

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KSENIJA DVORŠAK

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2013

Univerza v Ljubljani



Fakulteta za farmacijo

KSENIJA DVORŠAK

**SUPEROKSID DISMUTAZNA AKTIVNOST STABILNIH
NITROKSIDNIH RADIKALOV**

**SUPEROXIDE DISMUTASE LIKE ACTIVITIES OF STABLE
NITROXIDE FREE RADICALS**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2013

Magistrsko naložko sem opravila v laboratoriju Katedre za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo, pod vodstvom mentorja doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

ZAHVALA

"Uspeh pride takrat, ko se zavemo, da so vse ovire samo izzivi,

ki nam pomagajo postati boljši."

(Stephen Covey)

Zahvaljujem se mentorju, doc. dr. Janezu Mravljaku za izkazano pomoč in nesebične nasvete pri izdelavi magistrske naloge ter za pomoč v laboratoriju.

Hvala družini za podporo pri moji študijski poti, prijateljem za vse vzpodbudne besede, Urbanu Gradišarju za vse lekcije iz računalništva ter pomoč pri nastanku magistrske naloge.

Rada bi se zahvalila tudi sodelavkam v Laboratoriju za klinično biokemijo in hematologijo Klinike Golnik, ki so tekom mojega študija pokazale veliko dobre volje pri menjavah službenih obveznosti.

Hvala tudi vsem, ki niste bili posebej omenjeni, pa ste mi kakorkoli pomagali pri izdelovanju naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložno z naslovom, Superoksid dismutazna aktivnost stabilnih nitroksidnih radikalov, samostojno izdelala, pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Podpis:

Ljubljana, 2013

Predsednik komisije: prof. dr. Janja Marc

Mentor: doc. dr. Janez Mravljak

Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak

KAZALO

POVZETEK	III
ABSTRAKT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
SEZNAM SLIK	VI
SEZNAM PREGLEDNIC	VI
SEZNAM SHEM	VI
SEZNAM GRAFOV	VI
1 UVOD	1
1.1 OKSIDATIVNI STRES	1
1.1.1 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI	1
1.1.2 REAKTIVNE DUŠIKOVE ZVRSTI	3
1.1.3 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM	4
1.2 SUPEROKSID DISMUTAZA	5
1.2.1 VLOGA SOD	6
1.2.2 OSNOVNE ZNAČILNOSTI SOD	7
1.3 SOD MIMETIKI	10
1.3.1 NITROKSIDI ali STABILNI NITROKSIDNI RADIKALI	10
1.3.2 METODE DOLOČANJA RADIKALOV	18
1.3.3 UPORABNOST NITROKSIDOV	22
2 NAMEN DELA	24
3 EKSPERIMENTALNO DELO	25
3.1 VZORCI	25
3.2 TEST DOLOČANJA MIMETIČNE AKTIVNOSTI STABILNIH NITROKSIDNIH RADIKALOV	29
3.2.1 SISTEMSKE TEKOČINE IN REAGENTI	29
3.2.2 MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATURE	33
3.2.3 METODA DELA	35
3.2.4 MERITVE	38
3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	39
3.3.1 LINEARNA REGRESIJA	40
3.3.2 KOEFICIENT DETERMINACIJE	40

3.3.3	STANDARDNA NAPAKA PREDVIDENIH VREDNOSTI Y ZA VSAK X V REGRESIJI.....	40
4	REZULTATI	42
4.1	VREDNOSTI SLEPEGA VZORCA.....	42
4.2	SOD-MIMETIČNA AKTIVNOST TESTIRANIH SPOJIN.....	42
4.2.1	PRIMER DOLOČITVE VREDNOSTI I_{50}	44
5	RAZPRAVA.....	46
6	SKLEP	52
7	LITERATURA	53

POVZETEK

O oksidativnem stresu govorimo, kadar je prooksidativna obremenitev v celici večja kot antioksidativna zaščita. Pri tem nastajajo radikali in reaktivni intermediati (reaktivne kisikove in dušikove spojine – RONS), ki sprožijo bolezenski proces. Ta je največkrat posledica nekontrolirane in prekomerne tvorbe superoksidnega radikala $O_2^{\cdot-}$. Organizem je v omejenem obsegu na to pripravljen. Ima antioksidativni obrambni sistem encimov - antioksidantov ter endogenih neencimskih antioksidantov, ki so sposobni pretvorbe $O_2^{\cdot-}$ v manj nevarne kemijske zvrsti. Superoksid dismutaza je encim, ki katalizira reakcijo pretvorbe $O_2^{\cdot-}$ v vodikov peroksid in kisik. Za delovanje potrebuje kofaktor, t.j. kovinski ion. Številne raziskave so pokazale, da imajo superoksid dismutaze antioksidativne lastnosti in lahko varujejo celice pred poškodbami. Uporaba samega encima v terapevtske namene zaradi njegovih lastnosti (imunske reakcije, velikost, naboj itd.) ni bila primerna, zato je razvoj stekel v smeri razvoja SOD mimetikov, ki oponašajo delovanje nativnega encima. SOD mimetiki za razstrupljanje superoksidnega radikala oponašajo reakcijo dismutacije, enako kot encim SOD. Uvrščamo jih med umetne encime, ker so nadomestek nativnega encima. Delimo jih na selektivne in neselektivne katalitične antioksidante. V skupino neselektivnih katalitičnih antioksidantov sodijo tudi nitroksidi. Ciklični nitroksidi oz. hidroksilamini (reducirana oblika) so skupina stabilnih nizkomolekulskih radikalov z antioksidativnimi lastnostmi, ki lahko prehajajo celično membrano. Odstranjujejo lahko tako $O_2^{\cdot-}$ kot tudi H_2O_2 , lipidne perokside in peroksinitritni anion.

V okviru naloge smo želeli ugotoviti, kateri izmed stabilnih nitroksidnih radikalov, bi lahko kataliziral reakcijo pretvorbe $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 in O_2 tako kot nativni encim SOD in bil primeren za uporabo kot SOD mimetik. Uporabili smo indirektno metodo po Fridovich-u. S pomočjo spektrofotometra smo izmerili hitrost porasta absorbance pri valovni dolžini 550 nm v odvisnosti od časa ($\Delta A/\Delta t$) in določili koncentracijo SOD mimetika, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% (I_{50}). Rezultate meritev smo vnesli v graf in narisali umeritveno premico, s pomočjo katere smo določili I_{50} vzorca, ki smo ga testirali kot SOD mimetik. Za vsak nitroksid smo izračunali katalitično konstanto. Vsi vzorci so izkazovali SOD mimetično aktivnost. Koncentracija, potrebna za pretvorbo $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 in O_2 , je bila pri vseh testiranih nitroksidih večja kot pri Mn-SALEN-u, ki je dobro poznan SOD mimetik. Nekatere spojine bi vendarle lahko uporabili kot potencialne neencimske SOD mimetike.

ABSTRACT

The oxidative stress occurs when the prooxidative processes in the cell are greater than antioxidant protection. During this process, free radicals and reactive intermediates (reactive oxygen and nitrogen compounds - RONS) are formed which trigger the disease process. This is mainly due to uncontrolled and excessive formation of superoxide radicals $O_2^{\cdot-}$. The organism is ready for this to some extent. It has antioxidative defense system consisting of enzymes – antioxidants and endogenous non-enzymatic antioxidants, which are capable of converting $O_2^{\cdot-}$ to less hazardous chemical compounds. Superoxide dismutase is an enzyme that catalyzes the conversion reaction of $O_2^{\cdot-}$ to hydrogen peroxide and oxygen. It needs a cofactor (i.e. metal ion) for the operation. Numerous studies have shown that superoxide dismutases have antioxidative properties and may protect cells from damage. The use of an enzyme for therapeutic purposes was not suitable, because of its properties (immune reactions, size, charge, etc.), therefore, the development led towards SOD mimetics that mimic the function of native enzyme. SOD mimetics, same as enzyme SOD, mimic reaction of dismutation to detoxify superoxide radicals. SOD mimetics are classified as synthetic enzymes, because they can be used as a replacement for native enzyme. They are divided into selective and non-selective catalytic antioxidants. The group of non-selective catalytic antioxidants include nitroxides. Cyclic nitroxides or hydroxylamines (reduced form) are a group of low molecular stable radicals. They have antioxidant properties and may pass the cell membrane. They can remove $O_2^{\cdot-}$ as well as H_2O_2 , lipid peroxides and peroxinitrite anion.

In the context of the research was to determine which of the stable nitroxide radicals could catalyse the conversion reaction of $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 and O_2 as well as the native enzyme SOD, and was suitable for use as a SOD mimetic. We used the indirect method by Fridovich. Using a spectrophotometer the speed of the increase in absorbance at a wavelength of 550 nm as a function of time ($\Delta A/\Delta t$) was measured. The concentration of the SOD mimetic was determined, which is required to reduce the speed of reduction of cytochrome c by 50% (I_{50}). The results of measurements were entered into the graph and a calibration line was drawn by which we determined the I_{50} of the sample, which was tested as an SOD mimetic. For each nitroxid catalytic constant was calculated. All samples showed SOD mimetic activity. The concentration, needed for the conversion of $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 and O_2 was greater than that of Mn-SALEN that is well known SOD mimetic. However, some of the compounds may be used as a potential non-enzymatic SOD mimetics.

SEZNAM OKRAJŠAV

CAT – katalaza

DNK – deoksiribonukleinska kislina

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

I₅₀ – koncentracija SOD mimetika, pri kateri se hitrost redukcije citokroma c zmanjša za 50%

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

OS – oksidativni stres

R² – koeficient determinacije

RNS – reaktivne dušikove zvrsti ali reaktivni dušikovi intermediati

RONS – reaktivne kisikove in dušikove spojine

ROS – reaktivne kisikove zvrsti ali reaktivni kisikovi intermediati

SN – standardna napaka predvidenih vrednosti y za vsak x v regresiji

SOD – superoksid dismutaza

SOR [O₂^{•-}] – superoksidni aniona oz. superoksidni radikal

pKa – disociacijska konstanta kisline

V_c – zmanjšana hitrost redukcije citokroma c

V₀ – hitrost redukcije za slepi vzorec

SEZNAM SLIK

Slika 1: A) Splošne strukture nitroksidov; B) Oksidativna stanja tempola; C) Oksidacija in redukcija nitroksidnega radikala	11
Slika 2: Razlika v intenziteti prepuščene svetlobe	21
Slika 3: Hipoksantin, ksantin, sečna kislina.....	32
Slika 4: Struktura citokroma c	33
Slika 5: UV/VIS spektrofotometer Varian 50 Conc.....	35
Slika 6: Shema enožarkovnega spektrofotometra	35
Slika 7: Redčenje osnovne raztopine.....	36
Slika 8: Recitve vzorcev	37
Slika 9: Vis spektri citokroma c	38
Slika 10: Odčitanje molarne koncentracije SOD mimetika	39

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica 1: Osnovne značilnosti SOD	8
Preglednica 2: Prikaz analiziranih spojin	25
Preglednica 3: Koncentracije in meritve V_c in V_0 za pripravo umeritvene krivulje.....	38
Preglednica 4: Vrednost V_0 pri različnih koncentracijah encima ksantin oksidaze	42
Preglednica 5: SOD mimetična aktivnost testiranih spojin izražena kot I_{50}	42
Preglednica 6: Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c pri različnih koncentracijah spojine.	44

SEZNAM SHEM

Shema 1: Razstrupljanje superoksidnega radikala in nastanek reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin – RONS	4
Shema 2: Reakcije dismutacije, ki jo katalizira SOD.....	6
Shema 3: Lastnosti nitroksidov	17
Shema 4: Tvorba superoksidov in redukcija citokroma c s superoksidom v Fridovich-evem testu.....	19
Shema 5: Oksidacija nitroksida in redukcija oksoamonijskega kationa do nitroksida	50

SEZNAM GRAFOV

Graf 1: Graf koncentracij, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50%, z upoštevanjem SN	43
Graf 2: Katalitične konstante vzorcev	44
Graf 3: Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% (I_{50})	45

1 UVOD

1.1 OKSIDATIVNI STRES

O oksidativnem stresu (OS) govorimo, kadar je prooksidativna obremenitev v celici večja kot antioksidativna zaščita. Pri tem nastajajo radikali in reaktivni intermediati (reaktivne kisikove in dušikove spojine – RONS), ki prispevajo k sproženju bolezenskega procesa ali pa so posledica tega. To lahko privede do sprememb v strukturi biološke membrane, do poškodb proteinov, poškodb dednega materiala v jedru ali mitohondriju (rak). Reaktivne zvrsti lahko v telesu nastanejo iz treh različnih virov: energetskega (celično dihanje), reaktivnega (oksidativni izbruh kot del obrambe imunskega sistema) in metabolnega (metabolizem telesu lastnih spojin in ksenobiotikov). (6)

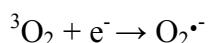
1.1.1 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI

V nastanek radikalov v organizmu je pogosto vključen kisik. **ROS (reaktivne kisikove zvrsti ali reaktivni kisikovi intermediati)** so vse radikalske (hidroksil $[HO\cdot]$, superoksidni anion $[O_2\cdot^-]$, hidroperoksil $[HOO\cdot]$, alkoksil $[RO\cdot]$, peroksil $[ROO\cdot]$, tripletni kisik $[^3O_2]$, karbonil $[CO_3\cdot^-]$, ogljikov dioksid $[CO_2\cdot^-]$) in neradikalske spojine kisika (ozon $[O_3]$, singlentni kisik $[^1O_2]$, vodikov peroksid $[H_2O_2]$, hipoklorna kislina $[HOCl]$, hipobromna kislina $[HOBr]$, organski peroksiidi $[ROOH]$, peroksinitrit $[ONOO\cdot^-]$, nitrozoperoksikarbonat $[ONOOCO_2\cdot^-]$), ki se pojavljajo v našem telesu. (3) Sam začetek procesa je največkrat posledica nekontrolirane in prekomerne tvorbe superoksidnega aniona oz. superoksidnega radikala (SOR) - $[O_2\cdot^-]$.

1.1.1.1 SUPEROKSIDNI ANION

Superoksidni anion je prva reaktivna kisikova zvrst ki nastane pri redukciji kisika do vode:

1. stopnja (nastanek superokksida):



Molekula kisika je v osnovnem stanju triplet $[^3O_2]$ – najnižje energetsko stanje. Na zunanjih π razvezni orbitali ima dva nesparjena elektrona (biradikal) z enako usmerjenima spinoma (paramagnetna lastnost, ki naredi molekulo kisika reaktivnejšo). (40) Tak kisik zelo počasi reagira z organskimi spojinami, izredno hitro pa z radikali. Singletne molekule pa imajo v

svojih orbitalah elektrone po parih, spini elektronov so v nasprotni smeri, kar ne povzroči magnetnega momenta, energija orbital je tako nižja. Singletni kisik [$^1\text{O}_2$] zato zlahka reagira z večino organskih spojin in jih oksidira. Stanje, kjer sta elektrona v paru je v primeru singletnega kisika energetsko bogatejše. (21)

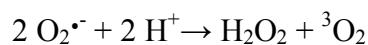
Superoksidni anion je prva stopnja redukcije kisika in stalno nastaja pri avtooksidaciji hemoglobina in v procesu celičnega dihanja. Je zmerni reducent in šibak oksidant. Je tudi nukleofil, zato lahko povzroča hidrolize estrov in amidov. Povzroča poškodbe aminokislin, s tem pa tudi izgubo funkcije proteina, saj lahko reagira s proteini, ki imajo prostetične skupine s prehodnimi kovinami, inaktivira encime, oksidira askorbat, NADPH, reagira z NO^\bullet , itd. Je relativno nestabilen, z razpolovno dobo nekaj milisekund, zaradi naboja težko prehaja skozi membrano. Je baza, ki lahko prehaja v kislino ter ni sposoben odtegniti vodikov atom neki drugi molekuli (reakcija tipa R1). (27)

2. stopnja (reakcija protonacije superokksida v kislem in nastanje H_2O_2 (odstranjevanje)):



Kljub temu, da je superoksidni anion radikal, ni posebno nevaren, saj ne reagira z DNK, proteini in lipidi. Je vir vodikovega peroksida in reducent ionov prehodnih kovin. Sam ne sproži lipidne peroksidacije. Hidroperoksilni radikal [HOO^\bullet], ki nastane, je reaktivna protonirana oblika superokksida. (7) Je močnejši oksidant kot superoksid in lahko sproži lipidno peroksidacijo. (19) Je brez naboja, zato lahko prehaja skozi membrano. Hidroperoksil lahko reagira po R1 in povzroča nastanek novih radikalov. Ravnotežje v zgornji reakciji je pomaknjeno v levo. Poveča se oksidacijska obremenitev. Nastali radikali lahko nenadzorovano oksidirajo svojo okolico (gradnike celic), kar vodi do porušenega ravnotežja med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno obrambo. V takem primeru govorimo o oksidacijskem stresu. (6)

Reakcija disproporcionacije oz. dismutacije (ta reakcija poteka pri višjih koncentracijah superokksida (40)) je lahko spontana ali encimsko katalizirana.



V organizmu (ali celici) je ta reakcija encimsko katalizirana z encimom superoksid dismutaza (SOD). Ni naključje, da je to encim, ki najhitreje opravlja svoje delo. Superoksid pretvarja v vodikov peroksid in kisik. (2) Vodikov peroksid je nevtralna spojina in kot taka lahko difundira po celici. Je šibak oksidant, močnejši v alkalnem kot v kislem. V odsotnosti $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^+$ ne poškoduje DNK, lipidov in polisaharidov niti v mM koncentracijah, v njihovi prisotnosti pa je toksičen že pri $10 - 100 \mu\text{M}$ za večino organizmov. (10)

3. stopnja (odstranjevanje vodikovega peroksida in njegove reakcije)



Tudi ta reakcija je encimsko katalizirana. Vodikov peroksid v celici je substrat za katalaze, ki ga pretvarjajo v vodo in kisik. Nastane voda in tripletni kisik. (10)

1.1.2 REAKTIVNE DUŠIKOVE ZVRSTI

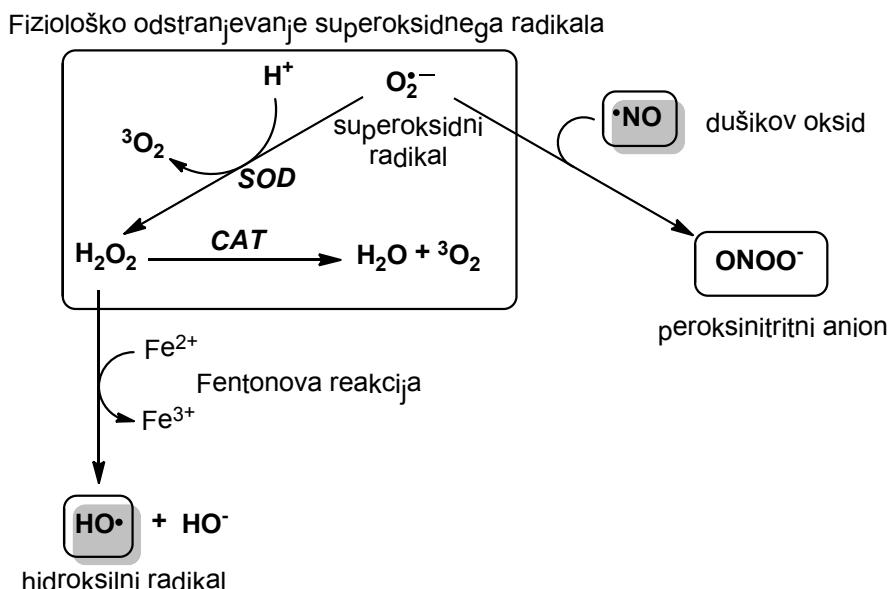
Reaktivne kisikove spojine pa niso edine reaktivne spojine v organizmu. Poznamo še številne druge (reaktivne ogljikove zvrsti, reaktivne žveplove zvrsti, reaktivne klorove zvrsti), najpomembnejše poleg ROS pa so **RNS (reaktivne dušikove zvrsti ali reaktivni dušikovi intermediati)**. To so radikalske (dušikov oksid $[\text{NO}\cdot]$, dušikov dioksid $[\text{NO}_2\cdot]$) ter neradikalske spojine dušika (peroksinitrit $[\text{ONOO}^-]$, alkil peroksinitrit $[\text{ROONO}]$, nitril klorid $[\text{NO}_2\text{Cl}]$, N_2O_3 in N_2O_4 , dušikova(III) kislina $[\text{HNO}_2]$, nitrozoperoksičarbonat $[\text{ONOOCO}_2^-]$ in produkti pretvorb NO^\cdot : nitrozilni (nitrozonijev) kation $[\text{NO}^+]$, nitroksilni anion $[\text{NO}^-]$, nitrit $[\text{NO}_2^-]$).

V reakciji z dušikovim oksidom tvori superoksidni anion peroksinitrit, ki inaktivira mitohondrijsko dihalno verigo. V fizioloških pogojih so mitohondriji glavno mesto nastanka superoksidnih anionov. Druga večja mesta nastanka so NADPH oksidazni encimatski sistem v nevtrofilcih, monocitih in makrofagih ter citokrom P450, monoamin oksidaza in lipooksigenaza. Superoksidni anion se tvori tudi v molibden hidroksilaznih reakcijah in v metabolizmu arahidonske kisline ter zaradi metabolnih motenj in izpostavitve toksinom. (7, 17)

1.1.3 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM

Organizem je v omejenem obsegu na to pripravljen. Ima antioksidativni obrambni sistem encimov - antioksidantov (SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, GPx – glutation peroksidaza) ter endogenih neencimskih antioksidantov (GSH – glutation, bilirubin), ki so sposobni pretvorbe superoksidnega radikala v manj nevarne kemijske zvrsti. Tako se superoksidni radikal v seriji dveh zaporednih reakcij, ki ju katalizirata superoksid dismutaza (SOD) in katalaza, pretvori do vode in kisika. V primeru prekomernega nastajanja ROS pa se omenjena obramba zasiti; nastajati začnejo drugi reaktivni radikali in intermediati (npr.: hidroksilni radikal in peroksinitritni anion), ki toksično delujejo na celico. (shema 1) (4) Viri reaktivnih zvrsti pa so lahko tudi eksogenega izvora: ionizirajoče sevanje, ultraviolično sevanje, ultrazvok, kemikalije, tobačni dim itd.

Shema 1: Razstrupljanje superoksidnega radikala in nastanek reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin – RONS (1)



Pogosto je OS spremljevalni učinek bolezni (npr. pri hipertenziji, infekcijah, vnetju) ali posebnega stanja (npr. menopavza) in preneha, ko je bolezen ozdravljen ali pod kontrolo.

Antioksidant je vsaka snov, ki že v zelo nizki koncentraciji inhibira oksidacijo drugih snovi v celici, prepreči nastajanje radikalov in s tem pripomore k preprečevanju razvoja in zaviranju patoloških procesov. Je snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule. (3) Poznamo tri mehanizme delovanja antioksidantov. Preventivni antioksidanti vežejo nase ione kovin prehoda (najpomembnejša sta železo in baker). S tem preprečijo njihovo interakcijo z vodikovim peroksidom in superoksidnim radikalom, ki vodi do nastanka

nevarnih hidroksilnih radikalov. V to skupino uvrščamo železo-vezajoči protein transferin in proteine, ki vežjo baker, kot sta ceruloplazmin in albumin. V drugi skupini so encimski antioksidanti, ki se nahajajo v celicah: superoksid dismutaza (SOD), ki odstranjuje hiperoksidne radikale; glutation peroksidaza (GPx), ki odstranjuje vodikov peroksid in lipidne hidroperokside; ter katalaza (KAT), ki odstranjuje vodikov peroksid. Ti encimi katalizirajo pretvorbo radikalov in RONS v manj reaktivne produkte. V tretjo skupino uvrščamo »žrtvene« (sacrificial) antioksidante. To so donorji vodikovih atomov ali elektronov, ki reagirajo z radikali, preden le-ti reagirajo z drugimi molekulami (oddajo vodik alkilperoksilnemu radikalu). Tak antioksidant se oksidira v relativno stabilen in nereaktivnen radikal, ki se bodisi regenerira ali pa izloči iz organizma. V tej skupini je veliko predstavnikov; npr. vitamin C, vitamin E, ubikinol Q₁₀, različni betakaroteni, bilirubin, tiolne spojine, organske kisline, flavoni, polifenoli itd. (1)

1.2 SUPEROKSID DISMUTAZA

Superoksid dismutaza je encim. Prisotna je v vseh celicah. Skupaj s hidroksiperoksidazami (katalaza in glutationska peroksidaza), s katerimi je funkcijsko sklopljena, tvori skupino encimskih antioksidantov iz družine metaloproteinov. Njena naloga je, da katalizira disproporcionacijo superoksidnega aniona na vodikov peroksid in kisik. Za delovanje potrebuje kofaktor, t.j. kovinski ion. Glede na prisoten ion kovine prehoda (Fe, Zn, Cu, Mn) v aktivnem mestu razlikujemo različne tipe SOD encimov: Cu/Zn-SOD (SOD 1), Mn-SOD (SOD 2), EC-SOD [CuZn] (SOD 3), EC Mn-SOD, Fe-SOD (samo pri prokariontih) in Ni-SOD (samo pri prokariontih). (2)

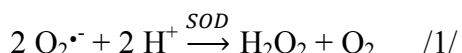
Številne raziskave so pokazale, da imajo superoksid dismutaze antioksidativne lastnosti in lahko varujejo celice pred poškodbami DNK, škodljivimi učinki ionizirajočega sevanja ter poškodbami lipidov in beljakovin. Po drugi strani pa številne študije poročajo o padcu aktivnosti superoksid dismutaze v času bolezni (rak, astma, zavrnitev po presaditvi organov itd.) ter med staranjem. Natančen mehanizem, ki privede do tega stanja ni znan. (22)

Uporaba samega encima v terapevtske namene zaradi njegovih lastnosti (imunske reakcije, neobstojnost v prebavnem traktu, zaradi velikosti in naboja ne more prehajati skozi membrano celice, kratek razpolovni čas, nizka biološka uporabnost in alergenost) ni bila primerna, zato

je razvoj stekel v smeri razvoja SOD mimetikov, ki oponašajo delovanje nativnega encima.
(1, 23)

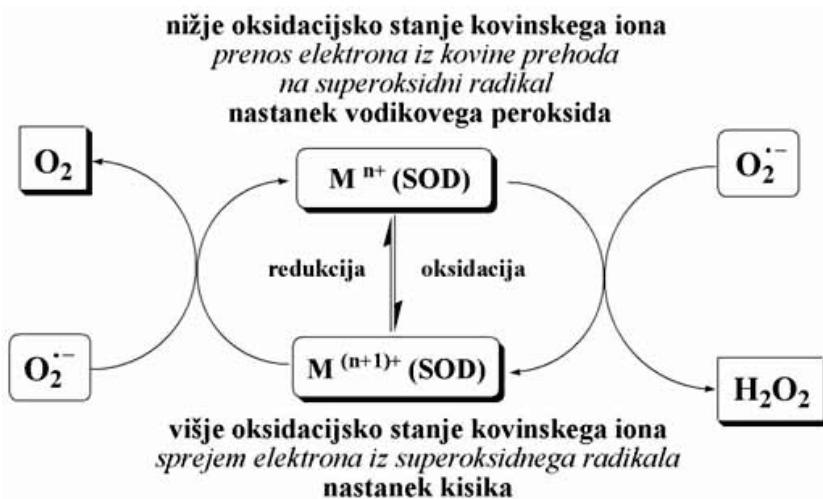
1.2.1 VLOGA SOD

SOD katalizira reakcijo dismutacije, v kateri iz dveh molekul superoksidu nastaneta molekula vodikovega peroksidu in kisika /1/. Dismutacija je reakcija disproporcionacije, saj se ista kemijska zvrst (superoksidni radikal) v reakciji oksidira in reducira hkrati.

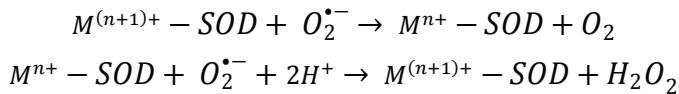


Celokupna reakcija dismutacije /1/ je sestavljena iz dveh sklopljenih enoelektronskih redoks reakcij (shema 2). Aktivno mesto encima lahko naenkrat sprejme eno molekulo superoksidnega radikala, zato je produkt encimske redoks reakcije odvisen od oksidacijskega stanja iona kovin prehoda. V primeru višjega oksidacijskega števila ($\text{M}^{(n+1)+}$) pride do prenosa elektrona iz superoksidnega radikala na kovinski kation in oksidacije do kisika. Kovinski kation M^+ v sproščenem aktivnem mestu nato pritegne naslednjo molekulo superoksidnega radikala, ji odda elektron in jo reducira v vodikov peroksid. Katalitični cikel, znan tudi kot "ping-pong" mehanizem, se nato ponovi.

Shema 2: Reakcije dismutacije, ki jo katalizira SOD – 'ping-pong' mehanizem (1)



SOD – katalizirano dismutacijo superoksidnega radikala lahko zapišemo tudi s sledečima polovičnima reakcijama:

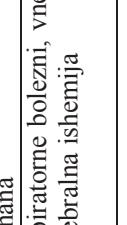


Kjer je M = Cu (n = 1); Mn (n = 2); Fe (n = 2); Ni (n = 2). V tej reakciji oksidacijsko število kovinskega kationa oscilira med n in n+1. Reakcija dismutacije je učinkovita in za svoj potek ne potrebuje dodatnih reducentov in energije. Kinetično je SOD znan kot eden najhitrejših encimov v naravi. Kinetične konstante velikosti $1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (2) kažejo, da je hitrost dismutacije omejena le z difuzijo superoksidnega radikala v aktivno mesto encima. Aktivnost SOD se z leti zmanjšuje (staranje). (1)

1.2.2 OSNOVNE ZNAČILNOSTI SOD

Obstaja več oblik encima SOD. V aktivnem mestu imajo lahko Cu-Zn, Fe, Mn ali Ni (prokarionti). V človeških celicah najdemo 3 izoencime SOD, ki so v različnih predelih celice. Aktivnost encimov je tkivno specifična. Največja encimska aktivnost SOD je v jetrih, kjer je obremenitev z radikali zaradi intenzivnega metabolizma visoka. Ekstracelularna aktivnost SOD pa je največja v pljučih, kar kaže na njeno pomembno vlogo pri preprečevanju pljučnih obolenj.

Preglednica 1: Osnovne značilnosti SOD (1, 2, 24)

Lokacija v celični membrani	CuZn-SOD (SOD1) čitosol (tudi v lizosomih, peroksismih, jedrju ter v prostoru med notranjo in zunanjim mitohondrijskim membrano)	Mn-SOD (SOD2) matriks mitohondrijev	EC-SOD [CuZn] (SOD3) ekstracelularno, celična membrana
Masa proteina	32,000	88,000	120,000
Struktura			
Kovina prehoda	Cu, Zn	Mn	Cu, Zn
Utišanje gena	neletalno	letalno	neletalno
Lokacija (kromosom)	21	6	neznana
Bolezenska stanja povezana z zmanjšano aktivnostjo posameznega podtipa	srčni infarkt, ishemija, nevodegenerativne bolezni srčna kap, odpoved srca, nevodegenerativne bolezni	srčna kap, odpoved srca, nevodegenerativne bolezni	respiratorne bolezni, vnetja, cerebralna ishemija
Katalitična aktivnost	Enzim pospeši reakcijo dismutacije SOR $\text{Encim} - \text{Cu}^{2+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Encim} - \text{Cu}^+ + \text{O}_2$ $\text{Encim} - \text{Cu}^+ + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Encim} - \text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$ $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Enzim pospeši reakcijo dismutacije SOR $\text{Mn}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-} \leftrightarrow [\text{Mn}^{3+} - \text{O}_2^{\cdot-}] \rightarrow \text{Mn}^{2+} + \text{O}_2$ $\text{Mn}^{2+} + \text{O}_2 \leftrightarrow [\text{Mn}^{2+} - \text{O}_2^{\cdot-}] + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Mn}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$ \uparrow $[\text{Mn-X-SOD}]$	

	<p>Nekatalitična reakcija je odvisna od pH ter od medsebojnih trkov O_2^\bullet ter OH$^-$. Če kot katalizator uporabimo govejo eritrocitno Cu-ZnSOD pH nima vpliva na hitrost reakcije. Katalitično funkcijo imajo le Cu$^{2+}$ ioni, medtem ko imajo Zn$^{2+}$ ioni vlogo pri stabilizaciji encima. Cu$^{2+}$ ionov v SOD ne morejo nadomestiti drugi ioni prehodnih kovin (železo ter mangan vodijo k nefunkcionalnosti encima, lahko pa ga nadomesti Co, vendar je reakcija počasnejša). Pri stabilnosti encima ga lahko nadomestijo kobaltovi, živo srebrovi ter kadmijevi ioni.</p> <p>Inhibitorji</p> <p>cianid – močan vendar nespecifični inhibitor; <u>dietilditiokarbamat (DDTC)</u> – veže se na baker v aktivnem mestu, lahko pa inhibira tudi druge Cu vsebujoče encime ter ksantin oksidazo. Kot tiol ima direktno antioksidativne lastnosti saj tvori RS radikale, kelira kovine ter inhibira apoptozo</p>	<p>Intermediat druge reakcije je v ravnotežju z manj aktivno obliko encima (Mn-X-SOD), v katerem je SOR pripet v neaktivni obliki. Pri pH 7,0 je hitrost dismutacije za oba SOD encima enaka, toda hitrost MnSOD pri alkalinem pH pada v primerjavi z Cu-ZnSOD. Odstranitev Mn iz aktivnega mesta povzroči izgubo encimsko aktivnosti, Mn se ponavadi ne more zamenjati z Fe ali drugimi kovinskimi ioni, ker to vodi do nefunkcionalnosti encima.</p>
	<p>Prooksidativno delovanje</p>	<p>Raziskave navajajo, da pri visokih koncentracijah SOD izgubi svojo antioksidativno sposobnost. Pri reakciji dismutacije O_2^\bullet nastaja H$_2$O$_2$, ki tudi lahko reagira z O$_{2-}^\bullet$. Če je prisoten v mM koncentracijah se tvori OH$^\bullet$. Reakcija je počasnejša kot pri osnovni reakciji. <i>In vitro</i> inkubacija encima z visokimi koncentracijami H$_2$O$_2$ vodi do oksidacije AK ostankov v aktivnem mestu ter agregacije, kar vodi do poškodb encima. Prosti Cu$^{2+}$ ioni lahko delujejo prooksidativno z vezavo na površino SOD in tam povzročajo škodo.</p>

1.3 SOD MIMETIKI

SOD mimetiki predstavljajo katalitične antioksidante. Za razstrupljanje superoksidnega radikala oponašajo reakcijo dismutacije, ki jo katalizira encim SOD. Uvrščamo jih med umetne encime, ker so nadomestek nativnega encima. Primeren je tudi izraz encimomimetiki (ang. synzymes - sintezni encimi). Delimo jih na selektivne in neselektivne katalitične antioksidante. Selektivni so reakcijsko specifični za reakcijo s $O_2^{\cdot-}$ v *in vitro* pogojih. V to skupino uvrščamo makrociklične katalitične antioksidante (kot na primer M40403). V skupino neselektivnih katalitičnih antioksidantov pa sodijo saleni (substituirani aromatski N,N-bis (saliciliden) etilendiaminski kovinski kompleksi, ki imajo Mn koordiniran s štirimi aksialnimi ligandi) (1), metaloporfirini in **nitroksidi**. Odstranjujejo lahko tako $O_2^{\cdot-}$ kot tudi H_2O_2 , lipidne perokside in peroksinitritni anion. (4)

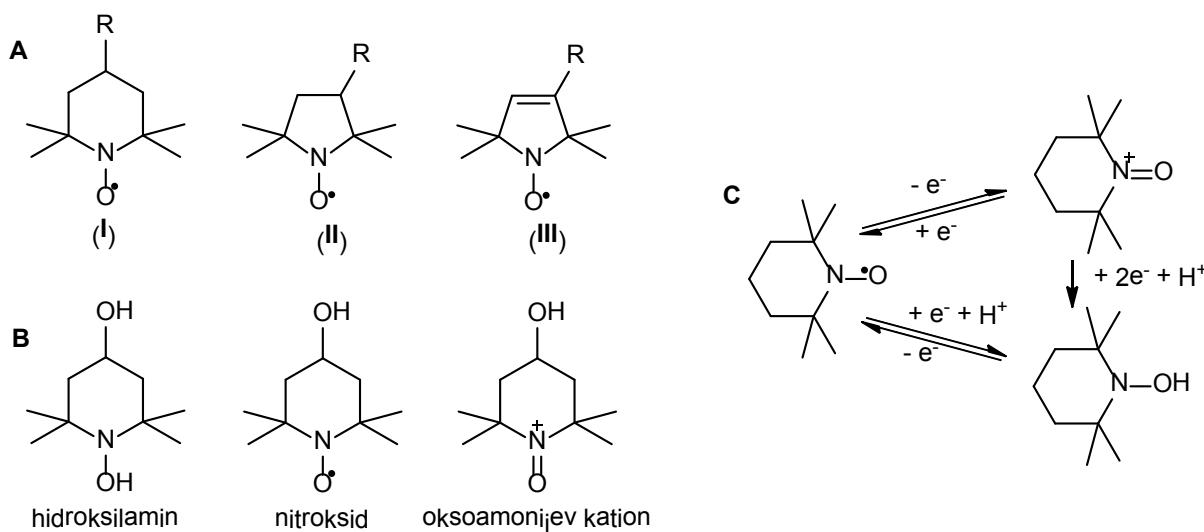
1.3.1 NITROKSIDI ali STABILNI NITROKSIDNI RADIKALI

Ciklični nitroksidi oz. hidrosilamini (reducirana oblika) so skupina stabilnih nizkomolekulskih radikalov z antioksidativnimi lastnostmi, ki lahko prehajajo celično membrano. (24) Vstopajo v enoelektronske redoks reakcije in lahko odstranjujejo tako $O_2^{\cdot-}$ kot tudi H_2O_2 (41), sodelujejo v radikal – radikal reakcijah, so inhibitorji Fentonove reakcije ter lipidne peroksidacije. Radikali so zaradi nesparjenega elektrona kemično reaktivne zvrsti. Reaktivnost je neposredno odvisna od težnje elektrona po nastanku elektronskega para. V primeru, da obstaja možnost delokalizacije nesparjenega elektrona, se stabilnost radikala poveča. (40) Ta se poveča tudi, če je nesparjen elektron ujet v omejeno področje molekule (potencialna jama), kot je to pri nitroksidnih radikalih. Tu je nesparjen elektron ujet v območje med dušikovim in kisikovim atomom in zaradi steričnih vplivov sosednjih metilnih skupin ne more reagirati po enem od treh glavnih načinov (tipov) radikalnih reakcij (odvzem vodikovega atoma, adicija na dvojno vez, reakcija med dvema radikaloma). Nitroksidni radikali so zato stabilne spojine, s katerimi lahko izvajamo vrsto kemičnih reakcij in postopkov, brez posledic za nesparjen elektron. (6) Radikali z nesparjenim elektronom bodisi na ogljiku, dušiku, kisiku ali kakem drugem atomu so obarvani, kar pomeni, da absorbirajo svetlobo v vidnem delu spektra. Tako so nitroksidni radikali, odvisno od celotne strukture molekule (kristalinične snovi ali viskozne tekočine), rumene, oranžne, rdeče, turkizno modre ali vijolične barve. (6)

1.3.1.1 LASTNOSTI NITROKSIDOV

Struktura nitroksidov

Stabilnost cikličnih nitroksidnih radikalov omogočajo štiri metilne funkcionalne skupine (CH_3-) na α -ogljiku pet-členskega (pirolidini, pirolini, oksazolidini) ali šest-členskega obroča (piperidini) (slika 1). Metilne skupine preprečijo reakcijo dismutacije med radikali tako, da omejijo dostop do reaktivnih zvrsti in tako prekinejo obetajoč razvoj reakcije. Dodatna funkcionalna skupina oz. stranska veriga (R) na obroču s svojo orientacijo omogoča, da molekula lahko interagira v hidrofilnem ali v hidrofobem mikrookolju. (5) Radikal je vsaka snov (atom, ion, molekula, kompleks, itd.), ki ima nekje v svoji strukturi (elektronski orbitali) vsaj en nesparjen elektron. (40) Lastnosti radikala izvirajo iz nesparjenega elektrona in njegove težnje, da si pridobi mankajoči elektron z nasprotno usmerjenim spinom. Ko je orbitala zasedena z elektronskim parom, radikala ni več. (26)

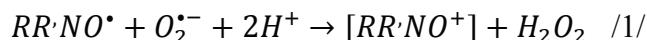


Slika 1: A) Splošne strukture nitroksidov: (I) – piperidin, (II) – pirolidin (nasičena oblika), (III) – pirolin (nenasičena oblika). Sestavljeni so iz pet- ali šest- členskih obročev, ki vsebujejo dušikov atom. Skupine pripete s kovalentno vezjo na dušikov atom, narekujejo lastnosti nitroksida.; B) Oksidativna stanja tempola. C) Redukcija nitroksidnega radikala do hidroksilamina ter redukcija oksoamonijskega kationa nazaj do nitroksida. V *in vivo* se nitroksidi nahajajo v obliki nitroksidnega radikala, ki ga lahko zaznamo z EPR ter pretežno v reducirani obliki hidroksilamina, ki ga z EPR ne zaznamo. Spojini sta v ravnotežju, odvisni od oksido-reduksijskega stanja okolja. (5) Nitroksidi se ne oksidirajo zlahka. Hitreje se reducijo do hidroksilaminov. Redoks potencial za takšne pretvorbe je seveda različen za različne nitrokside (odvisno od strukture).

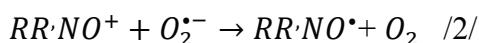
Reakcije nitroksidov

- SOD mimetična aktivnost

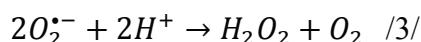
Dejstvo je, da so oksazolidinski nitroksidi SOD mimetiki, kar je vzpodbudilo željo po novih raziskavah in odkrivanju ostalik oblik nitroksidov s potencialno mimetično aktivnostjo. Mehanizem SOD mimetične aktivnosti vključuje oksoamonijev kation/nitroksid redoks par:



Enoelektronska oksidacija nitroksida ($RR'NO^\bullet$) s protonirano obliko superoksidu (HO_2^\bullet) je odvisna od pH. Nitroksid se pretvori v oksoamonijev kation ($RR'NO^+$), ki se nato lahko reducira nazaj do nitroksida:



Združitev reakcij /1/ in /2/ vodi do sledečega:



Podobno kot endogena SOD, tudi nitroksid deluje kot katalizator in se v procesu dismutacije $O_2^{\bullet-}$ do H_2O_2 in O_2 ne porablja. Za SOD mimetično aktivnost so nekaj nitroksidom določili velikost kinetičnih konstant. Kot pričakovano so se povišale pri nižjih pH vrednostih. Dodatno na kinetično konstanto vpliva tudi redoks potencial (redox midpoint potencial) redoks para oksoamonijev kation/nitroksid. (41) Nižji kot je potencial, večja je hitrost konstante v območju med 10^6 do $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Katalitična konstanta SOD mimetikov, je pri fiziološkem pH 2 – 3 velikostne razrede nižja ($100\text{-}1000 \times$ manjša) kot pri SOD. Redoks potencial pomeni energijo, ki je potrebna za odtegnitev e^- iz reducirane oblike ob oksidaciji. Izražen je kot E_0 (volt), pri pH = 7 in 1 M koncentraciji za vsakega predstavnika v paru. Par z višjim redoks potencialom lahko odtegne e^- kateremu koli paru z nižjim redoks potencialom. Kadar se spremenita pH in koncentracija se lahko smer reakcije obrne, oksidiran produkt v visoki koncentraciji (npr.: antioksidant, ki je oddal e^-) postane pro-oksidant, saj težja po nadomestitvi manjkajočega elektrona narašča vzporedno z njegovo koncentracijo. (3) Zaradi svoje nizke molekulske mase (~ 200 kDa), se nitroksidi lahko kopičijo znotraj celice v takih koncentracijah, ki učinkovito zmanjšajo koncentracijo $O_2^{\bullet-}$. V biološkem okolju je največkrat prisotnih več redoks parov v istem okolju, kjer potekajo oksidativni procesi. Končni izid redoks reakcije pa je odvisen od relativne koncentracije posameznih produktov. To pomeni, da se spojina kljub dokaj točno določeni *in vitro* aktivnosti, lahko *in vivo* obnaša povsem drugače.(5)

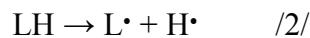
- Zaviranje lipidne peroksidacije

Vse glavne skupine biomolekul so podvržene napadu radikalov. Verjetno so najbolj doveztni lipidi, ki vsebujejo nenasičene maščobne kisline, katerih dvojne vezi so glavna tarča napadov

radikalov. V osnovi so biološke molekule neradikalske. V primeru pa, ko odda radikal en elektron taki molekuli, ji ga odvzame ali se preprosto pripne nanjo, postane prej nereaktivna molekula reaktivna – nastane radikal. Za reakcije, v katerih radikali reagirajo z neradikali, je značilno, da so verižne. Ena izmed pomembnejših verižnih reakcij v organizmu je tudi lipidna peroksidacija. Gre za direktno reakcijo lipidne molekule z molekulskim kisikom O₂. Mehanizem lipidne peroksidacije ima tri stopnje: **iniciacijo** oz. začetek nastajanja radikalov, **propagacijo** oz. širitev, kjer radikali vstopajo v reakcije, produkti, ki pri tem nastajajo pa reagirajo naprej, ter **terminacijo** oz zaključek, ki vključuje povezavo dveh radikalov in nastanek stabilnega ne-radikalskega produkta. (7)

Iniciacija lipidne peroksidacije:

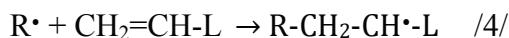
Na iniciacijo v veliki meri vplivajoioni kovin (Fe, Cu), ki katalizirajo oksidacijo maščobnih kislin ter UV svetloba in toplota. Eden izmed mehanizmov začetka lipidne peroksidacije je, da radikal (R[•]) odtegne vodikov atom (H) v molekuli lipida, nastane lipidni radikal (L[•]) /1/. (5)



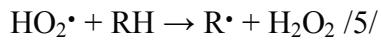
Vodikov atom ima en proton in en elektron, zaradi česar ga uvrščamo med radikale. Odstranitev vodikovega atoma iz biološke molekule pusti za sabo neparni elektron na atomu, na katerega je bil vezan vodik. Pri lipidih (LH) gre za odvzem vodikovega atoma s C-atoma, ki je med dvema dvojnima vezema /2/. Večje kot je število dvojnih vezi v verigi maščobne kisline, lažja je odcepitev vodikovega atoma. To je vzrok velike občutljivosti večkrat nenasičenih maščobnih kislin za peroksidacijo. Radikala, ki pogosto napadeta biološke molekule z odvzemom vodika sta HO[•] (hidroksilni radikal) /3/ ter LO[•] (alkoksilni radikal) . (7)



Drug možni mehanizem začetka lipidne peroksidacije je adicija radikala na dvojno vez /4/. V obeh primerih nastane nov radikal, ki se največkrat obnaša podobno kot prвotni. (6)



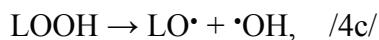
Pri izoliranih večkrat nenasičenih maščobnih kislinah so ugotovili še en način začetka lipidne peroksidacije. Sproži jo precej reaktiven HO₂[•] (hidroperoksilni radikal) /5/.



Zaenkrat še ni dokazano, da bi bil $\text{HO}_2\cdot$ sposoben pričeti peroksidacijo v membranah. Njegova vključitev v peroksidacijo je pogostejša v fazi, ko so že prisotni lipidni hiroperoksi. (7)

Propagacija lipidne peroksidacije:

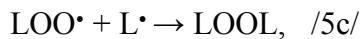
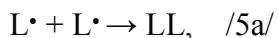
Nadaljnje reakcije lipidnih radikalov ($L\cdot$) so lahko različne, vendar v aerobnih celicah prevladujejo radikalske reakcije s kisikom, pri čemer nastane $\text{LOO}\cdot$ (alkilperoksilni radikal). /4/. (5)



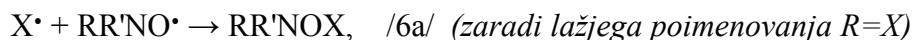
Ker so radikali zelo reaktivni, je reakcija 4a zelo hitra saj ne potrebuje skoraj nobene aktivacijske energije. Količina $\text{LOO}\cdot$ je zato precej večja kot $L\cdot$. Alkilperoksilni radikal reagira z novo molekulo maščobe, nakar nastane LOOH (hidroperoksid) in nov redikal /4b/, ki preko zgornje reakcije /4a/ ponovno začne verižno reakcijo. Sledi cepitev hidroperoksidov. Možna je monomolekulska ali homolitska cepitev in oblikovanje alkoksilnih radikalov $\text{LO}\cdot$ /4c/ ter bimolekulska cepitev hidroperoksidov /4č/. Kot pri vsaki verižni reakciji nastaja tudi pri tej vse več dovolj reaktivnih radikalov in s tem se vse več maščobnih molekul pretvori v hidroperokside, ki so pimarni produkti oksidacije maščob. Dolžina propagacijske stopnje je odvisna od več faktorjev, na primer od razmerja med lipidi in beljakovinami v membrani (alkilperoksilni radikali napadajo membranske beljakovine in če se poveča vsebnost beljakovin, je možnosti za radikalske reakcije več), od sestave lipidov, od koncentracije kisika in od prisotnosti znotrajmembranskih antioksidantov, ki lahko prekinejo verižno reakcijo. (7)

Terminacija lipidne peroksidacije:

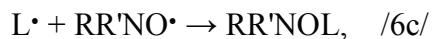
Radikali so električno nevtralni in slabo topni. Ker jim manjka vez, so strukturno nestabilni. Da bi vzpostavili normalne vezi, težijo k reakcijam, kjer koli je to mogoče. Zaradi tega so zelo reaktivni. (7) Ko zmanjka kisika ali substrata (nenasičenih lipidov ali maščobnih kislin), na katere bi se vezali, se vežejo drug z drugim in tako oblikujejo stabilno neradikalsko obliko /5a, 5b, 5c, 5č, 5d/. Zaključne reakcije ustavijo ponavljajoče reakcije radikalov, ki so značilne za propagacijsko stopnjo. (5)



Običajno kompleksni antioksidativni obrambni mehanizem ščiti organizem pred poškodbami, ki jih povzročajo radikali in lipidni peroksidi. Lipidno peroksidacijo lahko preprečijo že v fazi iniciacije z odstranjevanjem radikalov /6a, 6b/. Takšni antioksidanti so tudi nitroksidi /6a/ oz. hidroksilamini /6b/.



Odstranjujejo lahko intermediarne radikale (kot so alkilperoksilni in alkoxsilni radikali) propagacijske faze in tako prekinejo verižno reakcijo /6c, 6d, 6e/.



- Peroxidazna aktivnost

Vodikov peroksid, ki nastaja pri dismutaciji superoksidnega radikala lahko odstranimo z dvema tipoma encimov. Peroxidaze odstranjujejo vodikov peroksid s pomočjo oksidacije substrata, pri čemer se reducira vodikov ali organski peroksid (donor $e^- + H_2O_2 \rightarrow$ oksidiran donor + 2 H₂O). Katalaze pa katalizirajo direktno razgradnjo vodikovega peroksida v kisik in vodo. Nitroksidi, poleg SOD mimetične aktivnosti, posnemajo tudi vedenje katalaz oz. peroksidaz.

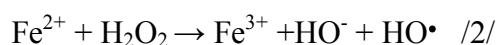
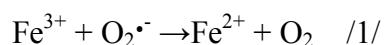
Stabilni nitroksidni radikali imajo sposobnost detoksifikacije hipervalentnih hem-proteinov kot je ferilmioglobin ($MbFe^{IV}$), ki nastane v reakciji z metmioglobino ($MbFe^{III}$) in H₂O₂. S prehajanjem med dvema oksidacijskima stanjema (med nitroksidnim radikalom in oksoamonijevim kationom), stabilni nitroksidi povečajo katalazi podobno aktivnost MbFe^{III} ter pospešijo dismutacijo H₂O₂. Nitroksidni radikal in oksoamonijev kation delujeta kot učinkovit redoks par, ki vstopata v reverzibilno enoelektronsko redoks reakcijo. S tem podpirata katalitične procese, kar pa ne velja za par hidroksilamin in nitroksid. Kljub temu hidroksilamin uspešno opravlja funkcijo donorja elektrona in tako zagotovi antioksidativno obrambo. (5) Derivati hidroksilaminov, ki nastanejo z redukcijo nitroksidov, se lahko direktno oksidirajo s superoksidnimi radikali, ali ob prisotnosti kisika in kovinskih ionov, ki so sposobni enoelektronskih redoks reakcij (Fe³⁺, Cu²⁺ ioni). (17)

Redoks reakcije so udeležene v številnih bioloških procesih. Pri njih gre za prenos elektronov iz donorja na akceptor. Biološki prenos elektronov pa se razlikuje od večine redoks procesov. Zgodijo se hitro ter na dolgih razdaljah (> 10 Å). Pogosto jih spremljajo le majhne spremembe v aktivnem mestu. Encime, ki katalizirajo redoks reakcije imenujejo oksidoreduktaze (klasifikacijsko število EC1), ki se nadalje delijo v 22 podrazredov. Redoks proteini so prenašalci elektronov in imajo pri redoks reakcijah vlogo posrednikov. Ti proteini in encimi imajo pogosto kovinske centre in se zato imenuje metaloproteini. (29) Torej, v celici obstajata samo dve vrsti reakcij s primerljivimi hitrostmi: nadzorovane encimske reakcije in nekontrolirane radikalske reakcije. (6)

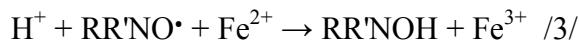
- Inhibicija Fentonove reakcije

Železo je najpomembnejša kovina prehoda v človeškem telesu. Preveč oz. premalo železa lahko povzroči oksidativni stres. Železo se najpogosteje nahaja v Fe^{2+} in Fe^{3+} obliki. Obstaja pa tudi železo (IV, V, VI).

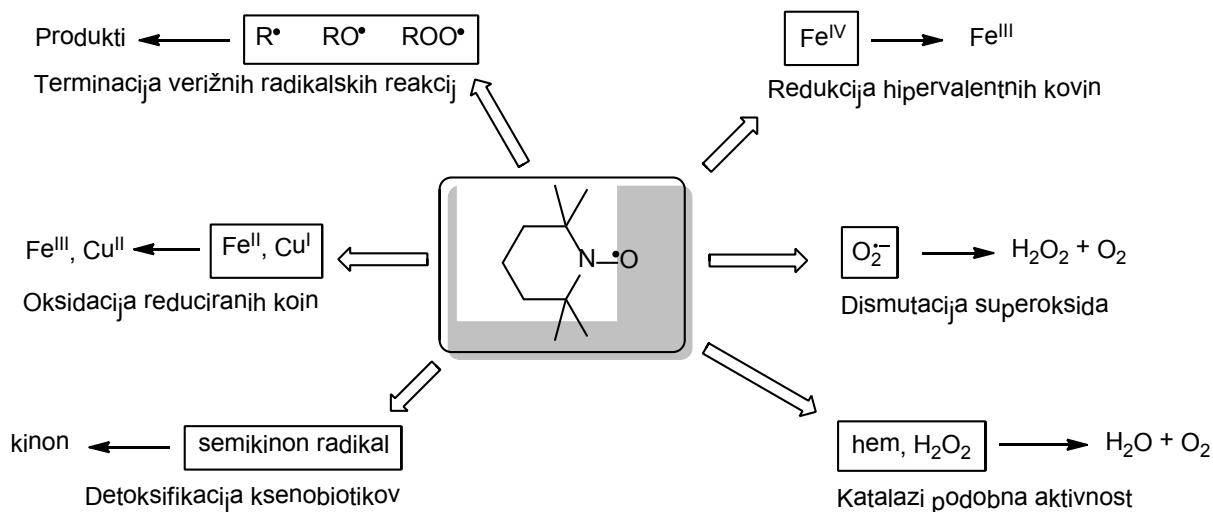
Če peroksid naleti na Fe^{2+} pride do Fentonove reakcije /2/:



Nastane zelo reaktivni hidroksilni radikal HO^{\cdot} , ki povzroči lipidno peroksidacijo. Nitroksidi lahko sprejmejo elektron reduciranega kovinskega kompleksa in tako preprečijo nastanek HO^{\cdot} /3/(5, 20):



Shema 3: Poleg SOD mimemtične aktivnosti lahko nitroksidi oksidirajo reducirane kovinske ione, ter tako preprečijo tvorbo ROS; reducirajo hipervalentne ione kovin - železo (IV), ki je vpleteno v mehanizem katalaze, peroksidaze in CYPs sodeluje pri oksidaciji aminokislina: $\text{Fe}^{\text{IV}} + \text{AK} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \text{NH}_3 + \alpha\text{-ketokislina}$; pospešijo katalitično odstranitev H_2O_2 ; ujamejo bakrove ione ter zaključijo radikalske veržne reakcije. Nitroksidi tekmujejo z NO^{\cdot} za vezavo na $\text{O}_2^{\cdot-}$ in s tem neposredno vplivajo na zmanjšano tvorbo peroksinitrita. (24)



1.3.2 METODE DOLOČANJA RADIKALOV

Za detekcijo so pogosto uporabljene spektroskopske analizne metode, ki jih odlikuje visoka občutljivost, specifičnost, selektivnost, natančnost in enostavnost uporabe. Najpogosteje uporabljene spektroskopske metode za ugotavljanje prisotnosti kratkoživih radikalov so različne kemične metode, ki temeljijo bodisi na spremembi barve ali pa na nastajanju značilnih produktov, ki jih določamo s kromatografskimi ali spektrofotometričnimi metodami.

Direktne metode določanja NO[•]:

- Kemiluminiscenca (reakcija NO[•] z O₃ daje svetlobo preko eksitiranega stanja NO₂[•], merimo lahko samo v plinasti fazi)
- NO[•] elektrode (več tipov, v porfirinskih senzorjih se NO[•] veže na Ni²⁺-porfirin adsorbiran na anodo in se elektrokemično oksidira; NO[•] lahko določamo tudi s pomočjo adaptirane Clarkove O₂ elektrode)
- vezava na hemoglobin (NO[•] reagira z O₂-Hb in ga pretvarja v met-Hb, ΔA)
- spinske pasti za določanje NO[•] (sinteza NO[•] v organizmu nenehno poteka in večina se ga lahko odstrani z nitrozilacijo Fe²⁺ v hemu hemoglobina. NO[•] je dober ligand za vezavo na Fe²⁺ion (hem vsebujoči proteini), nitrozilni kompleksi pa imano značilen EPR signal. Uporablajo se tudi ostale spinske pasti: nitronilnitroksidi, ki reagirajo do iminonitroksidov in imajo različen EPR spekter; keleotropne pasti itd.)

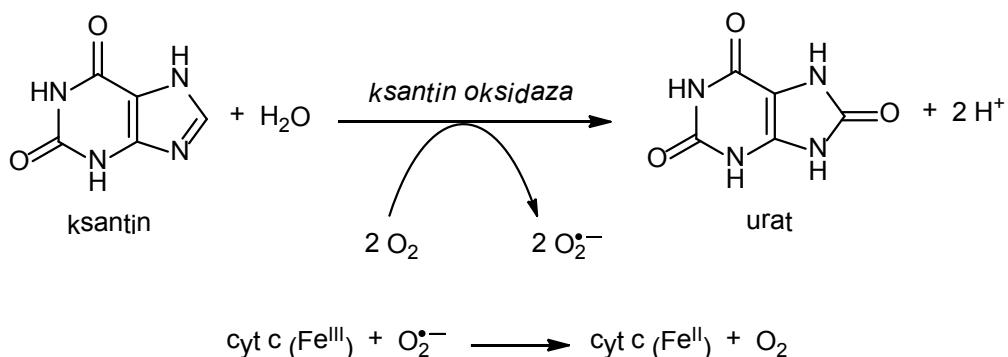
Indirektne metode določanja NO[•]:

- merjenje NO₂⁻ (oksidacija NO[•] do NO₂⁻, reakcija s sulfanilamidom in N-(1-naftil)etylendiaminom v kisli raztopini dajeobarvan azo produkt, ΔA pri 584nm)
- fluorimetrija
- merjenje ostalih oksidacijskih produktov (temelji na bolj reaktivnih zvrsteh N)
- preproste spektrofotometrične metode
- neselektivni ali selektivni NOS inhibitorji (18)

1.3.2.1 DOLOČANJE SUPEROKSID-DISMUTAZNE AKTIVNOSTI STABILNIH NITROKSIDNIH RADIKALOV Z UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIČNO INDIREKTNO METODO PO FRIDOVICH-u

Začetni testi McCord-a in Fridovich-a so vključevali nastanek superoksidnega radikala s pomočjo encimsko katalizirane reakcije med ksantin oksidazo in ksantinom, njegovo sposobnostjo reduciranja citokroma c in s tem dviga absorbance pri 550 nm. Dodatek superoksid dismutaze odstranjuje $O_2^{\cdot-}$ in tako zavira dvig absorbance. Takrat sta eno enoto SOD aktivnosti (ang. unit) definirala kot količino SOD, ki inhibira redukcijo citokroma c za 50%. Z metodo merimo SOD aktivnost. (5)

Shema 4: Tvorba superoksidu in redukcija citokroma c s superoksidom v Fridovich-evem testu



Vsaka metoda ima svoje prednosti in slabosti, vendar niti en test ni primeren za vse sisteme. Slabost indirektnih metod je lažno znižana aktivnost SOD zaradi uporabe reagentov, ki inhibirajo nastanek $O_2^{\cdot-}$ (npr.z zaviranjem delovanja ksantin oksidaze). Prednost takšne metode pa je, da aktivnost ksantin oksidaze lahko preverimo (pretvorba do sečne kisline). Na test lahko vpliva tudi citokrom oksidaza iz vzorca, ki oksidira reducirani citokrom c. Pri testu se zato uporablja modificirani citokrom c, ki ima na aminokislinskih stranskih verig vezane acetilne skupine (CH_3CO-). Tak citokrom c ni več substrat za citokrom oksidazo, še vedno pa potekajo reakcije s $O_2^{\cdot-}$. Pri reakcijah s ksantin oksidazo nastaja vodikov peroksid, ki lahko z reakcijo dismutacije $O_2^{\cdot-}$ reoksidira reducirani citokrom c, hkrati pa lahko reagira tudi s kovinskimi ioni in nastane OH^{\cdot} . Nastanek OH^{\cdot} preprečimo tako, da v reakcijo vključimo še katalazo. Pazimo, da komercialno pripravljena citokrom c in katalaza ne vsebujeta artefaktov, ki bi vplivali na analizo (kontaminacija s SOD, askorbatom, tioli itd.) (5)

Čeprav test uporabljajo že desetletja, je mogoče najti zelo malo literature namenjene preiskovanju reakcijske poti med citokromom c in superoksidom. Različni viri navajajo rezlične vrednosti konstante reakcije med citokromom(Fe^{3+}) c in superoksidom. Stopnje reakcije so raziskali pri različnih pH in prišli do zaključka, da se najpomembnejša sprememba konstante hitrosti pojavi pri pH 7,45 (domnevno zato, ker nekatere AK pri tem pH povečajo prenos elektronov, superoksid pa hitreje reagira s protonirano obliko). (29) Kasnejše raziskave so se osredotočile na vpliv negativno nabitih lizinskih ostankov, okoli prostetične skupine hem, na reakcijo s superoksidom. Določili so vrednost konstante $2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (38) Novejša literatura pa navaja vrednost $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ki je skoraj 4 krat manjša. Vzrok je lahko dodana EDTA v sami reakciji. (29) Od laboratorija do laboratorija se razlikuje tudi uporaba metode za nastanek superoksidnega radikala (pulzna radioliza, s ksantinom in ksantin oksidazo). (38, 29)

UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

UV/VIS spektroskopija je kvantitativna analitska metoda, ki se najpogosteje uporablja za določanje koncentracij različnih organskih in anorganskih spojin v raztopinah. Poda nam informacijo o strukturi molekul ali ionov. Temelji na absorpciji ultravijolične in vidne svetlobe. Kadar žarek svetlobe zadane ob molekulo oz. delec, se svetloba odkloni (sipanje), odbije, gre skozi (transmisija) ali absorbira (molekula vrška energijo). Osnova za spektroskopske analizne metode je interakcija svetlobne energije s preiskovanim vzorcem. Pri molekulski spektroskopiji vzbudimo molekule s sevajočo energijo (svetlobo). Z absorpcijskim spektrofotometrom zabeležimo v molekuli absorbirani del vpadne energije in to registriramo v odvisnost od valovne dolžine kot absorpcijski spekter. Absorpcija je proces, ko molekule lahko zavzemajo različna energetska stanja, ki so določena z elektronskimi energetskimi nivoji. Osnovni nivo je nevzbujeno energijsko stanje, višje energetsko stanje pa se pojavi, kadar molekula absorbira določeno energijo (svetlobo). Elektroni se vzbudijo in preskočijo iz ene orbitale na drugo, pri čemer je količina absorbirane energije vedno enaka razlike med energijama višjega in nižjega nivoja. Del molekule odgovoren za absorpcijo vidne ali UV svetlobe imenujemo kromofer ali kromoferni sistem.

Če presvetlimo raztopino določene snovi z monokromatsko svetlogo intenzitete I_0 , bo imela prepuščena svetloba manjšo intenziteto I (slika 2).



Slika 2: Razlika v intenziteti prepuščene svetlobe (I). Leva slika prikazuje kiveto s topilom, desna pa kiveto z vzorcem s koncentracijo c . Pri prehodu skozi obarvano raztopino žarek oslabi. (25)

Razmerje med intenzitetama prepuščene in vpadne svetlobe imenujemo **transmitanca** (T) (prepustnost), ki nam pove odstotek prepuščene svetlobe: $T = I/I_0 \times 100$.

Absorbanca (A) je desetiški logaritem razmerja intenzitete vpadle svetlobe in intenzitete neabsorbirane svetlobe: $A = -\log_{10}T$.

Zvezo med absorbanco in koncentracijo snovi v kiveti opisuje **Beer-Lambertov zakon**, ki pravi, da je velikost absorbance premosorazmerna koncentraciji snovi (c), dolžini optične poti svetlobnega žarka (l ; merimo v cm) in molarnemu ekstinkcijskemu koeficientu (ϵ), ki je značilen za določeno snov: $A = \epsilon \times c \times l$. Absorbanca je količina brez enote.

Absorpcijski spekter - zveza med absorbanco in uporabljenim valovno dolžino. Le-ti so za posamezne molekule različni zato, ker je valovna dolžina absorbirane svetlobe odvisna od funkcionalnih skupin ali razporeditve atomov v vzorcu. Absorpcijski spekter lahko uporabimo za identifikacijo posamezne snovi saj je odvisen predvsem od kemične strukture molekule in je zato pri določeni valovni dolžini za določeno snov značilen. Na absorpcijski spekter vpliva tudi okolje molekul (pH topila, polarnost topila ali sosednjih skupin, relativna orientacija sosednjih molekul). (25)

KATALITIČNA KONSTANTA

Katalitična konstanta ponazarja hitrost pretvorbe $E + S \rightarrow E + P$. Gre za rekacijo drugega reda, saj je V_0 odvisen od koncentracije encima [E] in substrata [S]. Zgornja omejitev je hitrost, s katero se E in S srečata (difuzija) in znaša 10^8 do $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (33) Uporaba katalitične konstante je najboljši način (poleg redoks potenciala) za primerjavo katalitične učinkovitosti nitroksidov. Odvisne so od temperature, aktivacijske energije in koncentracije

reaktantov. Z višanjem temperature konstanta narašča, zato bi morale biti podane pri različnih temperaturah. Žal pa v literaturi o radikalih pogosto ni tako. (38)

Po podatkih dosegljivih iz literature, smo po dani enačbi izračunali katalitične konstante (k_{app}) vzorcev:

$$V/v = 1 + [\text{nitroksid}] * k_{app} / [\text{cyt c}^{\text{III}}] * k_{\text{cyt cIII+superoksid}}$$

V in v sta hitrosti reakcije v odsotnosti in prisotnosti nitroksida, $k_{\text{cyt cIII+superoksid}}$ je konstanta reakcije citokroma c s superoksidom $= 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (38) oz $k_{\text{cyt cIII+superoksid}} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (29).

1.3.3 UPORABNOST NITROKSIDOV

Stabilne nitroksidne radikale zaradi njihove narave že več let uporabljajo v diagnostične namene kot molekulsko orodje pri EPR (elektronska paramagnetna resonanca) in spinskih pasteh.

EPR je edina metoda s katero neposredno določamo radikale, potrebna je zadostna koncentracija in življenska doba radikalov. Za neposredno določanje O_2^\cdot in OH^\cdot ni dovolj občutljiva zato v takih primerih kratkoživim radikalom ponudimo diamagnetne lovilce radikalov. Kratkoživi radikali reagirajo z adicijo na dvojno vez v spinski pasti in tvorijo dovolj dolgožive radikale, ki jih lahko določamo z EPR, spektrofotometrično (fluorescenca, UV-VIS, kolorimetrija) ali imunološkimi tehnikami. Takšno paleto uporabnosti so doživeli stabilni nitroksidni radikali. Njihova stabilnost in možnost kemičnih modifikacij je omogočila, da jih lahko zelo selektivno in specifično vežemo na posamezne komponente ali v posamezna področja vzorca, ki ga s tem označimo. Tako so stabilni nitroksidni radikali (spinski označevalci) postali temelj metode spinskega označevanja, ki je zelo pomembna metoda EPR spektroskopije. (6,18)

Metode spinskega označevanja z nitroksidi so pomembno orodje pri preučevanju molekulske dinamike, mikrostrukturi, lokalnega pH-ja, lokalne polarnosti, reaktivnih kisikovih/dušikovih zvrsti itd. Uporabljamo različna molekulski orodja: **Spinske sonde** so paramagnetne molekule, ki v svoji strukturi vsebujejo nesparjen elektron (običajno gre za stabilen nitroksidni radikal). Dodamo jih vzorcu, ki ga proučujemo; te vstopajo v nekovalentne interakcije s sistemom (npr. biološke membrane) in »poročajo« o svoji neposredni okolini.

Spinske pasti ne dajejo EPR signala, saj ne vsebujejo nesparjenega elektrona (spinske pasti so diamagnetne molekule). Lahko reagirajo s kratkoživimi radikali kot sta npr. hidroksilni radikal (OH^\cdot) ali superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Nastane paramagnetna molekula (običajno nitroksid), ki daje EPR signal. Izraz **spinski označevalec** se v širšem pomenu besede nanaša na spinske sonde kot tudi na kovalentno pripete paramagnetne dele (makro)molekul ali paramagnetne reagente. V ožjem pomenu besede je spinski označevalec molekula ali del (makro)molekule, ki daje EPR signal (paramagnetna molekula) in jo lahko kovalentno vežemo na neko drugo (makro)molekulo. S spiskim označevalcem torej (preko kovalentne vezave) spisko označimo sicer diamagnetno molekulo, ki po kovalentni vezavi spinskega označevalca daje EPR signal. Osnovna ideja spinskega označevanja je modifikacija izbranih mest preiskovanega materiala s specifičnimi spojinami, običajno nitroksidi, ki jih vežemo kovalentno (govorimo o spiskih označevalcih) ali nekovalentno (govorimo o spiskih sondah). Prednost metode spiskskega označevanja je predvsem v pridobivanju direktne informacije o lokalni strukturi, mobilnosti, mikropolarnosti, kislosti, redoks statusu in elektrostatskem potencialu dela molekule, kjer se nahaja spinski označevalec ali spiska sonda. (17)

Drugo veliko področje uporabe nitroksidov in njihovih derivatov je področje antioksidantov, ki upočasnijo procese staranja različnih polimerov, gume, barv in v selektivnih oksidacijah višjih alkoholov (industrija detergentov, naftna industrije). Veliko naporov je usmerjenih v iskanje radikalov, ki bi bili stabilni v organizmu. (6)

Številne raziskave poročajo o pozitivnih učinkih nitroksidov pri laboratorijskih živalih, bakterijah, celicah sesalcev ter pri izoliranih molekulah kot so encimi, proteini, lipidi, DNA. Vendar pa poročajo tudi o njihovi toksičnosti, odvisni od koncentracije nitroksida in od časa izpostavljenosti. Domnevno povzročajo oksidativni stres, morebitno nekrozo timocitov, povečano aktivnost citokrom c P450 oksidaze, povečujejo nastanek $\text{O}_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 v človeških tumorskih celicah, H_2O_2 pri bakterijah povzroča mutagenost, sprožijo mehanizem apoptoze in s tem povzročijo celično smrt. (24) Glavna omejitev razvoja katalitičnih antioksidantov je nizka korelacija med *in vitro* aktivnostjo in aktivnostjo v biološkem sistemu, kjer so reakcijske hitrosti zaradi velikega števila potencialnih interakcij lahko bistveno drugačne. (1) Nitroksidni radikali se v celicah in tkivih hitro reducirajo do neparamagnetnih produktov. Stabilni radikali bi bili uporabni kot kontrastna sredstva pri diagnostičnem slikanju z magnetno resonanco (MRI – magnetic resonance imaging) in za slikanje oksigenacije tkiv. (6)

2 NAMEN DELA

Namen našega dela je določitev koncentracije SOD mimetika, ki je potrebna za znižanje maksimalne hitrosti reakcije citokroma c na polovico (I_{50}).

V sklopu eksperimentalnega dela bomo določili zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c (V_c) pri določeni koncentraciji SOD mimetika tako, da bomo merili spremembo apsorpcije vzorčne zmesi pri 550 nm v časovnem intervalu desetih minut ($\Delta A_{550}/\Delta t$). Iz dobljenih rezultatov bomo narisali umeritvene premice, s pomočjo katerih bomo lahko določili I_{50} za posamezno spojino, ki jo testiramo kot SOD mimetik.

Cilj naše naloge je ugotoviti, kateri izmed stabilnih nitroksidnih radikalov, bi lahko kataliziral reakcijo pretvorbe O_2^\cdot do H_2O in O_2 tako, kot nativni encim SOD in bil primeren za uporabo kot SOD mimetik.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 VZORCI

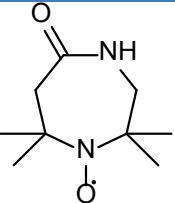
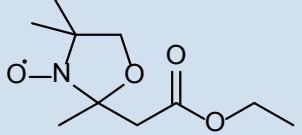
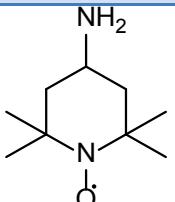
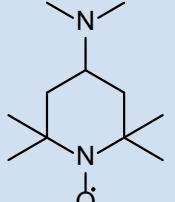
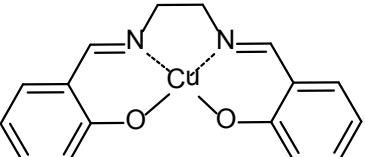
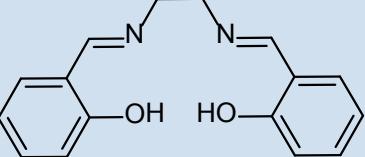
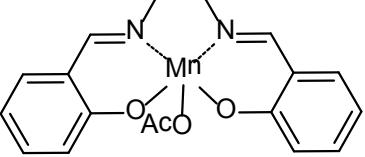
V analizo smo vključili 21 predhodno sintetiziranih stabilnih nitroksidnih radikalov, salen ter dva kompleksa salena. Vsi vzorci, razen vzorca **19**, ki je bil tekoč, so bili v trdnem agregatnem stanju, v obliki obarvanih praškastih kristalnih delcev. Na vzorec smo naredili od 4 do 8 meritev.

Preglednica 2: Prikaz analiziranih spojin

Vzorec	IUPAC ime spojine	Kemijska formula	MOL. MASA (g/mol)	Kemijska struktura
1	1-oksil-3-(hidroksimetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirol	C ₉ H ₁₆ NO ₂ ·	170,23	
2	1-oksil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirol-3-karboksilna kislina	C ₉ H ₁₄ NO ₃ ·	184,21	
3	1-oksil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirol-3-karboksamid	C ₉ H ₁₅ N ₂ O ₂ ·	183,23	
4	1-oksil-2,2,5,5-tetrametilpirolidin-3-karboksamid	C ₉ H ₁₇ N ₂ O ₂ ·	185,24	
5	1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin	C ₉ H ₁₈ NO·	156,25	

6	1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ol	C ₉ H ₁₈ NO ₂ •	172,24	
7	<i>N</i> -(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)acetamid	C ₁₁ H ₂₁ N ₂ O ₂ •	213,3	
8	1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-karbonitril	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O•	181,25	
9	1-oksil- <i>N</i> -(2-hidroksietil)- <i>N,N</i> ,2,2,6,6-heksametilpiperidin-4-amonijev jodid	C ₁₃ H ₂₈ IN ₂ O ₂ •	371,28	
10	2,3,4,5,6-pentahidroksi- <i>N</i> -(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)heksanamid	C ₁₅ H ₂₉ N ₂ O ₇ •	349,4	
11	2,2,6,6-tetrametil-4-((1-metilpiperidin-4-il)amino)piperidin-1-oksil	C ₁₅ H ₃₀ N ₃ O•	268,42	

12	<i>N</i> -(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)formamid	C ₁₀ H ₁₉ N ₂ O ₂ •	199,27	
13	4,4'-iminobis(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil)	C ₁₈ H ₃₅ N ₃ O ₂ • ²⁻	325,49	
14	2,2,2-trifluoro- <i>N</i> -(2-((1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-oksoetyl)acetamid	C ₁₃ H ₂₁ F ₃ N ₃ O ₃ •	324,32	
15	8-oksil-7,7,9,9-tetrametil-1,3,8-triazaspiro[4.5]dekan-2,4-dion	C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₃ •	240,28	
16	benzil (2-((1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-oksoetyl)karbamat	C ₁₉ H ₂₈ N ₃ O ₄ •	362,44	
17	(<i>S</i>)-terc-butil (1-((1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)karbamat	C ₂₃ H ₃₆ N ₃ O ₄ •	418,55	

18	1-oksil-2,2,7,7-tetrametil-1,4-diazepan-5-on	C ₉ H ₁₇ N ₂ O ₂ •	185,24	
19	etil 2-(3-oksil-2,4,4-trimetiloksazo-lidin-2-il)acetat	C ₁₀ H ₁₈ NO ₄ •	216,25	
20	4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil	C ₉ H ₁₉ N ₂ O•	171,26	
21	4-(dimetilamino)-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil	C ₁₁ H ₂₃ N ₂ O•	199,31	
22	[Cu ²⁺ (salen)]	C ₁₆ H ₁₄ CuN ₂ O ₂	329,84	
23	<i>N,N'</i> -bis(saliciliden)etilendiamin	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂	268,31	
24	[Mn ³⁺ (salen)OAc]	C ₁₈ H ₁₇ MnN ₂ O ₄	380,28	

3.2 TEST DOLOČANJA MIMETIČNE AKTIVNOSTI STABILNIH NITROKSIDNIH RADIKALOV

3.2.1 SISTEMSKE TEKOČINE IN REAGENTI

Fosfatni pufer (PBS): Fosfatni pufer smo uporabili kot topilo.

Uporabili smo 0,01 M raztopino fosfatnega pufra pH 7,4. Za pripravo smo uporabili kemikalije NaH_2PO_4 in Na_2HPO_4 , proizvajalca SIGMA.

0,1 M fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo natehtali 2,747 g Na_2HPO_4 in 0,6779 g NaH_2PO_4 v merilno bučko, ju raztopili v bidestilirani vodi in dopolnili do 250 mL.

0,01 M fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo v 50 mL merilno bučko dodali 5 mL 0,1 M fosfatnega pufra ter dodali bidestilirano vodo do oznake.

Priprava: V 50 mL merilno bučko smo dodali 5 mL 0,1 M fosfatnega pufra in do oznake napolnili z destilirano vodo. Dobili smo 0,01 M raztopino fosfatnega pufra s pH 7,4.

Destilirana voda: je voda brez ionov, elementov v sledovih in nečistoč, ki so prisotne v vodovodni vodi. Uporabili smo jo kot topilo.

Natrijev hidroksid: raztopina NaOH je tekočina brez barve in vonja. Je močna baza in je jedek (kaustičen). Uporabili smo ga kot topilo za ksantin.

Priprava: V 50 mL merilno bučko smo zatehtali 4 g granul natrijevega hidroksida in do oznake napolnili z destilirano vodo. Dobili smo 2 M raztopino NaOH . Pri nalogi smo potrebovali 0,02 M raztopino NaOH , zato smo osnovno raztopino redčili. 0,2 M raztopino NaOH smo pripravili tako, da smo odmerili 9000 μL destilirane vode in dodali 1000 μL 2 M raztopine NaOH . Iz te raztopine smo pripravili 0,02 M raztopino NaOH tako, da smo odmerili 9900 μL destilirane vode in dodali 100 μL 0,2 M raztopine NaOH .

Metanol (CH_3OH): Je brezbarvna tekočina z značilnim blagim vonjem ter ostrega okusa, gori s šibko svetlečim plamenom, meša se z vodo v vseh razmerjih. Je močno strupena snov,

uživanje ali inhaliranje povzroča metabolno acidozo, slepoto in druge učinke na centralno živčevje. (8) Uporabili smo ga kot topilo pri pripravi osnovnih raztopin vzorcev.

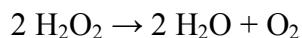
Uporabili smo metanol Chromasolv® proizvajalca SIGMA, za HPLC z $\geq 99,9\%$ čistostjo.

Ksantin ($C_5H_4N_4O_2$): je intermedijat pri razgradnji purinskih baz v sečno kislino (metilirani derivati ksantina rastlinskega izvora (kofein, teobromin in teofilin) so farmakodinamično aktivni) (8). Nastane na tri načine: iz gvanina s pomočjo gvanin deaminaze, iz hipoksantina s pomočjo ksantin oksidaze ter iz ksantozina s pomočjo purinske nukleozidne fosforilaze. Skupaj s ksantin oksidazo smo ga uporabili kot substrat za tvorbo $O_2^{\bullet-}$, ki ga izkoriščamo pri merjenju aktivnosti SOD. (9)

Uporabili smo Xanthine (kataloška številka X 0626) proizvajalca SIGMA z molekulsko maso 152,11 g/mol. Hranili smo ga na sobni temperaturi. (9)

Priprava: V 2 mL 0,02 M NaOH smo raztopili 0,30 mg ksantina, ga sonicirali v ultrazvočni kadički, da smo dobili 1 mM bistro raztopino in ga do uporabe hranili na ledu. Pripravljena raztopina je stabilna 1 teden pri 2 – 8 °C.

Katalaza: ker so živalske katalaze v aktivni obliki tetrameri, imajo poleg primarne, sekundarne in terciarne strukture tudi kvartarno. Vsak od štirih monomerov (podenot) ima v aktivnem mestu vključeno po eno molekulo hema z Fe(III). Goveja katalaza je sestavljena iz štirih polipeptidnih verig (β antiparalelnih nagubanih listov in vijačnih insercij (vozlov)) ter α vijačnic). Hem je skrit v nepolarnih žepih približno 20 Å pod molekulsko površino. Kanal iz hidrofobnih ostankov preprečuje dostop večini molekul razen molekulam H_2O_2 . Vsaka podenota ima ponavadi tudi molekulo NADPH (donor e $^-$) na katero se veže. Je dokaj stabilen encim s širokim pH-optimumom. (2) Katalaza podobno kot SOD katalizira reakcijo dismutacije, kjer se prva molekula vodikovega peroksida reducira do vode, druga pa se oksidira do kisika:



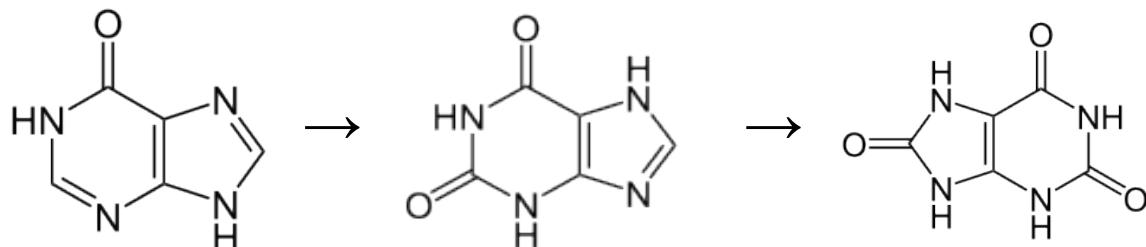
Uporabili smo Catalase iz govejih jeter (kataloška številka 280743) proizvajalca SIGMA z molekulsko maso ~250 kDa. Hranimo pri temperaturi -20 °C. (11)

Priprava: v 1 mL fosfatnega pufra (0,01 M; pH 7,4) smo raztopili 5 mg katalaze, jo za kratek čas sonicirali v ultrazvočni kadički, da smo dobili bistro raztopino in jo do uporabe hranili na ledu. Zaradi nepravilnega shranjevanja, zamrzovanja, tajanja ali izpostavitvi kislinam ali bazam lahko pride do porušenja strukture encima, kar povzroči izgubo aktivnosti. Po priporočilih proizvajalca pripravljene raztopine ne zamrzujemo za ponovno uporabo, ampak vedno pripravimo svežo raztopino.

Ksantin oksidaza: Je najbolj znan predstavnik molibdenovih metaloproteinov, ki v organizmu opravlja številne naloge. Primarna fiziološka funkcija je kataliza zadnjih dveh stopenj v pretvorbi purinov (npr. adenina in gvanina) v sečno kislino. Uporablja superoksidni radikal, ki se z dismutacijo pretvori v vodikov peroksid. Reakcijo lahko poenostavljeno zapišemo kot reakcijo /1/ in je značilna za celotno ksantin-oksidazno skupino encimov.



Pride do prenosa kisikovega atoma iz molekule vode na ogljikov atom substrata. Za ksantin-oksidazo ni značilna velika substratna specifičnost, zato lahko v reakcije vstopajo tudi molekule, ki vsebujejo druge heteroaromate, predvsem pteridin. V zadnjih letih je bila v številnih znanstveni člankih predstavljena vloga ksantin-oksidaze pri nastajanju reaktivnih kisikovih zvrsti, predvsem vodikovega peroksidu in superoksidnega radikala, posredno pa tudi NO in peroksinitrita. Poleg dokazane vloge pri nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti, ima ksantin-oksidaza tudi antioksidativno delovanje. Sečna kislina, ki nastaja kot produkt metabolizma purinov, je plazemski antioksidant, ki se lahko oksidira do relativno stabilnih in netoksičnih produktov. Prisotna je v višjih koncentracijah kot ostali antioksidanti in lahko učinkovito ščiti biološke tarče pred oksidacijo povzročeno s hidroksilnimi radikali, hipokloriti in peroksinitriti. (12) Skupaj s ksantinom smo jo uporabili za tvorbo $\text{O}_2^{\cdot-}$, ki ga potrebujemo pri merjenju aktivnosti SOD.



Slika 3: Hipoksantin (en kisikov atom), ksantin (dva kisikova atoma), sečna kislina (trije kisikovi atomi). Ksantin-oksidaza katalizira oksidacijo ksantina v sečno kislino in vodikov peroksid, pa tudi oksidacijo hipoksantina v ksantin:

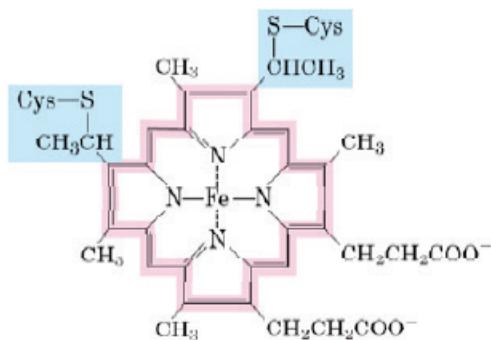
- $\text{hipoksantin} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{ksantin} + \text{H}_2\text{O}_2$
- $\text{ksantin} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{sečna kislina} + \text{H}_2\text{O}_2$

Uporabili smo Xanthine Oxidase (1,0 – 2,0 encimske enote/mg proteina) iz govejega mleka (kataloška številka X 4500), proizvajalca SIGMA. Hranimo jo pri temperaturi 2 – 8 °C. (13)

Priprava: ker je aktivnost encima ksantin oksidaze odvisna tudi od zunanjih dejavnikov (temperatura, pH, stabilnosti reagenta) smo morali pripraviti različne redčitve ksantin oksidaze. Pripravili smo 350×, 300×, 285×, 250×, 200× redčitve ksantin oksidaze. Primer 300× redčitve: s pipeto smo odmerili 10 µL ksantin oksidaze (suspenzija v 2,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM natrijev fosfatni pufer, pH 7,8, vsebuje 1 mM EDTA in 1 mM natrijev salicilat) in 2990 µL fosfatnega pufra (0,01 M, pH 7,4) in ga do analize hranili na ledu.

Vrednost V_0 je morala biti v intervalu med 0,025 in 0,030 min^{-1} .

Citokrom c: je majhen globularni redoks protein z molekulsko maso 12 kDa iz skupine hemoproteinov, katerih glavna funkcija je prenos elektronov, povezan z reverzibilno spremembo oksidacijskega stanja železa v hemu. Lahko obstaja v oksidirani feri- (Fe^{3+}) ali reducirani fero- (Fe^{2+}) obliki. Skupina hem je odgovorna tudi za rdečo barvo. (29) Pri sesalcih so trije tipi citokromov a, b, c, ki se razlikujejo po svojih prostetičnih skupinah, te pa so vedno molekulske variante hema. Pojavljajo se v dihalni verigi mitohondrijev in v sistemih mitohondrijskih in mikrosomskih monooksidigenaz, kjer sodelujejo v prenosu elektronov med kompleksom III (citokrom c reduktaza) in kompleksom IV (citokrom c oksidaza), med oksidativno fosforilacijo, do kisika. (8)



Slika 4: Struktura citokroma c. Vsebuje eno polipeptidno verigo iz okoli 100 AK ostankov (pri sesalcih 104 aminokislin) in eno prostetično skupino hem, ki je kovalentno vezana na dva cisteinska ostanka (Cys-14 in Cys-17). Dejanski nosilec elektronov citokroma c je hem železo ki je koordinirano vezan na ligande His-18 in Met-80. (29)

Uporabili smo Cytochrome c (oksidirana oblika) iz konjskega srca (kataloška številka C2506), v obliki liofiliziranega praška, proizvajalca SIGMA. Hranjen pri temperaturi -20 °C je stabilen 5 let. (16)

Priprava: 10 mg citokroma c smo raztopili v 1 mL fosfatnega pufra (0,01 M; pH 7,4) in ga do uporabe hranili na ledu. Raztopljen je stabilen 6 mesecev pri -20 °C, 2 tedna pri 2 – 8 °C ali tri dni pri sobni temperaturi 20 – 25 °C. (16)

3.2.2 MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATURE

Pri delu smo uporabljali:

- avtomatske pipete (Eppendorf: 20 – 100 µl; Brand transferpette: 0,5 – 5 mL, 100 – 1000 µl, 10 – 100 µl)
- ustrezno velike nastavke za pipete
- merilno bučko 50 mL
- čašo
- erlenmajerico
- penicilinke s pokrovčki
- posoda za odpad
- posoda s pokrovom za led in led
- žličko
- pinceto

- plastične kivete 1,5 mL, semimikro Brand transferpette® (12,5 × 12,5 × 45 mm), Nemčija
- UV-Visible spektrophotometer 50 Conc proizvajalca Varian, Kalifornija
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra, Slovenija
- precizna tehnica METTLER TOLEDO, AG 245
- pH meter MP 220, Mettler Toledo, Švica

3.2.2.1 SPEKTROFOTOMETER

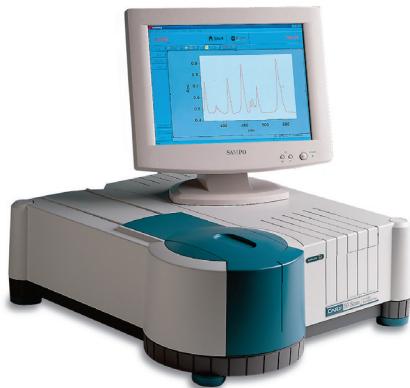
Absorpcijske spektre smo posneli z uporabo UV/VIS spektrofotometra Varian 50 Conc (slika 5). Spektrofotometer je instrument za merjenje absorbance oz. transmitance. Naš spektrofotometer je enožarkovni spektrofotometer. Sestavljen je iz izvora sevanja, mehanizma za izbiro valovne dolžine, vsebnika za vzorec, detektorja in registratorja za zapis signala (slika 6). (14)

Zgradba:

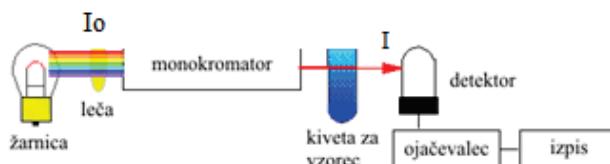
- **Vir sevanja:** Ta spektrofotometer ima kot vir svetlobe ksenonsko žarnico z dolgo življensko dobo. Z njo lahko merimo v območju od 190 do 1100 nm valovne dolžine.
 - UV-svetloba = ultravijolična svetloba, 200 – 400 nm
 - VIS-svetloba = vidna svetloba, 400 – 800 nm
- **Selektor valovne dolžine:**
 - monokromator; sestavljen iz dveh optičnih rež, ki izolirajo svetlobo v ozek snop in iz polikromatske svetlobe naredi monokromatsko. Na detektor pošlje svetlobo ene valovne dolžine.
- **Kiveta z vzorcem:** steklo in plastika za VIS, kvarčno steklo za UV. Vsebniki za vzorce, dolžina 1 cm. Tista stran kivete, kjer potuje skozi žarek svetlobe mora biti gladka in čista, saj to vpliva na točnost merjenja. Uporabili smo plastične kivete 1,5 mL, semimikro BRAND Tranferpette® (Nemčija).
- **Detektor:** pretvori elektro magnetno valovanje v električni impulz, primeren za detekcijo. Za pretvorbo optičnega signala v merljiv električni signal ima naš spektrofotometer vgrajen fotodiodni detektor (Diode array detektor).

- Diode array oz. fotodiodni niz je niz fotosenzitivnih silikonskih diod na silikonskem čipu. Ker leži v žariščni ravnini uklonske mrežice oz. prizme, detektira vse valovne dolžine naenkrat in zato ne potrebujemo monokromatorja.

Delovanje: Vir svetlobe spustimo skozi selektor valovne dolžine in nato skozi kiveto z vzorcem. Tista stran, kjer gre skozi kiveto žarek svetlobe, mora biti gladka in čista, saj to vpliva na točnost merjenja. Monokromator loči posamezne valovne dolžine in jih zaporedno usmerja naprej na fotodetektor. Tu se izmeri intenziteta prepuščene svetlobe (I), ki je manjša od intenzitete vpadne svetlobe (I_0). Sledi izpis iz računalnika.



Slika 5: UV/VIS spektrofotometer Varian 50 Conc (15)



Slika 6: Shema enožarkovnega spektrofotometra (14)

3.2.3 METODA DELA

Kvantitativno določanje koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % (I_{50}).

3.2.3.1 DOLOČANJE SUPEROKSIDDISMUTAZNE AKTIVNOSTI STABILNIH NITROKSIDNIH RADIKALOV

S pomočjo komercialno dostopnega UV/VIS spektrofotometra Varian 50 Conc in umeritvene premice smo kvantitativno določili koncentracijo SOD mimetika, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % (I_{50}).

POSTOPEK:

1. Priprava sistemskih tekočin in reagenov
2. priprava vzorcev:

a) Natehtamo vzorce, pripravimo vzorce s koncentracijo $c = 2 \times 10^{-2} \text{ M} = 20 \text{ mM}$ v metanolu; $V = 2 \text{ mL}$:

Primer: PJM-207

$$M = 184,21 \text{ g/mol}$$

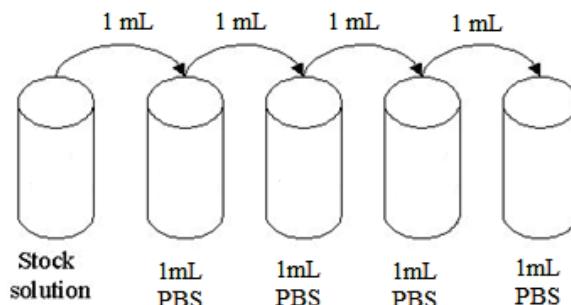
$$m = M \times c \times V$$

b) redčimo $900 \mu\text{L MeOH} + 100 \mu\text{L}$ vzorca iz točke a (20 mM), dobimo $c = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$

$M = 2 \text{ mM}$ raztopino

c) $1800 \mu\text{L pufra} + 200 \mu\text{L}$ vzorca iz točke b (2 mM), dobimo $c = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$

d) pripravimo serijo vzorčnih raztopin z ustreznimi koncentracijami



Slika 7: V prvi penicilinki je osnovna raztopina (stock solution – je raztopina, ki je najbolj koncentrirana in jo lahko nadalje redčimo po potrebi) s koncentracijo $c = 2 \times 10^{-2} \text{ M}$, v drugi je $c = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, v tretji je $c = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$, v četrti je $c = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, v peti je $c = 1,25 \times 10^{-5} \text{ M}$ itd.

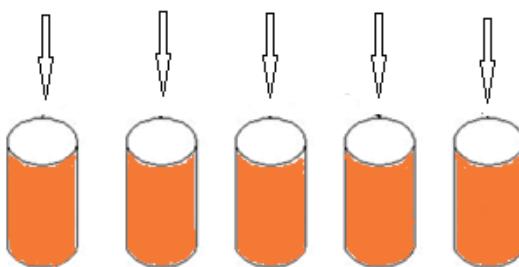
e) pripravimo kivete z reakcijsko mešanico ustreznih koncentracij.

** kontrolni (slepi) vzorec : $VZ_{V_0} = 1715 \mu\text{L PBS} + 124 \mu\text{L}$ citokrom c + $100 \mu\text{L}$ ksantin + $12 \mu\text{L}$ katalaza + $50 \mu\text{L}$ ksantin oksidaza

Ob seriji vzorčnih raztopin, smo vzporedno pripravili še kontrolni vzorec. Ta je bil enake sestave kot vzorčne raztopine, vendar brez dodane raztopine nitroksida. V_0 nam je služil kot kalibracija in predstavlja nezmanjšano hitrost redukcije citokroma c.

** vzorčne raztopine: $VZ_{Vc} = 1515 \mu\text{L}$ PBS + $124 \mu\text{L}$ citokrom c + $100 \mu\text{L}$ ksantin + $12 \mu\text{L}$ katalaza + $50 \mu\text{L}$ ksantin oksidaza + $200 \mu\text{L}$ vzorca ustrezne koncentracije

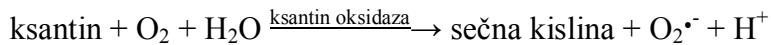
Po dodatku ksantin oksidaze pride takoj do nastanka $\text{O}_2^{\cdot-}$, zato jo dodamo v kiveto tuk pred meritvijo. Kiveto vstavimo v termostatirano ohišje spektrofotometra in vzorec s skupnim volumenom $2000 \mu\text{L}$ dobro premešamo.



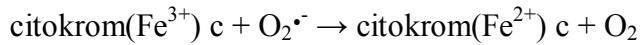
Slika 8: V prvi kiveti je vzorec s $c = 2 \times 10^{-5} \text{ M} = 20 \mu\text{M}$, v drugi je vzorec s $c = 1 \times 10^{-5} \text{ M} = 10 \mu\text{M}$, v tretji je vzorec s $c = 5 \times 10^{-6} \text{ M} = 5 \mu\text{M}$, v četrti je vzorec s $c = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M} = 2,5 \mu\text{M}$, v peti je vzorec s $c = 1,25 \times 10^{-6} \text{ M} = 1,25 \mu\text{M}$ itd.

3. Reakcije potekajo pri sobni temperaturi ($20 - 21 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Temperatura je eden izmed dejavnikov, ki vplivajo na hitrost (hitrostne konstante) encimskih in redoks reakcij, na stabilnost encima (denaturacija) ter na stopnjo ionizacije skupin, ki so udeležene pri katalizi. Reakcije pri povišani temperaturi potekajo hitreje. (33):

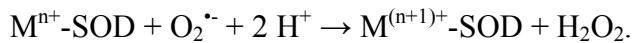
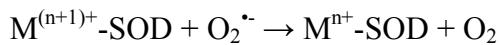
a) S pomočjo encimsko katalizirane reakcije nastane $\text{O}_2^{\cdot-}$



b) Oksidirana oblika citokroma c se reducira s $\text{O}_2^{\cdot-}$. Stopnjo redukcije spremljamo spektrofotometrično pri 550 nm :



c) SOD mimetiki preprečijo redukcijo citokroma c tako, da tekmujejo za reakcijo s $\text{O}_2^{\cdot-}$:

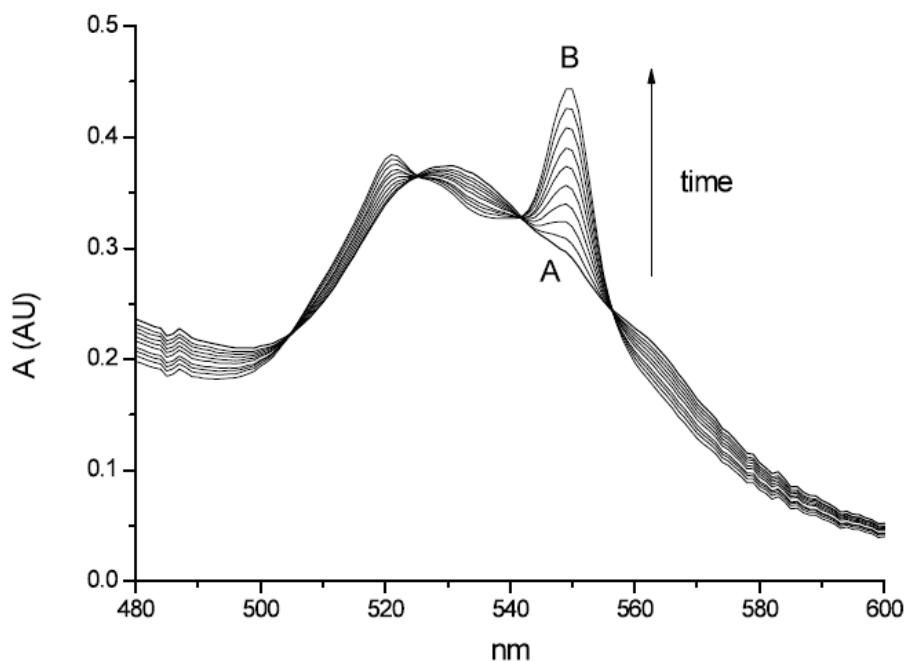


Kjer je $\text{M} = \text{Cu}$ ($n=1$) ; Mn ($n=2$) ; Fe ($n=2$) ; Ni ($n=2$) ali nitroksid! (prirejeno po 36)

- d) Encim katalaza pretvori H_2O_2 v vodo in kisik.

3.2.4 MERITVE

Metoda je avtomatizirana. S pomočjo spektrofotometra smo izmerili hitrost porasta absorbance pri valovni dolžini 550 nm v odvisnosti od časa ($\Delta A/\Delta t$) (vsako minuto analizator naredi 6 meritev). Analiza traja 10 min.



Slika 9: Vis spektri citokroma c v fosfatnem pufru pri pH 7,4, zbrani vsako minuto med tvorbo $\text{O}_2^{\bullet-}$, od časa 0 do 600 sekund, kjer je pri 550 nm dobro vidna hitrost redukcije citokroma c. (36)

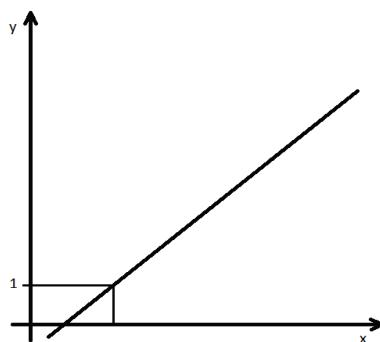
S pomočjo absorpcijske krivulje se izmerjeni signal preračuna v vrednost V_c ($\Delta A/\text{min}$) oz. V_0 .

Preglednica 3: Koncentracije in meritve V_c in V_0 za pripravo umeritvene krivulje

Koncentracija	$V_0 =$	
Vzorec	$V_c = \Delta A/\text{min}$	$V_0/V_c - 1$

REZULTATI:

Rezultat odčitamo iz grafa, v katerega vnesemo na absciso koncentracije raztopin SOD mimetikov (μM), ki smo jih pripravili, na ordinato pa izračunane vrednosti V_0/V_{c-1} iz zgornje tabele. Vrednost I_{50} ustreza koncentraciji kompleksa, za katerega velja $V_0 = 2 \times V_c$, to je $V_0/V_{c-1} = 1$ na premici, ki smo jo dobili z linearnim prileganjem. Pri vrednosti 1 odčitamo molarno koncentracijo SOD mimetika, ki zmanjša redukcijo citokroma c za 50% (I_{50}).



Slika 10: Pri vrednosti 1 iz grafa odčitamo molarno koncentracijo SOD mimetika

Hitrost redukcije citokroma c se ob dodatku vzorca SOD mimetika zmanjša, ker ta tekmuje za O_2^\cdot . Pred in po vsaki seriji meritev vzorčnih raztopin smo izmerili tudi kontrolni vzorec. Ugotovili smo, da spekter kontrolnega vzorca ostaja enak (to je v obliki premice z naklonom $0,025 - 0,030 \text{ min}^{-1}$; odvisno od količine dodane ksantin oksidaze), kar kaže na to, da je encim tekom izvedbe meritve dovolj stabilen in se mu aktivnost ne zmanjša.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel 2007. Za vsak vzorec smo narisali diagram V_0/V_{c-1} v odvisnosti od koncentracije ter s pomočjo umeritvene premice grafično odčitali vrednost koncentracije SOD mimetika, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% (I_{50}). Koncentracijo smo izračunali s pomočjo enačbe premice $y = A \times x + B$ (y = absorbanca, A = naklon krivulje, x = koncentracija, B = presečišče premice z x osjo). Linearno povezavo med spremenljivkami (V_0/V_{c-1} in koncentracijo vzorca) smo ocenili s koeficientom determinacije R^2 .

3.3.1 LINEARNA REGRESIJA

Z linerno regresijo želimo prikazati medsebojno povezavo in linearno odvisnost med spremenljivkama (V_0/V_c) – 1 in koncentracijo analiziranega vzorca, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % (I_{50}) v obliki enačbe premice. Za vsako analizirano spojino smo izračunali regresijsko premico.

Enačba regresijske premice : $y = A \times x + B$

Pri čemer je :

y – absorbanca; B – odmik regresijske premice na ordinati; A – naklon regresijske premice; x – koncentracija (34)

3.3.2 KOEFICIENT DETERMINACIJE

S koeficientom determinacije (R^2) vrednotimo kakovost modela. Je razmerje med pojasnjeno varianco in skupno varianco. Ocenjuje linearno povezavo med spremenljivkama (V_0/V_c) - 1 in koncentracijo analiziranega spojine, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % (I_{50}) določeno z regresijsko premico. Korelacija med spremenljivkami je idealna, če je koeficient determinacije 1.

Koeficient determinacije smo izračunali po formuli: $R^2_{xy} = (\sum (y - y_{pv})^2) / (\sum (y - \bar{y})^2)$

Pri čemer je:

R^2_{xy} – koeficient determinacije,

y – dejanska vrednost dane spremenljivke,

y_{pv} – predvidena vrednost iste spremenljivke y ob znani korelaciji med x in y ter vrednosti x.

(35)

3.3.3 STANDARDNA NAPAKA PREDVIDENIH VREDNOSTI Y ZA VSAK X V REGRESIJI

Standardna napaka (SN) je mera za obseg napake v napovedi y-a za posamezni x . Oceno za standardno napako dobimo na osnovi nepojasnjene variance, ki meri razpršenost točk okoli premice. Za izračun SN smo uporabili statistično funkcijo STEYX v programu Excel (Microsoft Office 2007). (35)

Enačba za standardno napako napovedanega y-a je:

$$SN = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left(\sum (y - y')^2 - \frac{(\sum (x - x')(y - y'))^2}{\sum (x - x')^2} \right)}$$

Pri čemer je:

- n velikost vzorca,
- y matrika ali obseg odvisnih podatkovnih točk,
- y' vzorčna srednja vrednost y,
- x matrika ali obseg neodvisnih podatkovnih točk,
- x' vzorčna srednja vrednost x.

4 REZULTATI

Vrednosti koncentracij stabilnih nitroksidnih radikalov, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% (I_{50}), so prikazane v Preglednici 5. Za kontrolno območje smo vzeli vrednosti kontrolnega (slepega) vzorca $V_0 = 0,026 \pm 0,0058$, ki predstavlja nezmanjšano hitrost redukcije citokroma c. Vrednosti V_0 so odvisne od dodanega encima ksantin oksidaze.

4.1 VREDNOSTI SLEPEGA VZORCA

Pred in po analizi spojin smo izmerili slepi vzorec (V_0) brez prisotnosti testne spojine, ki nam je služil kot kalibracija.

Preglednica 4: Vrednost V_0 pri različnih koncentracijah encima ksantin oksidaze. Srednja vrednost $V_0 = 0,026$. Vrednost 2 SD = 0,0058.

Redčitev V_0	Povprečna vrednost V_0	1 SD
200 ×	0,027	0,0074
250 ×	0,025	0,0018
285 ×	0,027	0,0021
300 ×	0,027	0,0026
350 ×	0,024	0,0008

4.2 SOD-MIMETIČNA AKTIVNOST TESTIRANIH SPOJIN

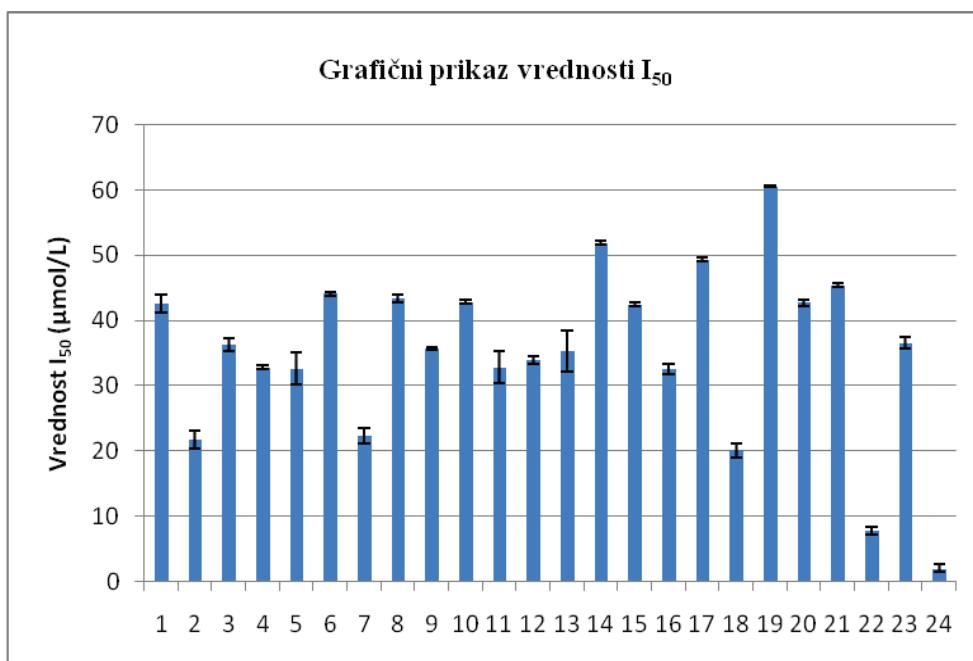
Spojine, ki smo jih analizirali v magistrski nalogi so prikazane v preglednici 5.

Preglednica 5: SOD mimetična aktivnost testiranih spojin izražena kot I_{50} z upoštevanjem SN.

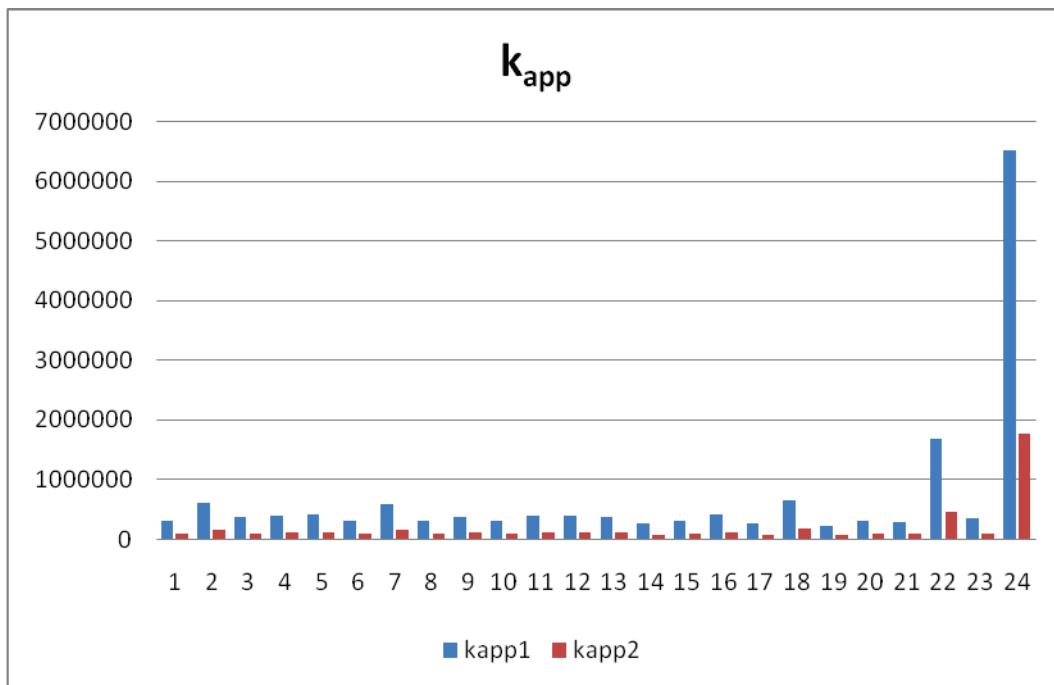
Vzorec	I_{50} μM	SN (±)	Vzorec	I_{50} μM	SN (±)
1	42,64	1,39	13	35,37	3,1
2	21,77	1,31	14	51,92	0,3
3	36,28	0,95	15	42,51	0,21
4	32,9	0,34	16	32,56	0,78
5	32,61	2,45	17	49,38	0,34
6	44,15	0,29	18	20,16	1,08
7	22,34	1,14	19	60,55	0,09
8	43,45	0,56	20	42,79	0,49
9	35,7	0,28	21	45,46	0,29
10	42,9	0,36	22	7,78	0,54
11	32,82	2,48	23	36,66	0,88
12	33,99	0,61	24	1,99	0,59

Iz grafa 1 so razvidne SOD-mimetične aktivnosti testiranih spojin izražene kot vrednosti koncentracij potrebnih za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% (I_{50}), z upoštevanjem SN za spojine, ki izražajo SOD mimetično aktivnost. Vse analizirane spojine so izkazovale SOD mimetično aktivnost.

Graf 1: Graf koncentracij, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50%, z upoštevanjem SN.



Iz grafa 2 so razvidne vrednosti izračunanih katalitičnih konstant reakcije superoksidu z nitroksidom (k_{app}). Izbrali smo dve različni vrednosti za konstanto; $k_{\text{cyt cIII+superoksid}} = 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (38) ter $k_{\text{cyt cII+superoksid}} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (29).

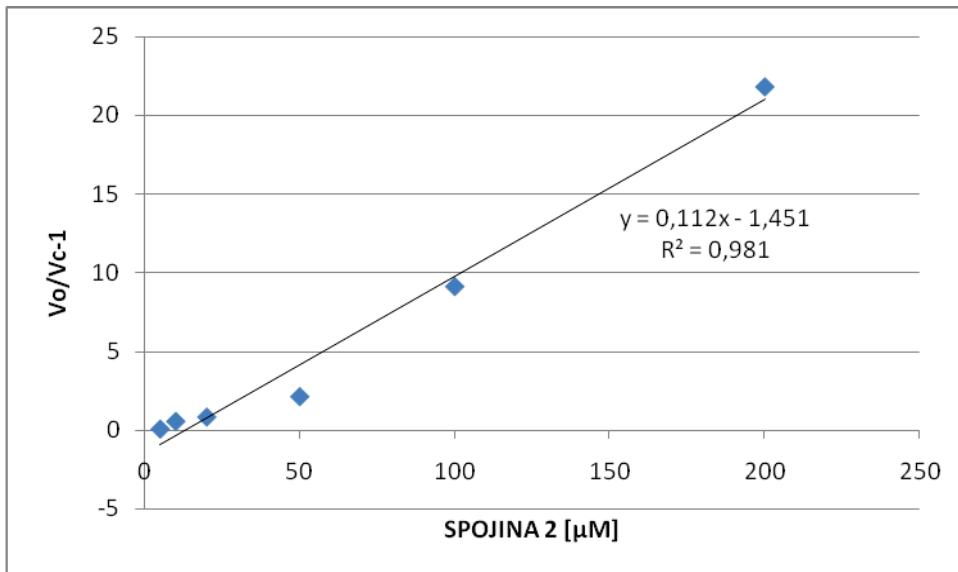
Graf 2: Katalitične konstante vzorcev 1 – 24

4.2.1 PRIMER DOLOČITVE VREDNOSTI I_{50}

Preglednica 6: Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c pri različnih koncentracijah spojine

SPOJINA 2 [μM]	V_0	$V_c = \Delta A/\text{min}$	$V_0/V_c - 1$
5	0,0274	0,0252	0,087301587
10	0,0274	0,0174	0,574712644
20	0,0274	0,0148	0,851351351
50	0,0274	0,0087	2,149425287
100	0,0274	0,0027	9,148148148
200	0,0274	0,0012	21,83333333

Graf 3: Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% (I_{50}). Vrednost I_{50} za vzorec 2 je $21,77 \pm 1,31 \mu\text{mol/L}$.



Izračun enačbe regresijske premice je: $y = 0,1126x - 1,4516$.

Vrednost koeficienta determinacije R^2 znaša 0,9811.

Vrednost I_{50} za spojino 2 je $21,77 \pm 1,31 \mu\text{mol/L}$.

Katalitična konstanta reakcije superoksidu z nitroksidom $k_{\text{app}1}$ za spojino 2 je $5,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{app}2}$ je $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

5 RAZPRAVA

Naključno nastajanje radikalov v organizmu, je zaradi dobre antioksidativne zaščite zelo majhno. V primeru, da se antioksidativna zaščita zmanjša in oksidacijska obremenitev poveča, govorimo o oksidativnem stresu. Čeprav takrat igra encim superoksid dismutaza pomembno vlogo v obrambi organizma, uporaba samega encima v terapevtske namene zaradi njegovih lastnosti (imunske reakcije, neobstojnost v prebavnem traktu, zaradi velikosti in naboja ne more prehajati skozi membrano celice, kratek razpolovni čas, nizka biološka uporabnost in alergenost) ni primerna. Da bi se temu izognili, je razvoj stekel v smeri razvoja SOD mimetikov, ki oponašajo delovanje nativnega encima.

V magistrsko nalogu smo vključili 21 nitroksidov, H₂-salen in dva salenova kompleksa. Zaradi njihove sposobnosti reagiranja z radikali, jih lahko uporabljamo kot antioksidante. Nitroksidi so pet-, šest- ali sedem- členski nasičeni ali deloma nasičeni heterocikli, ki vsebujejo vsaj en dušikov atom. Spojine **5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21** so nitroksidne spojine piperidinskega tipa; spojina **4** je nitroksid pirolidinskega tipa; spojine **1, 2, 3** so nitroksidi pirolinskega tipa; spojina **19** je nitroksid oksazolidinskega tipa; spojina **18** pa je nitroksid diazepinskega tipa s sedem-členskim laktamskim obročem. Spojine **22, 23, 24** so: bakrov kompeks salena (**22**), H₂-salen (**23**) in manganov kompleks salena (**24**). Fizikalno-kemične in biološke lastnosti spojin, med katere sodi tudi SOD mimetična aktivnost, so odvisne od zgradbe molekule, še zlasti od prisotnosti nekaterih funkcionalnih skupin, med katerimi je najpomembnejša nitroksidna skupina, ki lahko vstopa v enoelektronske redoks reakcije.

Vsem nitroksidom smo z UV-VIS spektrofotometrično indirektno metodo po Fridovich-u določili SOD mimetično aktivnost. Metoda je uporabna za preučevanje reakcijske kinetike superoksidov, preko kompetitivne reakcije nitroksida ter citokroma c. Za tvorbo O₂^{•-}, ki ga potrebujemo pri merjenju SOD mimetične aktivnosti, smo uporabili ksantin oksidazo in ksantin. Da smo se izognili nastanku OH[•], smo v reakcijo vključili še katalazo. S pomočjo spektrofotometra smo izmerili hitrost porasta absorbance pri valovni dolžini 550 nm v odvisnosti od časa ($\Delta A/\Delta t$) in določili koncentracijo SOD mimetika, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% (I_{50}).

Kinetično je SOD znan kot eden najhitrejših encimov v naravi. Kinetične konstante velikosti $2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ kažejo, da je hitrost dismutacije omejena le z difuzijo superoksidnega radikala v aktivno mesto encima. (1) Katalitična konstanta SOD mimetikov, je pri fiziološkem pH 2 – 3 velikostne razrede nižja ($100 - 1000 \times$ manjša) kot pri SOD. (5) Efekt dismutacije je bil prisoten pri vseh vzorcih **1 - 24**.

Po podatkih, dosegljivih iz literature, smo po dani enačbi izračunali katalitične konstante (k_{app}) vzorcev:

$$V/v = 1 + [\text{nitroksid}] * k_{app}/[\text{cyt c}^{\text{III}}] * k_{\text{cyt cII+superoksid}}$$

V in v sta hitrosti reakcije v odsotnosti in prisotnosti nitroksida, $k_{\text{cyt cII+superoksid}}$ je konstanta reakcije citokroma c s superoksidom $= 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (38) oz $k_{\text{cyt cII+superoksid}} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (29). V literaturi opisane raziskave predvidevajo, da je reaktivnost s superoksidom večja pri nitroksidih z nižjim redoks potencialom. (41) Odnos med encimsko kinetiko in redoks potencialom pa namiguje na to, da imajo nitroksidi z nižjim redoks potencialom večje kinetične konstante k_{app} v območju med 10^6 do $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (30, 5, 28). Naši rezultati so bili pri vseh nitroksidih za 1 – 2 velikostna razreda manjši kot v opisani referenci (30, 5, 28) (10^5 do $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ oz. 10^4 do $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, odvisno od vrednosti $k_{\text{cyt cII+superoksid}}$), razen pri vzorcih **22** in **24**, ki sta salenova kompleksa ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Za določitev SOD mimetične aktivnosti, so nekaj nitroksidom določili velikost redoks potenciala redoks para oksoamonijev kation/nitroksid. (41) Tudi naši rezultati vzorcev **5**, **6**, **19** in **20** (vzorci, ki smo jih lahko primerjali) so pokazali, da nižji kot je potencial, večja je hitrost konstante.

V literaturi ni enotnega stališča glede vrednosti konstante hitrosti reakcije nitroksida s superoksidom. Vzrok je lahko v tem, da so poizkuse izvedli pod drugačnimi pogoji (npr.: konstanta hitrosti reakcije nitroksida s superoksidom v prisotnosti cisteina $10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (32)). Držali smo se Fridovich-ovega testa kot je opisan v viru 36. Da bi bili rezultati iz virov primerljivi, bi morali vsi meriti aktivnost referenčne spojine npr. Mn-SALEN-a. Poenotiti bi morali tudi metode za nastanek superoksidnega radikala. Pulzna radioliza vode je namreč manj primerna metoda za preučevanje kinetike superoksidov, saj so njihove reakcije z antioksidanti prepočasne ($< 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) in jih zato težko merimo. (37) Kinetične konstante reakcij s supeoksidom, nastalega s pomočjo encimske reakcije, so ponavadi nižje (reakcije so počasneješe) kot pri neencimski dismutaciji. (38)

Upoštevati moramo tudi morebitno prisotnost nezaželjenih reakcij med samim postopkom. Nitroksid lahko preko inhibicije encima ksantin oksidaze zavira nastajanje superoksidu, lahko neposredno oksidira citokrom c, radikal, ki nastane med superoksidom in nitroksidom pa lahko reagira s citokromom c. (37) Dokazali so, da je oksidacija reduciranega citokroma c v prisotnosti encima katalaze zanemarljiva. (39)

SOD-mimetična aktivnost testiranih vzorcev, izražena kot vrednost koncentracije potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% (I_{50}), je obratno sorazmerna kinetični konstanti vzorca k_{app} . Večja kot je I_{50} , manjša je k_{app} in manjša je SOD mimetična aktivnost nitroksida.

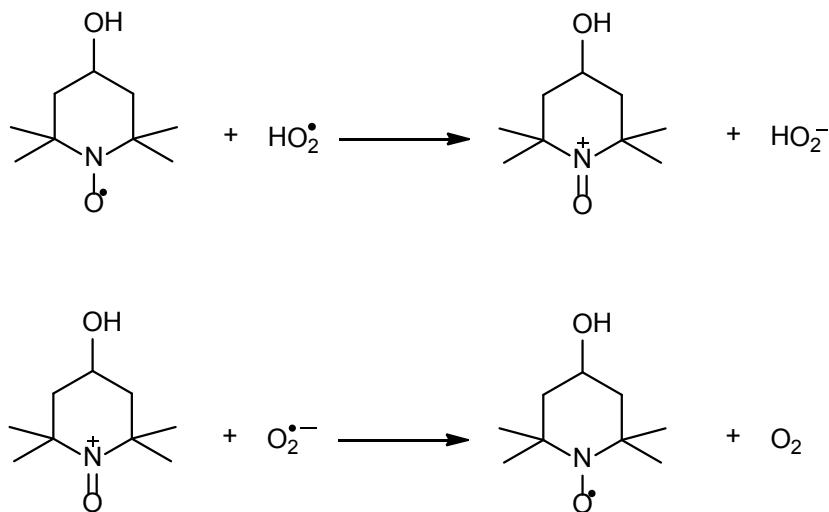
Heterociklični nitroksidi s pet- in šest-členskimi obroči lahko prehajajo celično membrano ter varujejo različne biološke sisteme pred oksidativnimi poškodbami. Novejše študije poročajo o tem, da je reaktivnost cikličnih nitroksidov s superoksidom bolj odvisna od velikosti obroča kot od stranske verige. (28) Nitroksidni derivati s supeoksidom reagirajo počasi in so relativno neučinkoviti mimetiki pri fiziološkem pH. Pravijo, da imajo piperidinski nitroksidi izmed vseh največjo SOD mimetično aktivnost, ki pa je še vedno $1000 \times$ manjša od nativne SOD aktivnosti pri pH 7,4. (28) Iz naših rezultatov lahko razberemo, da je SOD mimetična aktivnost neodvisna od velikosti obroča, saj skupino vzorcev z najboljšo in najslabšo SOD mimetično aktivnostjo tvorijo različni heterocikli; **18** (sedem-členski obroč, $I_{50} = 20,16 \mu\text{M}$), **2** (pet-členski obroč, $I_{50} = 21,77 \mu\text{M}$) in **7** (šest-členski obroč, $I_{50} = 22,34 \mu\text{M}$), ter spojini **14** (šest členski obroč, $I_{50} = 51,92 \mu\text{M}$) in **19** (pet-členski obroč, $I_{50} = 60,55 \mu\text{M}$), z najslabšo aktivnostjo. Učinki nitroksidov niso odvisni niti od števila obročev. Vzorec **13** ($I_{50} = 35,37 \mu\text{M}$) izkazuje podobno SOD mimetično aktivnost kot vzorca **5** ($I_{50} = 32,61 \mu\text{M}$) in **12** ($I_{50} = 33,99 \mu\text{M}$), ki imata v svoji strukturi samo en piperidinski obroč. Rezultati kažejo na to, da so katalitične konstante nitroksidov s petčlenskim obročem podobne tistim s šest-členskim obročem. Sklepamo lahko tudi, da velikost stranske skupine piperidinov ne vpliva na SOD mimetično aktivnost nitroksida, saj so vzorci **20** ($I_{50} = 42,79 \mu\text{M}$), **8** ($I_{50} = 43,45 \mu\text{M}$), **6** ($I_{50} = 44,15 \mu\text{M}$) in **21** ($I_{50} = 45,46 \mu\text{M}$) z majhno stransko skupino izkazali podobno SOD mimetično aktivnost kot vzorca **10** ($I_{50} = 42,9 \mu\text{M}$) in **15** ($I_{50} = 42,51 \mu\text{M}$) z večjo stransko skupino. Tega ne moremo trditi za pirolinske derivate nitroksida **1** ($I_{50} = 42,64 \mu\text{M}$), **2** ($I_{50} = 21,77 \mu\text{M}$), **3** ($I_{50} = 36,28 \mu\text{M}$). Njihova reaktivnost je odvisna od funkcionalne skupine. Sledijo si v zaporedju alkohol < amid < karboksilna skupina, kar je značilno za reaktivnost funkcionalnih skupin v organski kemiji (alkohol < keton < aldehid < amid < karboksilna

kislina < ester). (31) Vzorec **2** izkazuje dvakrat večjo aktivnost kot vzorec **1**. Spojina **2** ima v svoji strukturi -COOH skupino, ki je v testni raztopini pri pH 7,4 v disociirani obliki (-COO⁻), kar doprinese k boljši topnosti spojine v vodnem mediju. Negativni naboje tudi ugodno vpliva na redoks potencial. Spojina tako postane učinkovit odstranjevalec O₂^{•-}. Tudi ESR študije so pri spojinah s COOH stransko skupino pokazale visoko reaktivnost. (30)

Podatki v literaturi navajajo, da vodikov atom na C4 poziciji piperidinskega obroča nima bistvenega vpliva na proces dismutacije. Hkrati pa v istem viru najdemo podatek, da so spojine brez vodikovega atoma vseeno manj reaktivne kot tiste z vodikovim atomom na C4 poziciji. (30) Vzorci **8** ($I_{50} = 43,45 \mu\text{M}$), **20** ($I_{50} = 42,79 \mu\text{M}$), **21** ($I_{50} = 45,46 \mu\text{M}$), **6** ($I_{50} = 44,15 \mu\text{M}$), **5** ($I_{50} = 32,61 \mu\text{M}$) so piperidinskega tipa, na C4 lahko vsebujejo manjšo stransko skupino in vodikov atom. Vzorci so izkazovali podobno dismutacijsko sposobnost. Vzorec **5** je bil najbolj reaktiv med njimi. Na C4 poziciji piperidinskega obroča sta prisotna dva vodikova atoma.

Reakcije oksidacije in redukcije (redoks reakcije) so pomembne v živih organizmih, saj imajo ključno vlogo pri kemičnih, fotokemičnih in bioloških procesih pridobivanja energije. Po drugi strani pa so redoks reakcije vključene tudi v destruktivne procese, ki škodujejo živim organizmom (nastanek RNS in ROS). Nitrokside pogosto uporabljajo za kvantitativno karakterizacijo redoks procesov in radikalnih poškodb v celicah ter celičnih organelih. Za preučevanje takih procesov izkoriščajo lastnosti nitroksidov, da nastopajo v reakcijah redukcije nitroksida z reducentom do hidroksilamina, oksidacijah nitroksida do oksoamonijskega kationa ter oksidacijah hidroksilamina z oksidantom do nitroksida. Eden izmed najbolj preučevanih stabilnih nitroksidnih radikalov je nedvomno vzorec **6, tempol**, ($I_{50} = 44,15 \mu\text{M}$), z že znanimi antioksidativnimi lastnostmi. (17, 32)

Shema 5: Oksidacija nitroksida s superoksidom do oksoamonijevega kationa (katalitična odstranitev superoksidu s pomočjo redoks para nitroksid/oksoamonijev kation). Redukcija oksoamonijevega kationa do nitroksida (glede na hitrostno konstanto reakcije in na količino superoksidu v celicah, bi bila ta oksidacija v telesu relativno počasna).



V naši raziskavi je devetnajst vzorcev izkazovalo večjo SOD mimetično aktivnost kot vzorec **6**. Iz tega bi lahko sklepali, da so tudi vzorci, ki izkazujejo podobno in celo boljšo SOD mimetično aktivnost, primerni za nadaljnje raziskave.

Piperidinski, pirolidinski in oksazolidinski nitroksidi so v primerjavi z nativnim SOD lahko en do tri velikostne razrede slabši SOD mimetiki kot kovinski kompleksi salena. (28) Naši vzorci so izkazali ustrezeno SOD-mimetično aktivnost, ki je bila za en velikostni razred manjša od salenovih kompleksov **22** ($I_{50} = 7,78 \mu\text{M}$), **24** ($I_{50} = 1,99 \mu\text{M}$). Kovinski kompleks H_2 -salen **23** lahko odstranjuje superoksid, vodikov peroksid, reagira s peroksinitritnim anionom in peroksidu v maščobah. Spojini **22** ($I_{50} = 7,78 \mu\text{M}$) in **24** ($I_{50} = 1,99 \mu\text{M}$) imata v svoji strukturi Mn^{3+} oz Cu^{2+} kot liganda in kažeta visoko SOD-mimetično aktivnost, za razliko od spojine **23** ($I_{50} = 36,66 \mu\text{M}$), ki v svoji strukturi ne nosi kovinskega iona in ima temu primerno manjšo SOD mimetično aktivnost. Kljub temu izkazuje spojina **23** nitroksidom primerljivo SOD-mimetično aktivnost. Strukturna posebnost salenskih antioksidantov je, da je centralni kation elementa prehodne kovine koordinativno vezan z dvema kisikovima in dvema dušikovima atomoma. To omogoča tvorbo več valenčnih stanj, ki vsa omogočajo odstranjevanje velikega števila ROS/RNS. (1)

Poleg salenovih kompleksov je najboljšo SOD mimetično aktivnost pokazala spojina **18** ($I_{50} = 20,16 \mu\text{M}$). Spojina **18** ima v svoji strukturi sedem-členski laktamski obroč.

Vzorec **14** ($I_{50} = 51,92 \mu\text{M}$), je eden izmed vzorcev z najmanjšo SOD mimetično aktivnostjo.

Vzorec **9** ($I_{50} = 35,7 \mu\text{M}$) je kvarterna amonijeva sol s permanentnim pozitivnim nabojem. Jodid (Γ) s superoksidom oz. HO_2^\bullet reagira izredno počasi, če sploh, zato lahko njegovo prisotnost v strukturi zanemarimo. (28) Spojina je dobro topna v vodi, pozitivni naboja pa neugodno vpliva na redoks potencial, zato spojina ni tako učinkovit SOD-mimetik.

Spojini **17** ($I_{50} = 49,38 \mu\text{M}$) vsebuje večjo hidrofobno stransko skupino (zaščiteni aminokislina fenilalanin), ki vpliva na topnost v vodnem mediju. Spojina verjetno vstopa v interakcijo s proteini v reakcijski raztopini preko hidrofobnega efekta.

Spojina **19** ($I_{50} = 60,55 \mu\text{M}$) je edini predstavnik oksazolidinov in izkazuje najslabšo SOD mimetično aktivnost med našimi vzorci ($k_{app} 1 = 2,15 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{app} 2 = 5,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), kar je primerljivo s podatki iz literature, ki navaja podatek $k_{app} = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (28) Oksazolidini se ne oksidirajo zlahka. Hitreje se reducirajo do hidroksilaminov. Elektronegativni kisik stabilizira negativni naboja na obroču, ko se tvori anion in destabilizira pozitivni naboja, ko se tvori kation. (41)

6 SKLEP

Nitroksidi lahko zmanjšajo oksidativni stres. Vsi vzorci so izkazovali SOD mimetično aktivnost in katalizirali reakcijo pretvorbe $O_2^{\cdot-}$ do O_2 in H_2O_2 , podobno kot encim SOD.

Noben vzorec ni izkazoval tako dobre SOD mimetične aktivnosti kot nativni encim SOD (kinetične konstante velikosti $1,5 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$) (2).

Spojina **18** je izkazovala najboljšo SOD mimetično aktivnost med nitroksidi. Je nitroksid z majhno molekulsko maso, diazepinskega tipa s sedem-členskim laktamskim obročem in zato potencialno zanimiv za nadaljnje študije.

Glede na to, da so bili pridobljeni zelo dobri rezultati pri raziskovanju tempola (32), bi bilo smiselno naprej raziskovati vzorce, ki so izkazovali boljšo SOD mimetično aktivnost kot tempol.

Rezultati kažejo, da so katalitične konstante nitroksidov s petčlenskim obročem podobne tistim s šest-členskim obročem.

7 LITERATURA

1. Perdih A., Pečar S.: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. Pregledni članek; Farm. vest. 57; 2006: 24 – 29.
2. Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C.: Free radicals in biology and medicine. 4. izdaja Oxford University Press,: 2007; 81 – 95, 105 – 109
3. Mravljak J., Peterlin-Mašič L.: Resnice in polresnice o antioksidantih. V: Vovk, Tomaž (ur.), Obreza, Aleš (ur.). Prehranska dopolnila II: strokovno izobraževanje. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo: 2010; 7-31.
4. Salvemini D., Riley D.P., Cuzzocrea S.: SOD mimetic are coming of age; Nat. Publ. gr. Drug disc.: 2002; 1: 367 - 374
5. Soule P. B., Hyodo F., Matsumoto K., Nicole L. S., Cook J. A., Krishna M.C., Mitchell J. B.: The chemistry and biology of nitroxide compounds; Free Rad. Bio. Med.: 2007; No. 42: 1632–1650
6. Pečar S.: Radikali v našem okolju. Kemija v šoli: 2006; letnik 18, št. 2: 26 – 30
7. Ješe J. V.: Koncentracija malondialdehida v krvni plazmi in seču kot indikator peroksidacije lipidov v prehranskih raziskavah, magistrska naloga; 2001
8. Slovenski medicinski slovar. Univerza v Ljubljani: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Inštitut za Slovenski jezik Frana Ramovša Znanstvenoraziskovalnega centra SAZU, Zdravniška zbornica Slovenije: 2002
9. Spremni list reagenta: Xanthine (X0626), SIGMA. Dostopen na: <http://www.sigmaaldrich.com> (januar 2012)
10. Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C.: Free radicals in biology and medicine. 4. izdaja Oxford University Press: 2007; 40 – 42, 66 – 68
11. Spremni list reagenta: Catalase (280743), SIGMA. Dostopen na: <http://www.sigmaaldrich.com> (januar 2012)
12. Obreza A.: Molibden kot pomemben element v sledovih. Pregledni članek; Farm. vest. 59; 2008: 16 – 20
13. Spremni list reagenta: Xanthine Oxidase (X4500), SIGMA. Dostopen na: <http://www.sigmaaldrich.com> (januar 2012)
14. Stopar P.: Vrednotenje od pH odvisnih fluorescentnih spojin rodaminskega tipa. Magistrska naloga, 2012
15. <http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/Cary%2050%20UV-Vis-brochure.pdf> (januar 2013)

16. Spremni list reagenta: Cytochrome c from equine heart (C2506), SIGMA. Dostopen na: <http://www.sigmaldrich.com> (januar 2012)
17. Ojsteršek T.: Sinteza dvojnih fluorescenčno-spinskih označevalcev kumarinskega tipa. Diplomska naloga, 2011
18. Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C.: Free radicals in biology and medicine. 4. izdaja Oxford University Press: 2007; 268 – 340
19. Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C.: Free radicals in biology and medicine. 4. izdaja Oxford University Press: 2007; 42 - 45
20. Bar On P., Mohsen M., Zhang R., Feigin E., Chevion M., Samuni A.: Kinetics of nitroxide reaction with Iron(II); J. Am. Chem. Soc.: 1999; 121: 8070 – 8073
21. Zhao L.: Singlet Oxygen: 2001. Dosegljivo na:
<http://www.healthcare.uiowa.edu/corefacilities/esr/education/2001/1/zhaol-paper1.pdf> (april 2013)
22. Macmillan-Crow L. A., Cruthirds D. L.: Manganese superoxide dismutase in disease; Free Rad. Res.: 2001; Vol. 34, No. 4: 325-336
23. Flohe L.: Superoxide dismutase for therapeutic use: Clinical experience, dead ends and hopes; Molec. Cell. Biochem.: 1988; 84: 123 – 131
24. Offer T., Russo A., Samuni A.: The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics; The Faseb J.: 2000; 14: 1215 – 1223
25. Černe D., Ostanek B.: Biomedicinska analitika I. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2012
26. Mravljak J., Pečar S.: "Dobri" in "zli" soudeleženci življenjskih procesov : radikali. *Delo (Ljubl.)*: 10. jun. 2010; leta 52, št. 132, str. 24
27. Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C.: Free radicals in biology and medicine. 4. izdaja Oxford University Press: 2007; 22 – 29, 46 - 50
28. Goldstein S., Samuni A., Hideg K., Merenyi G.: Structure-activity relationship of cyclic nitroxides as SOD mimics and scavengers of nitrogen dioxide and carbonate radicals; J. Phys. Chem. A.: 2006; 110: 3679 – 3685
29. Wegerich F.: Engineered human cytochrome c: Investigation of superoxide and proteinprotein interaction and application in bioelectronic systems. Doktorska naloga, 2010
30. Yamasaki T., Matsouka Y., Mito F., Yamato M., Yamada K.: Redox potential of nitroxides is an index to evaluate superoxide dismutase mimic activity; Asian J. Org. Chem.: 2013, 2: 388–391.

31. <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?id=1350> (maj 2013)
32. Wilcox S. C., Pearlman A.: Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides; Pharm. Rev.: 2008; Vol. 60, No. 4: 418 – 469
33. Boyer R.: Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba, 2005
34. Adamič Š.: Temelji biostatistike, 2. izdaja, Univerza Edvarda Kardelja Ljubljana, 1989
35. Kuzman J.: Določanje superoksid dismutazne aktivnosti izbranim spojinam z aminskimi, oksimskimi, hidroksilaminskimi ali nitroksidnimi skupinami. Magistrska naloga, 2013
36. Lanza V., Vecchio G.: A bioinorganic laboratory experiment: synthesis of SOD mimics. A Bioinorganic Laboratory Experiment; J. Chem. Educ.: 2009; Vol. 86, No. 12: 1419 – 1421
37. Halliwell B.: Antioxidant characterization; Biochem. Pharm.: 1995; Vol. 49, No. 10: 1341 – 1348
38. Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C.: Free radicals in biology and medicine. 4. izdaja Oxford University Press: 2007; 35 – 50, 285 – 286
39. Weiss RH, Flickinger AG, Rivers WJ, Hardy MM, Aston KW, Ryan US, and Riley DP: Evaluation of activity of putative superoxide dismutase mimics: direct analysis by stopped-flow kinetics; J. Biol. Chem.: 1993; 268: 23049 – 23054.
40. Laszlo W.: Characteristics of radical reactions, spin rules, and a suggestion for the consistent use of a dot on radical species; J. Chem. Educ.: 2011; 88: 1658–1662
41. Hodgson L.J., Namazian M., Bottle E.S., Coote L.M.: One-electron oxidation and reduction potentials of nitroxide antioxidants: A theoretical study; J.Phys. Chem. A: 2007, 111, 13595 – 13605