izkazalo, da rezultatov med seboj ne moramo primerjati – razlike v molarnih koncentracijah in razlike v vrednostih  $\text{SL}^+$ , so bile prevelike. Na podlagi tega ne moremo niti oceniti, kateri od antioksidantov ima največjo zaščitno sposobnost, kateri pa najmanjšo. Prav tako smo opazili, da je pri izvajanju metode na mikrotitrski ploščici prišlo do velikih variacij med vrednostmi absorbance za  $\text{SL}^+$ . Pričakovali smo, da si bodo te vrednosti med seboj zelo podobne, saj se je pri vseh  $\text{SL}^+$  pripravljala na enak način. Prenos metode po protokolu 1 tako ni uspel. S tem namenom smo se tudi poslužili izvedbe še drugega protokola (Protokol 2).

Pri protokolu 2 smo opazili, da so rezultati med seboj primerljivi in posamezne vrednosti zelo ponovljive. Odkloni od povprečne vrednosti so bili malenkost večji v primeru nanosa direktno na mikrotitrsko ploščico (MP), medtem ko je v večini primerov priprave reakcijske mešanice v mikroeprevetah in posledičnim nanosom na mikrotitrsko ploščico, je ta odklon bil skoraj nič. Pri nanosu vzorcev v mikroeprevete in nato na mikrotitrsko



ploščico je najboljšo antioksidativno sposobnost pokazal ZJ-167\_1, nato ZJ-70 ter kot zadnji ZJ-176, ki je imel tako najmanjšo zaščitno sposobnost. Krivulja z EDTA je imela sprva najnižje vrednosti absorbance, vendar so se nato vrednosti hitro zvišale. V redčinah z najvišjimi koncentracijami železovih ionov se je krivulja približala krivulji brez dodatka antioksidanta. Pri direktnem nanosu vzorcev na mikrotitrsko ploščico pa je največji odklon od krivulje brez dodatka antioksidanta izmed antioksidantov ZJ-176, ZJ-167\_1, ZJ-70 ter EDTA dosegla raztopina EDTA, sledil ji je ZJ-167\_1, nato ZJ-70 in kot zadnji ZJ-176. Iz tega lahko sklepamo na ponovljivost rezultatov med obema načinoma izvedbe metode deoksiriboznega testa. Pomembno je dodati, da za EDTA ne moremo trditi ali deluje kot antioksidant ali kot kelator železovih ionov, ki pospeši Fentonovo reakcijo. V obeh primerih pri majhnih koncentracijah železovih ionov ni bistvene razlike med zaščitno sposobnostjo katerega od omenjenih antioksidantov. Večje razlike se pokažejo šele pri večjih koncentracijah železovih ionov.

Pri uporabi protokola 1 in protokola 2 je v primeru nanosa vzorcev in reagentov direktno na mikrotitrsko ploščico izvajanje eksperimenta potekalo bistveno hitreje kot v primeru merjenja v kivetah. Temu je botrovalo dejstvo, da ni bilo vmesnega vorteksiranja ter odpiranja in zapiranja mikroepruvet, ki je bilo precej zamudno opravilo. Prav tako so bili porabljeni volumni vzorcev in drugih pripravljenih reagentov bistveno manjši. Na račun tega smo pričakovali manjše vrednosti absorbanc, kar se je kasneje tudi izkazalo za pravilno predpostavljajenje. Absorbance so bile nižje tudi zaradi tega, ker je iz vzorcev v vdolbinicah na mikrotitrski ploščici izparevala voda, kar se je videlo kot drobne kapljice na notranji strani pokrova, ki je pokrival mikrotitrsko ploščico. Zaradi visokih temperatur, ki so jim bili izpostavljeni vzorci pri drugi inkubaciji (90 °C) je iz vzorcev delno izparela voda in se kondenzirala na pokrovu. Zato smo tudi pri merjenju uporabili funkcijo korekcije merilne poti (*pathway correction*), da smo izničili razlike v volumnih vzorcev v posameznih vdolbinicah in poenotili dolžino poti žarka, ki je presvetlil vsako vdolbinico.

Ker so se vzorci počasi raztapljali, smo morali uporabiti ultrazvočno kadičko in jih sonicirati. Homogena raztopina antioksidantov je bila bistvena za doseg zanesljivih in primerljivih rezultatov.

Preverili smo tudi valovno dolžino merjenja absorbance, ki je navedena v protokolu ter je za oba protokola enaka, in sicer znaša 532 nm. Za oba protokola smo posneli absorpcijski

spekter na mikrotitrski ploščici. V obeh primerih smo potrdili, da je bil absorpcijski maksimum izmerjen pri valovni dolžini 532 nm.

Če med seboj primerjamo izvedbi po protokolu 1 in protokolu 2, lahko vidimo, da je modificirana izvedba testa bistveno enostavnejša, hitreje izvedljiva, uporabljenih je tudi manj reagentov kot pri klasični izvedbi. Pri protokolu 1 je bilo potrebnih 9 korakov za celotno izvedbo eksperimenta (PBS, 2-DR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EDTA, FeCl<sub>3</sub>, askorbinska kislina, AO, TBA, TCA), medtem ko je bilo pri protokolu 2 teh mnogo manj. Potrebni je bilo namreč le 6 korakov (2-DR, PBS, AO, FeCl<sub>2</sub>, TBA, TCA). Zaradi manjšega števila predpisanih reagentov smo pri protokolu 2 porabili manj časa za pripravo vzorcev in raztopin ter nato pridobili na času še pri nanosu le teh na mikrotitrsko ploščico. Njihovi volumni so bili manjši kot pri protokolu 1. Rezultati meritev izvedeni po protokolu 2 so med seboj primerljivi, rezultati meritev izvedeni po protokolu 1 pa niso.

## 6.0 SKLEP

V nalogi smo izvedli prenos metode deoksiriboznega testa iz mikroepruvet na mikrotitrsko ploščico po dve različnih protokolih, protokolu 1 in protokolu 2.

Pri protokolu 1 rezultatov merjenja absorbance v kivetah in na mikrotitrski ploščici med seboj ne moremo primerjati primerjati – razlike v molarnih koncentracijah, razlike v vrednostih SL+, so bile prevelike. Ne moremo ovrednotiti uspešnosti prenosa metode, prav tako ne moremo narediti ocene zaščitne sposobnosti izbranih antioksidantov.

Pri obeh protokolih je v primeru nanosa vzorcev in reagentov direktno na mikrotitrsko ploščico izvajanje eksperimenta potekalo bistveno hitreje, kot v primeru priprave vzorcev v mikroepruvetah. Uporabljeni volumni vzorcev in drugih pripravljenih reagentov so bistveno manjši.

Pri uporabi protokolu 2 je najboljšo antioksidativno sposobnost pokazal antioksidant ZJ-167\_1, nato ZJ-70 in kot zadnji ZJ-176. Antioksidanti so navedeni v vrstnem redu s padajočo zaščitno sposobnostjo.

Pri majhnih koncentracijah železovih ionov ni bistvene razlike med zaščitno sposobnostjo katerega od omenjenih antioksidantov.

Za EDTA ne moremo trditi, ali deluje kot antioksidant ali kot kelator železovih ionov, ki pospeši Fentonovo reakcijo.

Prenos metode deoksiriboznega testa z uporabo protokola 1 na mikrotitrsko ploščico ni smiseln, ker rezultati med seboj niso primerljivi, protokol predpisuje veliko število reagentov, zaradi česar je zamudnejši kot protokol 2.

Prenos metode deoksiriboznega testa z uporabo protokola 2 na mikrotitrsko ploščico je smiseln, saj prihranimo pri reagentih in skrajšamo čas izvedbe.

## 7.0 LITERATURA

- 1) Pečar S, Mravljak J. Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko Farmacevtsko Društvo 2015.
- 2) Osredkar J. Oksidativni stres. Pregledni članek. Zdravstveni vestnik 2012; 81: 393-406.
- 3) Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 884: 19-40. (Dostop: 26.09.2017)
- 4) Dimroth P, Kaim G, Matthey U. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *J Exp Biol* 2000; 203, 51–9.
- 5) Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* 2014; 94, 909–950.
- 6) Carsky P, Zahradnik R. Radicals: their molecular orbitals, properties, and reactivity. *Acc Chem Res* 1976; 9, 407–411.
- 7) Betteridge DJ. What is oxidative stress?. *Metabolism* 2000; 49: 3-8.
- 8) Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12: 1116 – 208.
- 9) Pittman RN. Regulation of Tissue Oxygenation, Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael: 2011.
- 10) Shiibashi T, Iida T. NADPH and NADH serve as electron donor for the superoxide-generating enzyme in tilapia (*Oreochromis niloticus*) neutrophils. *Dev Comp Immunol* 2001; 25: 461-465.
- 11) Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ* 2012; 5: 9–19.
- 12) Eric E. Kelley EE, Khoo NKH, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen Peroxide is the Major Oxidant Product of Xanthine Oxidase. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 493–498.
- 13) Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 8-18.
- 14) Greenwald RA. Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 20: 219-40.

- 15) Ighodaroab OM, Akinloyeb A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine 2017. Članek v tisku.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506817301550>  
(Dostop: 19.7.2018)
- 16) Orrell RW, Habgood JJ, Malaspina A, Mitchell J, Greenwood J, Lane RJ, deBelleruche JS. Clinical characteristics of SOD1 gene mutations in UK families with ALS. J Neurol Sci 1999; 169, 56-60.
- 17) Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal Biochem 1987; 165, 215-9.
- 18) Aruoma OI. Deoxzribose Assay for Detecting Hydroxyl Radicals. Methods in enzymology 1994; 233, 57-66.
- 19) Li X, Mai W, Wang L, Han W. A hydroxyl-scavenging assay based on DNA damage in vitro. Analytical Biochemistry 2013; 438, 29-31.
- 20) Sadowska-Bartosz I, Galiniak S, Bartosz G. Modification of the deoxyribose test to detect strong iron binding. ACTA ABP Biochimica Polonica 2016; 63, 1-4.
- 21) Literatura za Cary 50 Conc:  
[http://www.hellma-analytics.com/html/seiten/output\\_adb\\_file.php?id=25823](http://www.hellma-analytics.com/html/seiten/output_adb_file.php?id=25823)  
(Dostop: 30.08.2017)  
<https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Cary%2050%20UV-Vis-brochure.pdf>  
(Dostop: 19.08.2018)
- 22) Literatura za Sinergy HT:  
[https://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/127/synergyhtposter.pdf](https://www.biotek.com/assets/tech_resources/127/synergyhtposter.pdf)  
(Dostop: 16.08.2018)