

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA KUZMAN

MAGISRSKA NALOGA

Magistrski študijski program laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA KUZMAN

**DOLOČANJE SUPEROKSID DISMUTAZNE AKTIVNOSTI IZBRANIM  
SPOJINAM Z AMINSKIMI, OKSIMSKIMI, HIDROKSILAMINSKIMI ALI  
NITROKSIDNIMI SKUPINAMI**

**DETERMINATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE LIKE ACTIVITIES OF  
SELECTED COMPOUNDS CONTAINING AMINE, OXIME, HYDROXYLAMINE  
OR NITROXIDE GROUPS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku za pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Za pomoč hvala tudi osebju v laboratoriju na Katedri za farmacevtsko kemijo.

Zahvalila bi se tudi družini za podporo na moji študijski poti ter vsem prijateljem za vse spodbudne besede. Še posebej se zahvaljujem moji sestri Sabini Kuzman, ki mi je v času pisanja magistrske naloge stala ob strani in mi nudila pomoč pri nastanku magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi Toniju Križniku za neizmerno ljubezen in podporo.

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

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka.

Jasna Kuzman

Ljubljana, 2013.

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos

Član komisije: asist. dr. Vid Mlakar

**KAZALO VSEBINE**

|                                             |      |
|---------------------------------------------|------|
| POVZETEK .....                              | IV   |
| ABSTRACT .....                              | V    |
| SEZNAM OKRAJŠAV .....                       | VII  |
| SEZNAM SLIK.....                            | VIII |
| SEZNAM SHEM.....                            | VIII |
| SEZNAM PREGLEDNIC .....                     | VIII |
| SEZNAM GRAFOV .....                         | IX   |
| 1 UVOD.....                                 | 1    |
| 1.1 OKSIDATIVNI STRES .....                 | 1    |
| 1.1.1 Posledice oksidativnega stresa .....  | 1    |
| 1.2 REAKTIVNE KISI KOVE SPOJINE .....       | 2    |
| 1.2.1 Nastanek ROS .....                    | 2    |
| 1.3 ZNAČILNOSTI RADIKALOV .....             | 4    |
| 1.4 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM .....   | 5    |
| 1.5 ANTIOKSIDANTI .....                     | 5    |
| 1.6 VRSTE ANTIOKSIDANTOV .....              | 6    |
| 1.6.1 Encimski antioksidanti .....          | 6    |
| 1.6.1.1 Superoksidna dismutaza (SOD).....   | 6    |
| 1.6.1.2 Katalaza .....                      | 9    |
| 1.6.1.3 Glutation peroksidaza (GPx) .....   | 9    |
| 1.6.2 Antioksidanti, ki niso encimi .....   | 9    |
| 1.7 SOD MIMETIKI.....                       | 10   |
| 1.8 PRINCIP DOLOČANJA ROS IN RNS .....      | 12   |
| 1.8.1 Določanje SOD .....                   | 12   |
| 1.8.1.1 Indirektna metoda .....             | 13   |
| 1.9 UV-Vis SPEKTROSKOPIJA .....             | 14   |
| 1.9.1 Sestava UV-Vis spektrofotometra.....  | 15   |
| 1.9.2 Uporaba UV-Vis spektrofotometra ..... | 15   |
| 2 NAMEN NALOGE .....                        | 16   |
| 3 MATERIALI IN METODE DE LA.....            | 17   |
| 3.1 MATERIALI .....                         | 17   |

|         |                                                                                                                                                 |    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1   | Spojine s SOD mimetičnim delovanjem .....                                                                                                       | 17 |
| 3.1.1.1 | Priprava spojin.....                                                                                                                            | 17 |
| 3.1.2   | Kemikalije in reagenti .....                                                                                                                    | 17 |
| 3.1.3   | Osnovne raztopine in njihova priprava .....                                                                                                     | 18 |
| 3.1.4   | Merilni pripomočki in aparati .....                                                                                                             | 20 |
| 3.2     | METODE DELA .....                                                                                                                               | 21 |
| 3.2.1   | Kvantitativno določanje koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) .....                | 21 |
| 3.2.1.1 | Izvedba metode.....                                                                                                                             | 21 |
| 3.3     | STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....                                                                                                             | 23 |
| 3.3.1   | Linearna regresija.....                                                                                                                         | 23 |
| 3.3.2   | Koeficient determinacije .....                                                                                                                  | 24 |
| 3.3.3   | Standardna napaka predvidenih vrednosti y za vsak x v regresiji.....                                                                            | 24 |
| 4       | REZULTATI .....                                                                                                                                 | 25 |
| 4.1     | ŠTEVILO OPRAVLJENIH MERITEV .....                                                                                                               | 25 |
| 4.2     | KVANTITATIVNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE, KI JE POTREBNA ZA<br>ZMANJŠANJE HITROSTI REDUKCIJE CITOKROMA C ZA 50 % ( $I_{50}$ ).....                 | 25 |
| 4.3     | KONCENTRACIJE, KI SO POTREBNE ZA ZMANJŠANJE HITROSTI<br>REDUKCIJE CITOKROMA C ZA 50 % ( $I_{50}$ ) PRI IZBRANIH SPOJINAH .....                  | 26 |
| 4.3.1   | Analizirane spojine.....                                                                                                                        | 26 |
| 4.3.2   | Grafični prikaz vseh vrednosti $I_{50}$ .....                                                                                                   | 28 |
| 4.3.3   | Vrednosti $I_{50}$ .....                                                                                                                        | 29 |
| 4.3.3.1 | Salenov kompleks z manganom .....                                                                                                               | 29 |
| 4.3.3.2 | Nitroksidi .....                                                                                                                                | 29 |
| 4.3.3.3 | Hidroksilamin .....                                                                                                                             | 33 |
| 4.3.3.4 | Oksimi .....                                                                                                                                    | 34 |
| 4.3.3.5 | Amini .....                                                                                                                                     | 36 |
| 4.3.3.6 | Kompleks z manganovim acetatom.....                                                                                                             | 38 |
| 4.3.4   | Prikaz izračuna koncentracije iz umeritvene krivulje, ki je potrebna za<br>zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) ..... | 39 |
| 4.3.4.1 | Salenov kompleks z manganom .....                                                                                                               | 39 |
| 4.3.4.2 | Nitroksidi .....                                                                                                                                | 39 |
| 4.3.4.3 | Hidroksilamin .....                                                                                                                             | 43 |

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 4.3.4.4 Oksimi .....                        | 44 |
| 4.3.4.5 Amini .....                         | 45 |
| 4.3.4.6 Kompleks z manganovim acetatom..... | 47 |
| 5 RAZPRAVA.....                             | 48 |
| 6 SKLEPI.....                               | 52 |
| 7 LITERATURA .....                          | 53 |

## POVZETEK

Oksidativni stres je izraz, ki opisuje različne škodljive procese, ki so posledica porušanja ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici. Nastane zaradi prekomernega nastajanja radikalov in reaktivnih intermediatov ter zmanjšanja učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Radikali nenehno nastajajo v celični presnovi in predstavljajo obrambni mehanizem pred okužbami. So atomi, ioni ali molekule, ki imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron. Radikali so zelo reaktivni in nestabilni, zaradi česar hitro reagirajo z molekulami in spojinami, da zapolnijo vrzeli na energijskem nivoju. Če se njihova količina v celicah poveča do te mere, da so presežene antioksidantne kapacitete celice, pride do spremembe v strukturi membrane in poškodbe membranskih proteinov in je posledično celica smrtno ogrožena. ROS je izraz, s katerim opisujemo vrsto molekul in radikalov, ki izvirajo iz molekule  $O_2$ . Antioksidativni obrambni sistem je naravni obrambni sistem v telesu, v katerega uvrščamo številne spojine, ki so v zelo nizkih koncentracijah sposobne preprečiti nastajanje radikalov. Encim SOD predstavlja prvo in najpomembnejšo linijo med antioksidanti, ki odstranjujejo radikale in ROS. Ker sam encim v terapevtski uporabi zaradi nezaželenih imunskih reakcij ni dal želenih rezultatov, je razvoj stekel v oblikovanje selektivnih, nizko molekularnih SOD mimetikov.

V okviru magistrske naloge smo ugotavljali, ali 20 izbranih spojin lahko katalizira reakcijo pretvorbe  $O_2^{\bullet-}$  do  $O_2$  in  $H_2O_2$ , podobno kot encim SOD. Za izvedbo naloge smo uporabili indirektno Fridovich-evo metodo. Spojinam, ki so pospešile disproporcionacijo  $O_2^{\bullet-}$ , smo določili koncentracije, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 %. Kinetiko redukcije citokroma c smo spremljali z UV-Vis spektrofotometrom. Dobljene rezultate smo statistično obdelali ter izračunali enačbo premice in koeficient determinacije. Ocenili smo možnost uporabe izbranih spojin kot SOD mimetikov. Vse spojine, razen spojin **11** in **16**, so izkazovale SOD mimetično aktivnost, torej lahko katalizirajo reakcijo pretvorbe  $O_2^{\bullet-}$  do  $O_2$  in  $H_2O_2$  podobno kot encim SOD. Koncentracija, ki je potrebna za pospeševanje dismutacije  $O_2^{\bullet-}$ , je pri spojinah **2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19** veliko večja, kot pri spojinah **1** in **20**, ki v svoji strukturi vsebujeta Mn kot ligand. Relativno dobro SOD mimetično aktivnost pri dokaj nizki koncentraciji, so v primerjavi z drugimi spojinami, če izključimo spojin **1** in **20**, izražali nitroksidi, in sicer spojine **3, 4, 5, 6**, in **7**. Iz tega izhaja, da bi lahko tudi te spojine uporabili kot možne neencimske SOD mimetike.

## ABSTRACT

The term oxidative stress is used to describe a variety of harmful processes, resulting from imbalance between prooxidative and antioxidative processes in the cell. Oxidative stress occurs due to excessive formation of radicals, reactive intermediates and reduced efficiency of antioxidant system. Radicals are continuously formed in cell metabolism and represent a defence mechanism against infection. Radicals are atoms, ions or molecules, that have in their structure at least one single electron. Radicals are highly reactive and unstable and can therefore easily react with molecules and compounds to fill the gaps in the energy level. When quantity of radicals in cell increases to such an extent that antioxidant capacity of cell is exceeded, change in the structure of membrane and membrane protein damage appears and consequently cell survival is threatened. Term ROS is used to describe molecules and radicals, derived from  $O_2$ . Antioxidant defence system is a natural defence system of a body, formed by various compounds that are in very low concentrations capable to prevent radical formation. The SOD enzyme is first and the most significant line of antioxidants that remove radicals and ROS. SOD enzyme itself does not provide desired results in therapeutic use because of undesirable immune reactions and therefore selective, low molecular SOD mimetics are being developed.

We have been assessing whether 20 selected compounds can catalyse reaction of transforming  $O_2^{\bullet-}$  to  $O_2$  and  $H_2O_2$ , similar to the enzyme SOD. To perform a task we used indirect Fridovich assay. For compounds that accelerate  $O_2$  disproportionation we have determined concentrations required to reduce the rate of reduction of cytochrome c for 50 %. The kinetics of reduction of cytochrome c was monitored by UV-VIS spectrophotometer. Obtained results were statistically analysed and regression line equation and determination coefficient have been calculated. We assessed the possibility of using selected compounds as SOD mimetics. All compounds, except compounds **11** and **16**, have demonstrated SOD mimetic activity and can therefore catalyse reaction of transforming  $O_2^{\bullet-}$  to  $O_2$  and  $H_2O_2$  similar like the enzyme SOD. The concentration required to promote dismutation  $O_2^{\bullet-}$  is in compounds **2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19** much higher than in compounds **1** and **20** (compounds **1** and **20** in its structure contain Mn as ligand). Relatively good sod mimetic activity in relatively low concentration in comparison with other compounds, excluding compounds **1** and **20**,

express nitroxides (compounds **3**, **4**, **5**, **6** and **7**). These compounds could be used as a potential non enzymatic SOD mimetics.

**SEZMAN OKRAJŠAV**

|                |                                                                                         |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| $^1\text{O}_2$ | singletni kisik                                                                         |
| $^3\text{O}_2$ | tripletni kisik                                                                         |
| DNA            | deoksiribonukleinska kislina                                                            |
| $e^-$          | elektron                                                                                |
| GPx            | glutation peroksidaza                                                                   |
| GSH            | glutation reduktaza                                                                     |
| $I_{50}$       | koncentracija SOD mimetika, pri kateri se hitrost redukcije citokroma c zmanjša za 50 % |
| kDa            | kilodalton                                                                              |
| $R^2$          | koeficient determinacije                                                                |
| RNS            | reaktivne dušikove spojine                                                              |
| ROS            | reaktivne kisikove spojine                                                              |
| SN             | standardna napaka predvidenih vrednosti y za vsak x v regresiji                         |
| SOD            | superoksid dismutaza                                                                    |
| $V_0$          | hitrost redukcije za slepi vzorec                                                       |
| $V_c$          | zmanjšana hitrost redukcije citokroma c                                                 |
| x              | koncentracija                                                                           |

## SEZNAM SLIK

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 1:</b> Homodimer SOD 1, ki ima v aktivnem mestu kationski par Cu/Zn.....                                                                                                                                               | 7  |
| <b>Slika 2:</b> Homotetramer SOD 2, ki ima v aktivnem mestu Mn ion .....                                                                                                                                                        | 7  |
| <b>Slika 3:</b> Homotetramer SOD 3, ki ima v aktivnem mestu kationski par Cu/Zn ....                                                                                                                                            | 8  |
| <b>Slika 4:</b> Struktura makrocikličnega SOD mimetika M40403.....                                                                                                                                                              | 10 |
| <b>Slika 5:</b> Strukture nekaterih salenskih kompleksov z $Mn^{3+}$ .....                                                                                                                                                      | 11 |
| <b>Slika 6:</b> Strukture nekaterih metaloporfirinov z $Mn^{3+}$ .....                                                                                                                                                          | 11 |
| <b>Slika 7:</b> Strukture nekaterih nitroksidnih SOD mimetikov .....                                                                                                                                                            | 12 |
| <b>Slika 8:</b> Osnovne komponente UV-Vis spektrofotometra.....                                                                                                                                                                 | 15 |
| <b>Slika 9:</b> Aparat UV-Visible spektrophotometer 50Conc proizvajalca Varian .....                                                                                                                                            | 21 |
| <b>Slika 10:</b> Vis spektri citokroma c v fosfatnem pufru pri pH 7,4 zbrani vsako minuto med tvorbo $O_2^{\bullet-}$ od časa 0 do 600 sekund, kjer je pri 550 nm dobro vidna hitrost redukcije citokroma c (glej A in B) ..... | 22 |

## SEZNAM SHEM

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Shema 1:</b> Potek odstranjevanja $O_2^{\bullet-}$ .....                                                                                                             | 4  |
| <b>Shema 2:</b> Shematski prikaz absorpcije svetlobe pri prehodu skozi kiveto z dolžino (l), pri čemer je $I_0$ jakost vpadlega, $I_1$ pa jakost izstopnega žarka ..... | 15 |

## SEZNAM PREGLEDNIC

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Preglednica 1:</b> Pomembne ROS .....                                                                             | 2  |
| <b>Preglednica 2:</b> Prikaz kemikalij in reagentov .....                                                            | 17 |
| <b>Preglednica 3:</b> Prikaz postopka priprave kivete .....                                                          | 21 |
| <b>Preglednica 4:</b> Prikaz analiziranih spojin .....                                                               | 26 |
| <b>Preglednica 5:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 1 ..... | 29 |
| <b>Preglednica 6:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 2 ..... | 29 |
| <b>Preglednica 7:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 3 ..... | 30 |
| <b>Preglednica 8:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 4 ..... | 30 |
| <b>Preglednica 9:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 5 ..... | 31 |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Preglednica 10:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 6 .....  | 30 |
| <b>Preglednica 11:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 7 .....  | 32 |
| <b>Preglednica 12:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 8 .....  | 32 |
| <b>Preglednica 13:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 9 .....  | 33 |
| <b>Preglednica 14:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 10 ..... | 33 |
| <b>Preglednica 15:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 11 ..... | 34 |
| <b>Preglednica 16:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 15 ..... | 36 |
| <b>Preglednica 17:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 16 ..... | 36 |
| <b>Preglednica 18:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 17 ..... | 34 |
| <b>Preglednica 19:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 12 ..... | 37 |
| <b>Preglednica 20:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 13 ..... | 35 |
| <b>Preglednica 21:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 14 ..... | 35 |
| <b>Preglednica 22:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 18 ..... | 37 |
| <b>Preglednica 23:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 19 ..... | 38 |
| <b>Preglednica 24:</b> Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 20 ..... | 37 |

## SEZNAM GRAFOV

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Graf 1:</b> Graf koncentracij, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v izbranih spojinah, z upoštevanjem SD ..... | 39 |
| <b>Graf 2:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 1 .....                 | 39 |

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Graf 3:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>2</b> .....   | 39 |
| <b>Graf 4:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>3</b> . ....  | 40 |
| <b>Graf 5:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>4</b> . ....  | 40 |
| <b>Graf 6:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>5</b> . ....  | 41 |
| <b>Graf 7:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>6</b> . ....  | 41 |
| <b>Graf 8:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>7</b> .....   | 42 |
| <b>Graf 9:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>8</b> . ....  | 42 |
| <b>Graf 10:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>9</b> . .... | 43 |
| <b>Graf 11:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>10</b> ..... | 43 |
| <b>Graf 12:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>15</b> ..... | 45 |
| <b>Graf 13:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>17</b> ..... | 45 |
| <b>Graf 14:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>12</b> ..... | 46 |
| <b>Graf 15:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>13</b> ..... | 44 |
| <b>Graf 16:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>14</b> ..... | 44 |
| <b>Graf 17:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>18</b> ..... | 46 |
| <b>Graf 18:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>19</b> ..... | 47 |
| <b>Graf 19:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti<br>redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini <b>20</b> ..... | 47 |

## **1 UVOD**

### **1.1 OKSIDATIVNI STRES**

Oksidativni stres je izraz, ki opisuje različne škodljive procese, ki so posledica porušanja ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici. Je patološko stanje, ki se pojavi zaradi prekomernega nastajanja radikalov in reaktivnih intermediatov (reaktivne kisikove in reaktivne dušikove spojine) (2, 3, 7, 19) ter zmanjšanja učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Oksidativni stres je prisoten v vseh živih organizmih in je oblika kemičnega stresa (3).

Radikali so udeleženi v obrambnih mehanizmih imunskega sistema in nenehno nastajajo v celični presnovi (3, 14). Problem se pojavi, ko se njihova količina v celicah poveča do te mere, da so presežene antioksidantne kapacitete celice, pri čemer pride do spremembe v strukturi membrane in do poškodbe membranskih proteinov in je posledično celica smrtno ogrožena (3, 7). Sama celična smrt je morebiti boljši izid za celico kot preživetje celice, saj lahko oksidativni stres povzroči poškodbe dednega materiala v jedru ali v mitohondrijih, kar privede do prenosa napak na naslednje generacije oziroma se normalna celica pretvori v rakavo celico (7).

Do povečane količine radikalov lahko pride tako zaradi številnih zunanjih (sevanje, zdravila, pesticidi, virusi in bakterije) kot tudi notranjih (različne bolezni) dejavnikov (3).

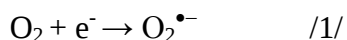
Oksidativni stres ne kaže simptomov, s katerimi bi opredelili njegovo prisotnost v organizmu, kot lahko to naredimo za bolezenska stanja, ki so posledica oksidativnega stresa. Pomembno pa je, da se zavedamo njegove prisotnosti, in da ga poskušamo nadzorovati (3).

Sam pojav oksidativnega stresa je močno povezan s prisotnostjo kisika v našem ozračju (3), ki pa je nujen za življenje (14).

#### **1.1.1 Posledice oksidativnega stresa**

Posledica oksidativnega stresa je sprožitev bolezenskega stanja (2), ki nastane zaradi prevelike tvorbe radikalov in/ali zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov (3). Oksidativni stres je odgovoren za zgodnje staranje in različne bolezni, kot so sladkorna bolezen, ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, Alzheimerjeva bolezen, rak in druge

(3, 14, 15). Začetek bolezenskih stanj je lahko posledica nekontrolirane in prekomerne tvorbe superoksidnega radikala ( $O_2^{\bullet-}$ ), ki nastane iz kisika ( $O_2$ ) (2), ko le-ta sprejme en elektron ( $e^-$ ) /1/ (7).



Organizem je na oksidativni stres do neke mere pripravljen, saj ima encime, ki so sposobni pretvorbe  $O_2^{\bullet-}$  v manj nevarne kemijske zvrsti (2).

## 1.2 REAKTIVNE KISI KOVE SPOJINE

Reaktivne kisikove spojine (ROS) so izraz, s katerim opisujemo vrsto molekul in radikalov, ki izvirajo iz molekule  $O_2$  (30). ROS poleg kisikovih radikalov, kot so  $O_2^{\bullet-}$ , hidroksilni radikal ( $OH^\bullet$ ), tripletni ( $^3O_2$ ) kisik in drugi, vključuje tudi nekatere ne-radikalske derivate kisika, kot so singletni kisik ( $^1O_2$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), ozon ( $O_3$ ) in hipoklorna kislina ( $HOCl$ ). Iz tega sledi, da so vsi kisikovi radikali ROS, niso pa vse ROS kisikovi radikali (1). Vsem ROS je skupna reaktivnost, ki je zelo visoka tako pri radikalih z lihim številom elektronov kot pri ne-radikalih s sodim številom sparjenih elektronov, ki imajo nasprotno spino po parih (4). Posledica tega so oksidacije in redukcije v katerikoli organski molekuli v organizmu, ki povzročajo biokemične poškodbe (3, 4). V preglednici 1 so prikaze pomembne ROS.

**Preglednica 1:** Pomembne ROS (prirejeno po (3))

| Radikalske vrste        |                  | Ne-radikalske vrste |          |
|-------------------------|------------------|---------------------|----------|
| superoksidni anion      | $O_2^{\bullet-}$ | singletni kisik     | $^1O_2$  |
| hidroksilni radikal     | $HO^\bullet$     | ozon                | $O_3$    |
| tripletni kisik         | $^3O_2$          | vodikov peroksid    | $H_2O_2$ |
| hidroperoksilni radikal | $HOO^\bullet$    | hidroperoksid       | $ROOH$   |
| alkoksilni radikal      | $RO^\bullet$     | peroksidi           | $ROOR$   |
| peroksilni radikal      | $ROO^\bullet$    | hipoklorna kislina  | $HOCl$   |

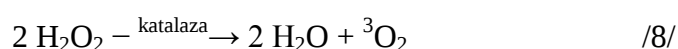
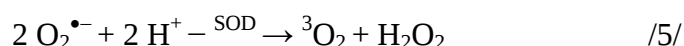
### 1.2.1 Nastanek ROS

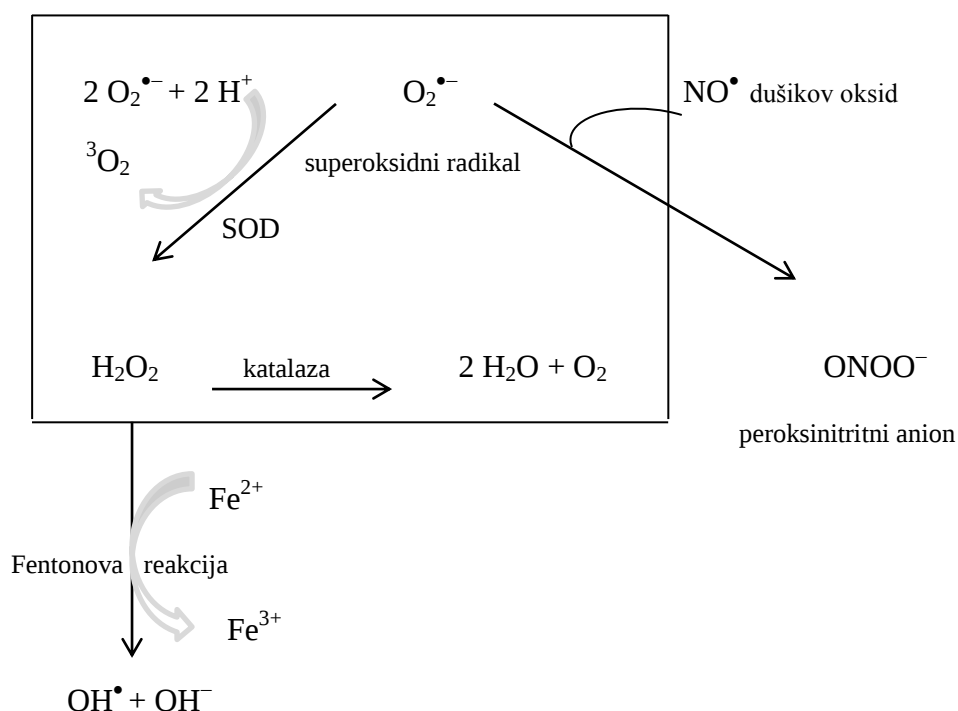
Molekula  $O_2$  je v osnovnem stanju triplet ( $^3O_2$ ) s paramagnetnimi lastnostmi, ki so posledica dveh neparjenih elektronov na zunanji  $\pi$  razvezni orbitali. Oba neparjena

elektrona imata enak spin, zato je  $O_2$  biradikal (3, 7, 30), ki lahko reagira samo z enim elektronom naenkrat in posledica tega je, da ni zelo reaktiven z elektronoma v kovalentni vezi. Če eden izmed nespargenih elektronov preide v višje energijsko stanje, pride do spremembe v obratu spina in nastane singlet ( $^1O_2$ ), ki je energetsko bogatejši od  $^3O_2$ .  $^1O_2$  je močan oksidant, ki ima v svojih orbitalah vse elektrone v parih (30), kar mu daje lastnost diamagnetnega plina (7). Spina elektronov  $^1O_2$  v  $\pi$  razvezni orbitali sta usmerjena v nasprotno smer, zato  $^1O_2$  hitro tvori kovalentne vezi z drugimi pari elektronov, še posebej z adicijo na dvojno vez (30).

Redukcija  $^3O_2$  z enim elektronom, katerega lahko  $^3O_2$  sprejme iz dihalne verige ali verige citokromov (7), tvori relativno stabilen produkt: superoksidni anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) /1/.  $O_2^{\bullet-}$  je manj reaktiven, je predhodnik večine ROS in je mediator v oksidativnih verižnih reakcijah. Dismutacija  $O_2^{\bullet-}$  je lahko spontana ali katalizirana z reakcijo encimov superoksidne dismutaze, pri čemer se tvorita ne-radikalni  $H_2O_2$  in  $^3O_2$  /5/ (7, 30).  $H_2O_2$  je nevtralna, vodi podobna spojina, ki lahko brez večjih omejitev difundira po celici (7).  $H_2O_2$  se lahko v celoti reducira s pomočjo encima katalaze v  $H_2O$  in  $^3O_2$  /8/ (30). Ta proces poteka tudi pri normalnem delovanju celice (7).

V primeru prekomernega nastajanja ROS se poruši ravnotežje med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici, pri čemer začnejo nastajati drugi reaktivni radikali ( $OH^{\bullet}$  in  $HOO^{\bullet}$ ) (2).  $OH^{\bullet}$  je najmočnejši oksidant v naravi (30) in najreaktivnejši radikal, ki reagira hitro in neselektivno ter z lahkoto sproži lipidno peroksidacijo oziroma povzroči poškodbo plovca, kjer se pojavi.  $OH^{\bullet}$  nastane v primeru, če  $H_2O_2$  naleti na železove ione ( $Fe^{2+}$ ), kar privede do Fentonove reakcije /9/ (7).  $O_2^{\bullet-}$  lahko reagira tudi z drugimi radikali, in sicer z dušikovim oksidom ( $NO^{\bullet}$ ) v reakciji, ki je kontrolirana s stopnjo difuzije obeh radikalov. Nastali produkt je peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), ki je močan oksidant (30). Potek odstranjevanja  $O_2^{\bullet-}$  je prikazan na shemi 1.



**Shema 1:** Potek odstranjevanja  $O_2^{\bullet-}$  (prirejeno po (2))

### 1.3 ZNAČILNOSTI RADIKALOV

Radikali so atomi, ioni ali molekule, ki imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron (3,4). So zelo reaktivni in nestabilni, zaradi česar hitro reagirajo z molekulami in spojinami, da zapolnijo vrzeli na energijskem nivoju po enem od treh načinov (3):

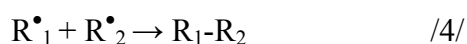
1. odvzem vodikovega atoma /2/:



2. adicija na dvojno vez /3/:



3. reakcija dveh radikalov /4/:



Radikalske reakcije so zelo hitre, razvejane in vedno prisotne reakcije. So verižne reakcije, v katerih stalno nastajajo novi radikali (1). Reakcije lahko potekajo nenadzorovano, mimo encimskih sistemov (17), kar privede do akutne poškodbe celice ali celo do celične smrti, poškodbe beljakovin, maščob in deoksiribonukleinske kisline (DNA), kar vodi v degeneracijo in staranje, posledica tega pa je pojav različnih obolenj (4, 7, 14).

Radikali v telesu nastajajo nekontrolirano in prekomerno. Nastajajo na več načinov, in sicer naravno, kot nezaželeni produkti pri nepopolnem celičnem dihanju, pri presnovi tujih snovi v organizmu ter pri izpostavljenosti ionizirajočemu sevanju (17). Radikale lahko nevtraliziramo z antioksidanti, ki radikalom oddajo enega svojih elektronov in jih s tem onesposobijo (14).

## 1.4 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM

Antioksidativni obrambni sistem je naravni obrambni sistem v telesu, v katerega uvrščamo številne spojine (3, 7), ki so v zelo nizkih koncentracijah sposobne preprečiti nastajanje radikalov, upočasniti ali ustaviti radikalsko sprožene oksidacije, preprečiti delovanje  $^1\text{O}_2$  ter preprečiti sodelovanje ionov prehodnih kovin v prenosu elektronov (7).

Antioksidativni obrambni sistem je porazdeljen znotraj organizma in se deli na znotrajcelični in zunajcelični prostor. V znotrajceličnem prostoru je antioksidativni obrambni sistem razporejen v številnih delih celice. Glavnina radikalov nastaja v samem lipidnem sloju mitohondrijev, kjer se nahajajo encimi, ki so potrebni za katalizo radikalskih reakcij. Antioksidativni obrambni sistem v zunajceličnem prostoru in v krvni plazmi pa predstavljajo spojine, ki imajo redukcijske sposobnosti za nasičenje elektronskega primanjkljaja (npr. glutation, albumini, sečna kislina, holesterol, tioli in druge) (3).

## 1.5 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so snovi različnega izvora, strukture, velikosti in z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. So spojine, ki imajo v svoji strukturi vsaj en reaktiven vodikov atom, ki se z lahkoto odcepi in veže na radikal, pri čemer nastane nov radikal, ki je stabilnejši in manj škodljiv. Antioksidanti so lahko spojine, ki nudijo dvojno vez, na katero se radikali adirajo, ter spojine, ki kompleksirajo ione prehodnih kovin in na ta način preprečijo prenos elektronov (7).

Fizikalne lastnosti antioksidantov jim omogočajo prisotnost v vseh predelih celice, tkiva in telesa (7). Glede na topnost ločimo hidrofilne in hidrofobne antioksidante (3, 6). Vse te lastnosti omogočajo brezhibno delovanje antioksidantov. Antioksidanti so medsebojno odvisni in imajo usklajeno delovanje (8, 9). Biti morajo povsod in stalno na voljo, saj je težko predvideti, kje v celici oziroma telesu bo nastal radikal (7). Zaščita, ki jo posamezen

antioksidant nudi organizmu, je odvisna od njegove koncentracije (2, 5) (v celicah je tako lahko za tri velikostne razrede ali več višja, kot je pričakovana koncentracija radikalov (7)), od reaktivnosti proti določenim ROS ter od stanja, v katerem so ostali antioksidanti, s katerimi reagira (5).

## 1.6 VRSTE ANTIOKSIDANTOV

Po izvoru ločimo antioksidante, ki so endogenega izvora (telo jih sintetizira samo; gre za encimske sisteme) in eksogenega izvora (v telo jih vnašamo s prehrano) (5). Po kemijski strukturi jih delimo na encimske antioksidante in antioksidante, ki niso encimi (3).

### 1.6.1 Encimski antioksidanti

Encimski antioksidanti so prepleten sistem zaščite celice pred oksidativnim stresom (17) in predstavljajo bolj specifično zaščito, ki temelji na sposobnosti posameznih encimov, da odstranjujejo radikale in druge ROS (4). Prisotni so v vseh celicah in vseh evkariontskih organizmih. Med encimske antioksidante uvrščamo tri encime, ki se med sabo razlikujejo tudi po funkciji (6), in sicer:

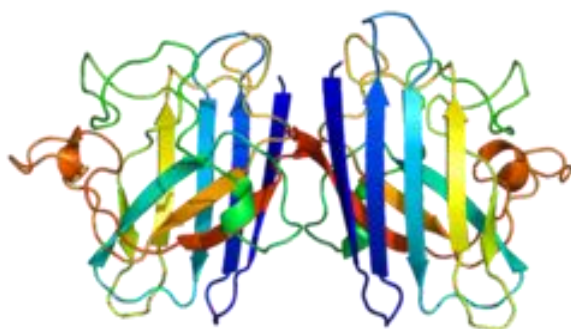
1. superoksidna dismutaza (SOD), ki odstranjuje  $O_2^{\bullet-}$ ,
2. katalaza, ki razgrajuje  $H_2O_2$  in
3. glutathion peroksidaza (GPx), ki odstranjuje  $H_2O_2$  (4, 6).

#### 1.6.1.1 Superoksidna dismutaza (SOD)

Encim SOD je prva in najpomembnejša linija med encimskimi antioksidanti, ki odstranjuje radikale in ROS (11). Je metaloprotein (18). Glede na prisotnost iona kovine prehoda (Fe, Zn, Cu in Mn) v aktivnem mestu ločimo tri oblike izoencima SOD, ki so prisotni v različnih predelih celice (2, 11, 12, 15), in sicer:

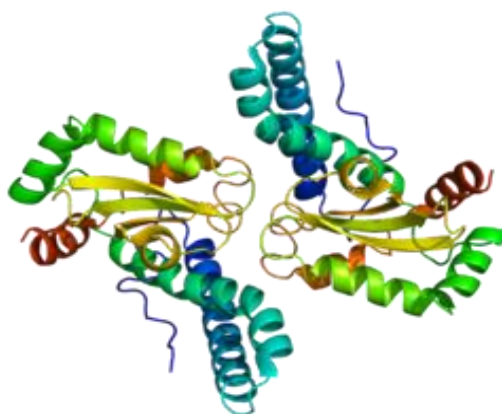
1. *SOD 1* ima v aktivnem mestu kationski par Cu/Zn (Cu/Zn-SOD) in se nahaja v citosolu (2, 11, 18). Je homodimer z molekulsko maso 32 kDa in je prisoten v citoplazmi (2, 11), nuklearnem predelu ter v lizosomih celic sesalcev. Gen za SOD 1 se nahaja na enaindvajsetem humanem kromosomu (11). Njegova aktivnost je povečana predvsem v jetrih, manj pa v ledvicah in srcu (31). Ima pomembno vlogo pri različnih bolezenskih stanjih kot so srčna odpoved, rak, sladkorna bolezen, Down-ov sindrom in aminotropična lateralna skleroza (19). SOD 1 je prikazan na

sliki 1.



**Slika1:** Homodimer SOD 1, ki ima v aktivnem mestu kationski par Cu/Zn (26)

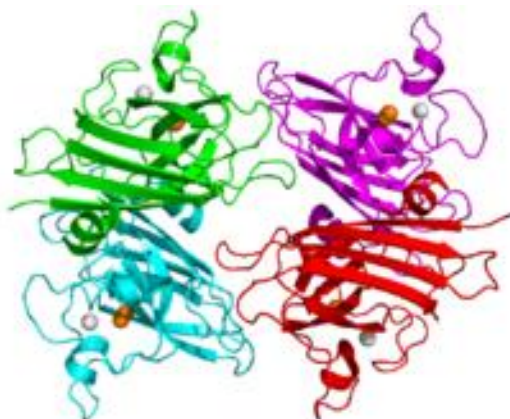
2. *SOD 2* ima v aktivnem mestu Mn ion (Mn-SOD) in se nahaja v mitohondriju (2, 11, 18). Je homotetramer z molekulsko maso individualne podenote 23 kDa. Gen za *SOD 2* se nahaja na šestem humanem kromosomu (11). Njegova aktivnost je povečana predvsem v ledvicah, jetrih in srcu (31). *SOD 2* igra pomembno vlogo pri spodbujanju celične diferenciacije in tumorogeneze ter pri zaščiti pred hiperoksično inducirano pljučno toksičnostjo (11). *SOD 2* je prikazan na sliki 2.



**Slika 2:** Homotetramer SOD 2, ki ima v aktivnem mestu Mn ion (26)

3. *SOD 3* ima v aktivnem mestu kationski par Cu/Zn (Cu/Zn-SOD) in se nahaja v zunajceličnem prostoru (2, 11, 18). Je homotetramer z molekulsko maso 135 kDa z visoko afiniteto za heparin. *SOD 3* je bil šele nedavno odkrit in je med izoencimi najmanj poznan. Gen za *SOD 3* se nahaja na četrtem humanem kromosomu. Prisotnost *SOD 3* je zelo omejena na določeno vrsto celic in tkiv (11) (pljuča,

možgani (31)), kjer njegova aktivnost presega SOD 1 in SOD 2 (11). SOD 3 je prikazan na sliki 3.

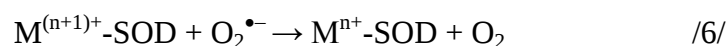


**Slika 3:** Homotetramer SOD 3, ki ima v aktivnem mestu kationski par Cu/Zn (26)

Aktivnost izoencimov SOD je tkivno specifična. V jetrih je obremenitev z radikali zaradi intenzivnega metabolizma visoka, zato je tu največja encimska aktivnost SOD 1 in SOD 2. V pljučih je največja ekstracelularna aktivnost SOD (2), saj so pljuča v direktnem kontaktu z  $O_2$ . Možgani pa so prvi organ, na katerem se pokažejo učinki povečanega nastajanja ROS, kar se kaže v nastajanju krčev (19).

Encim SOD katalizira reakcijo disproporcionacije (dismutacije) /5/, kar zaščiti žive celice pred toksičnimi kisikovimi metaboliti (2, 12, 15).

Disproporcionacija je redoks reakcija (16), ki vključuje serijo eno- ali dvo- elektronskih prenosov (2, 18). Mehanizem disproporcionacije  $O_2^{\bullet-}$  poteka z redukcijo iona prehodne kovine  $M^{(n+1)+}$  do  $M^{n+}$  s  $O_2^{\bullet-}$ , le-ta se oksidira do  $^3O_2$  /6/.  $M^{n+}$  se oksidira nazaj v  $M^{(n+1)+}$  z drugo molekulo  $O_2^{\bullet-}$ , pri čemer nastane  $H_2O_2$  /7/ (2, 12, 15, 18). Za potek disproporcionacije niso potrebni dodatni reducenti kot tudi ne celična energija (2, 18).



Kjer je M = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2)

Zaščitne in blagodejne vloge SOD encima so se pokazale pri številnih boleznih, tako preklinično kot tudi klinično. Slabost SOD encima je v njegovi velikosti, zaradi katere

pride do omejitev pri celični prepustnosti, in kratki razpolovni dobi ( $t_{1/2}$ ), zaradi katere ni vidna njegova učinkovitost (18).

Različne študije so izkazale, da SOD encim ni primeren za terapevtske namene, čeprav kaže obetajoče anti-vnetne značilnosti (18). Sam encim v terapevtski uporabi zaradi nezaželenih imunskih reakcij ni dal želenih rezultatov (2). Zaradi navedenega je razvoj stekel v oblikovanje selektivnih, sintetičnih, nizko molekularnih SOD mimetikov (2, 12, 18).

#### **1.6.1.2 Katalaza**

Katalaza je encim, ki je sestavljen iz štirih podenot, ki imajo Fe-hem v aktivnih mestih. Nahaja se predvsem v peroksisomih (3, 19). Pri človeku jo najdemo v jetrih, eritrocitih, ledvicah (3, 10) in srčnih mitohondrijih (19). Njena naloga je katalizirati razgradnjo  $H_2O_2$  v  $H_2O$  in  $O_2$  /8/ s čimer prepreči nastanek  $OH^\bullet$  (3, 10).

#### **1.6.1.3 Glutation peroksidaza (GPx)**

GPx je encim, ki se nahaja v mitohondrijih in celičnem citosolu, in služi kot pomemben celični zaščitnik pred radikali, ki povzročijo poškodbo lipidne membrane, proteinov in DNA. Ob normalnem delovanju antioksidativnega obrambnega sistema GPx skupaj z glutation reduktazo (GSH) odstranjuje  $H_2O_2$  in organske perokside iz celic (13).

### **1.6.2 Antioksidanti, ki niso encimi**

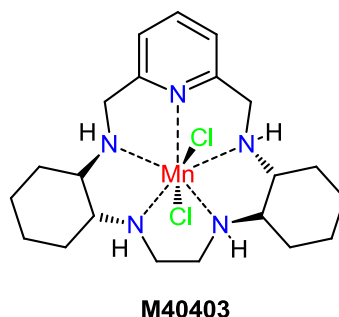
Med antioksidante, ki niso encimi, uvrščamo vse antioksidante kot so definirani v ožjem pomenu besede (6). Gre za vitamine (vitamin C, E) in nekatere spojine z antioksidativnim delovanjem (proteini, ubikinon), glutation ter tiole (3). Osnovna naloga antioksidantov, ki niso encimi, je, da preprečujejo nastanek reaktivnih spojin, da zmanjšujejo in ustavljajo verižne reakcije, ki so sprožene s strani radikalov (4, 6), in skrbijo, da te reakcije potekajo v tistih delih celic, ki so manj občutljivi, tako da je oksidativni proces manj škodljiv za celico (6).

## 1.7 SOD MIMETIKI

Sam encim SOD kaže obetajoče anti-vnetne značilnosti, vendar njegova uporaba za terapevtske in farmaloške namene ni primerna. Zaradi tega so raziskave stekle v oblikovanje SOD mimetikov (18), med katere so se uvrstili različni kovinski kompleksi (Cu, Fe, Mn). Največji poudarek pa je na razvoju Mn SOD mimetikov (15).

SOD mimetike delimo na selektivne (reakcijsko specifični za reakcijo z  $O_2^{\bullet-}$  v *in vitro* pogojih) in neselektivne (odstranjujejo lahko  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , lipidne perokside in peroksinitritni anion) (2).

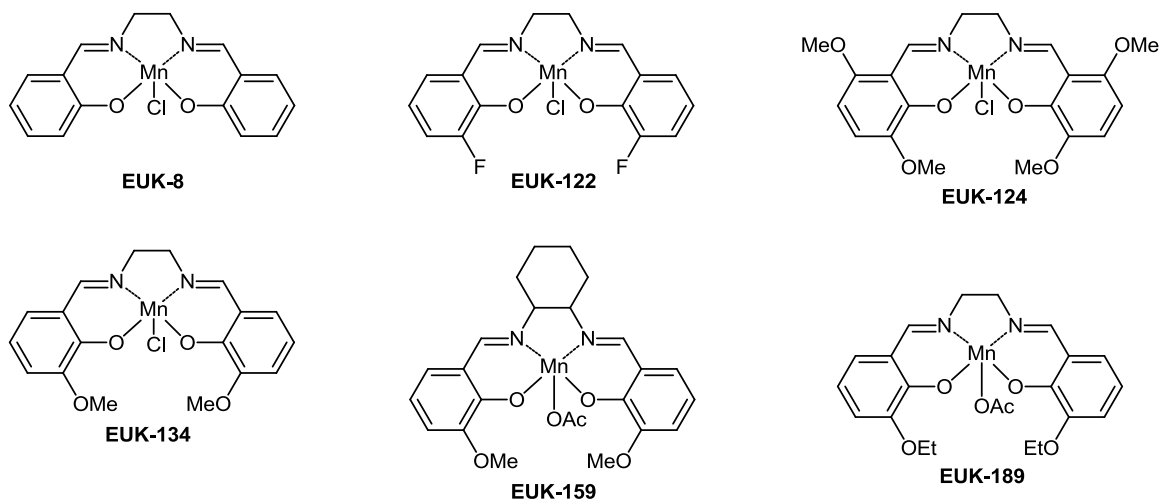
Med selektivne SOD mimetike uvrščamo makrociklične spojine, kjer je  $Mn^{2+}$  koordinativno vezan v center 15-členskega obroča s petimi dušiki. Njihova lastnost je, da selektivno odstranijo  $O_2^{\bullet-}$  ne da bi reagirali z drugimi oksidirajočimi vrstami. Raziskave so se predvsem osredotočile na sintezo Mn kompleksov z visoko inherentno kemično in termodinamično stabilnostjo, ki se z večanjem števila substituentov na makrocikličnem obroču večja, in so učinkoviti katalizatorji dismutacije  $O_2^{\bullet-}$ . Med najuspešnejše makrociklične mimetike uvrščamo nepeptidno molekulo M40403, ki vsebuje Mn. Je zelo stabilna, ima nizko molekulsko maso in je po funkciji in katalitični stopnji enaka samemu SOD encimu. Njena pomembna lastnost je tudi, da je učinkovita pri zdravljenju mnogih patoloških stanj in da deluje protivnetno ter ne povzroča imunskih reakcij (2, 18). Struktura M40403 je prikazana na sliki 4.



**Slika 4:** Struktura makrocikličnega SOD mimetika M40403

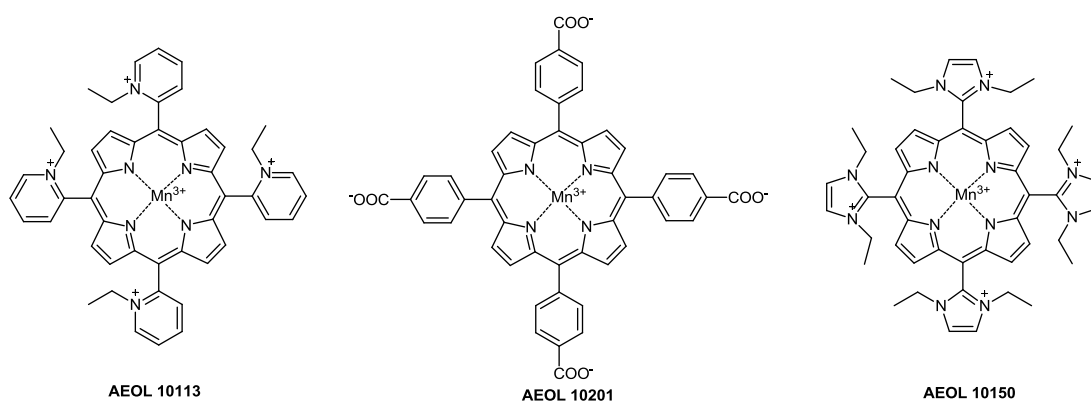
Med neselektivne SOD mimetike uvrščamo salene in metaloporfirine. Saleni so substituirani aromatski N,N-bis (saliciliden) etilendiaminski kovinski kompleksi, ki imajo Mn koordiniran s štirimi aksialnimi ligandi. Imajo katalitično aktivnost, odstranjujejo  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  ter tudi perokside v maščobah in  $ONOO^-$  (2, 15, 18). Mehanizem dismutacije  $O_2^{\bullet-}$  je

popolnoma enak kot pri SOD encimu (15). Dokazana je antioksidativna učinkovitost *in vivo* pri različnih bolezenskih stanjih pri različnih salenskih kompleksih (EUK 8, EUK 134 in EUK 189) (2, 18). Strukture nekaterih salenskih kompleksov so prikazane na sliki 5.



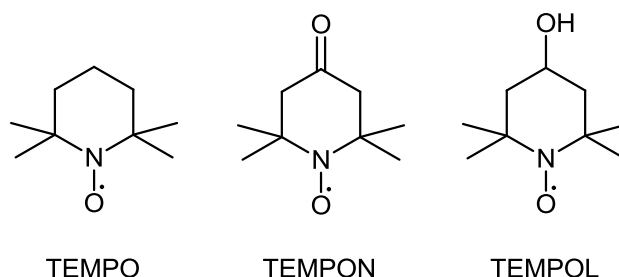
**Slika 5:** Strukture nekaterih salenskih kompleksov z Mn<sup>3+</sup>

Metaloporfirini so mezo-substituirani protoporfirini z Mn<sup>3+</sup> v sredini porfirinskega obroča, ki ga koordinirajo štirje aksialni dušikovi atomi. Metaloporfirini odstranjujejo O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipidne perokside in ONOO<sup>-</sup>. Disproporcionacija vključuje dvo- elektronski prenos podobno kot pri samem SOD encimu. Antioksidativna učinkovitost metaloporfirinov se *in vivo* kaže pri številnih bolezenskih stanjih. Metaloporfirini so tudi učinkoviti inhibitorji lipidne peroksidacije (2, 18). Strukture nekaterih metaloporfirinov so prikazane na sliki 6.



**Slika 6:** Strukture nekaterih metaloporfirinov z Mn<sup>3+</sup>

Med SOD mimetike uvrščamo tudi nitroksidne SOD mimetike (tempol, tempon in tempo), ki delujejo po različnih poteh. Nitroksidi katalitično odstranjujejo  $O_2^{\bullet-}$  z eno-elektronskimi redoks reakcijami, lahko pa tudi oksidirajo reducirane tranzicijske kovine, ki povzročajo škodo na način, da proizvajajo ROS. Obstaja vedno več dokazov o zaščitni aktivnosti nitroksidov, o njihovih nasprotnih učinkih pa so informacije redke (27). Strukture nekaterih nitroksidov so prikazane na sliki 7.



**Slika 7:** Strukture nekaterih nitroksidnih SOD mimetikov

## 1.8 PRINCIP DOLOČANJA ROS IN RNS

Nastajanje ROS in RNS lahko opazujemo z uporabo različnih metod, in sicer:

- fluorimoetrične metode,
- kemiluminiscenčne metode,
- spektrofotometrične metode in z
- elektronsko paramagnetno resonanco.

Večina navedenih metod se zanaša na redoks značilnosti specifičnih ROS in RNS in so posledično nagnjene k napakam, ki jih povzročijo vrste s podobno reaktivnostjo ali reaktivnimi intermediati, katere proizvajajo same sonde. Za razjasnitev nejasne identifikacije ROS se lahko dodajo specifični encimski inhibitorji (SOD, katalaze,...), ki pa ne morejo pojasniti, ali gre za primarne ROS, ali samo za posrednike v detekcijski reakciji (30).

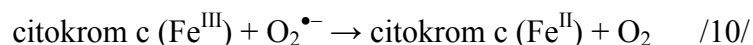
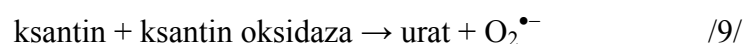
### 1.8.1 Določanje SOD

Določamo lahko raven SOD proteina in/ali encimsko aktivnost, in sicer z imunološkimi metodami, direktnimi metodami in z indirektnimi metodami. V laboratorijih se za določanje SOD aktivnosti večinoma uporabljajo indirektne metode (1).

### 1.8.1.1 Indirektna metoda

Indirektna metoda je preprosta metoda, s katero merimo SOD aktivnost. Je t.i. Fridovich-eva metoda, katero sta leta 1969 utemeljila McCard in Fridovich na eritrocitnih SOD encimih. Ugotovila sta, da encim SOD pretvori  $O_2^{\bullet-}$  do  $O_2$  in  $H_2O_2$ , encim katalaza pa je potreben za odstranitev  $H_2O_2$ , ki se tvori kot stranski produkt dismutacije  $O_2^{\bullet-}$  (12, 15, 29).  $H_2O_2$  bi drugače lahko počasi reoksidiral reduciran citokromom c in reagiral z kontaminantnim kovinskim ionom do produkta  $OH^{\bullet}$  (1).

Gre za analizo pri kateri nastaja  $O_2^{\bullet-}$  v reakciji oksidacije ksantina z encimom ksantin oksidaza /9/.  $O_2^{\bullet-}$  nato reagira z detektorjem citokromom c, kar privede do njegove redukcije /10/. Posledica je povišanje absorbanse pri 550 nm (1, 15).



Redukcijo citokroma c lahko merimo z UV-Vis spektrofotometrom. Citokrom c je v prisotnosti spojin, ki so sposobne reagirati z  $O_2^{\bullet-}$ , zaščitene pred redukcijo, saj dodani SOD mimetiki reagira z  $O_2^{\bullet-}$  in ga odstrani. Zbiranje podatkov temelji na hitrosti spremembe absorbanse pri 550 nm ( $\Delta A/\Delta t$ ) v prisotnosti SOD mimetika ( $V_c$ ) v primerjavi s hitrostjo spremembe absorbanse v odsotnosti SOD mimetika ( $V_0$ ). SOD aktivnost je definirana kot koncentracija, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ). Izračunane vrednosti ( $V_0/V_c$ ) - 1 naj bi ležale na premici (1, 15).

Slabost indirektna analize SOD aktivnosti je v tem, da lahko zaznamo lažno SOD aktivnost pri vsakem vzorcu, ki zavira tvorbo  $O_2^{\bullet-}$  (je npr. inhibitor ksantin oksidaze). Prednost uporabe ksantin oksidaze za nastanek  $O_2^{\bullet-}$  je v tem, da se encimska aktivnost ksantin oksidaze lahko (in se jo mora) preveri z merjenjem urata kot končnega produkta (1). Slabost je tudi v tem, da tkivni ekstrakti vsebujejo citokrom oksidazo, ki oksidira reduciran citokrom c, kar vpliva na analizo. Za preprečitev interference citokrom oksidaze in peroksidaze se dodajajo nizke koncentracije inhibitorjev (cianid), ki preprečijo, da bi citokrom c postal substrat za citokrom oksidazo (1, 29).

Merjenje  $O_2^{\bullet-}$  je pogosto pogojeno z njegovo sposobnostjo redukcije citokroma c, vendar mnogo drugih substanc (askorbati in tioli) reducira citokrom c, kar moti določanje  $O_2^{\bullet-}$ .

Citokrom c se lahko nadomesti z drugimi detektorji, in sicer z:

- *Nitro moder tetrazolijev klorid* (NBT), ki ga reducira  $O_2^{\bullet-}$ . NBT manj pogosto reducirajo celični reducenti. Kemija tvorbe kromogena je kompleksna, zaradi česar se lahko v samem procesu tvori  $O_2^{\bullet-}$ , zato se manj pogosto uporablja.
- *Adrenalin* lahko  $O_2^{\bullet-}$  oksidira do kromofora adrenokroma. Problem adrenalina je, da ko se začne oksidirati (oksidacijo lahko povzročijo tudi druge spojine, ne samo  $O_2^{\bullet-}$ ), se tvori  $O_2^{\bullet-}$ , ki oksidira še več adrenalina. Zaradi tega je težko povezati tvorbo produkta s tvorbo  $O_2^{\bullet-}$  v sistemu, ki se ga testira.
- *Tiron* (1, 2-dihidroksibenzen-3,5-disulfonat) reagira z  $O_2^{\bullet-}$  tako kot veliko drugih difenolov. Produkt je semikinon, ki se ga lahko meri z ESR. Slabost uporabe tirona je v tem, da difenole oksidira veliko sistemov vključno s peroksidazami in  $RO_2^{\bullet}$  radikali. Zato so potrebni potrditveni testi za zaznavo  $O_2^{\bullet-}$ .
- Tudi *luminol* in *luceferin* lahko uporabimo, saj ko sta izpostavljena  $O_2^{\bullet-}$ , emitirata svetlobo.

Tudi drugi ROS so bili pogosto uporabljeni kot detektorske molekule, vendar je njihova kemija kompleksa, veljavnost pa s tem dvomljiva. Vsaka metoda ima prednosti in slabosti in nobena analiza ni primerna za vse sisteme (1).

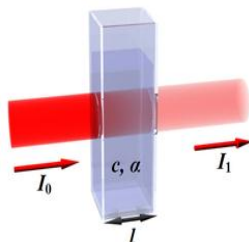
## 1.9 UV-Vis SPEKTROSKOPIJA

UV-Vis spektroskopija temelji na absorpciji ultravijolične in vidne svetlobe, torej v območju valovne dolžine med 200 in 800 nm (20).

Absorpcija je interakcija med električnim dipolnim momentom molekule in električno komponento elektromagnetnega valovanja, ki povzroči, da molekula preide iz osnovnega energijskega stanja v višje energijsko stanje (25).

Absorpcijski zakon, ki je shematsko prikazan na shemi 2, nam pove, da pri prehodu skozi obarvano raztopino ali neko drugo ne popolnoma prozorno snov svetlobni žarek oslabi, saj se del svetlobe absorbira v snovi. Oslabitev vpadnega žarka ( $dI$ ) je za tanke plasti sorazmerna debelini te plasti ( $dx$ ) in jakosti vpadne svetlobe ( $I_0$ ). Sorazmernostni koeficient imenujemo absorpcijski koeficient ( $\mu$ ), ki je za določene raztopine odvisen od valovne dolžine svetlobe ( $\lambda$ ) in koncentracije topiljenca ( $c$ ) ( $\mu = \mu(\lambda, c)$ ). Z integracijo

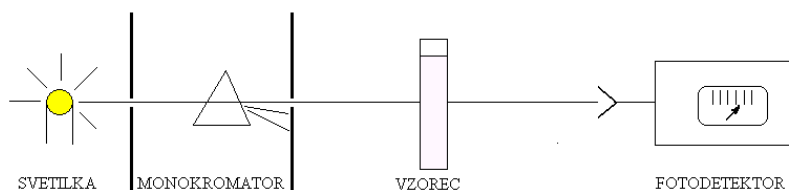
enačbe vidimo, da svetlobni tok z debelino plasti  $x$  eksponentno pojema:  $I = I_0 e^{-\mu(\lambda, c)x}$ , pri čemer je  $I_0$  jakost vpadnega,  $I_1$  pa jakost izstopnega žarka (21).



**Shema 2:** Shematski prikaz absorpcije svetlobe pri prehodu skozi kiveto z dolžino ( $l$ ), pri čemer je  $I_0$  jakost vpadnega,  $I_1$  pa jakost izstopnega žarka

### 1.9.1 Sestava UV-Vis spektrofotometra

Pri izvedbi smo uporabili enožarkovni spektrofotometer, ki je sestavljen iz vira vzbujevalne svetlobe (volframova žarnica) in monokromatorja, sestavljenega iz dveh optičnih rež, ki izolirajo svetlobo v ozek snop in izboljšajo barvno čistost. Na ta način monokromator izbere valovno dolžino vzbujevalne svetlobe. Kivete so običajno iz kvarčnega stekla ali polimera, kjer se le majhen del sevalne energije absorbira. Sledi občutljiv fotodetektor za merjenje intenzitete prepuščene svetlobe skozi vzorec ter zaslon, ki nam pokaže izmerjeno absorbanco (20, 22). Osnovne komponente UV-Vis spektrofotometra so prikazane na sliki 8.



**Slika 8:** Osnovne komponente UV-Vis spektrofotometra (prirejeno po (20))

### 1.9.2 Uporaba UV-Vis spektrofotometra

UV-Vis spektroskopija se uporablja za pridobivanje absorpcijskega spektra snovi v raztopini ali trdni snovi, ki nam da informacijo o strukturi molekul ali ionov. Podatki zagotavljajo kvalitativne in kvantitativne informacije o neki spojini ali molekuli. Za pridobitev teh informacij je potrebno uporabiti referenčno celico, da aparat nastavimo na nič s topilom, v katerem je spojina (20, 24). Pri izvedbi magistrske naloge smo nič določili tako, da smo izmerili slepi vzorec ( $V_0$ ) brez prisotnosti testirane spojine.  $V_0$  nam je služil kot kalibracija in predstavlja nezmanjšano hitrost redukcije citokroma c.

## 2 NAMEN NALOGE

V okviru magistrske naloge bomo ugotovili, ali izbrane spojine lahko katalizirajo reakcijo pretvorbe  $\text{O}_2^{\bullet-}$  do  $\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$ , podobno kot encim SOD. Spojinam, ki pospešijo disproporcionacijo (dismutacijo)  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , bomo določili koncentracije, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ). Kinetiko redukcije citokroma c bomo spremljali z UV-Vis spektrofotometrom.

Dobljene rezultate bomo statistično obdelali ter ocenili možnost uporabe izbranih spojin kot neencimskih mimetikov SOD.

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Spojine s SOD mimetičnim delovanjem

V magistrsko nalogo smo vključili 20 spojin, od tega osem nitroksidov, pet aminov, štiri oksime, dva kompleksa z manganom in en hidroksilamin, ki smo jih analizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Spojinam, ki so izkazovale SOD mimetično aktivnost, smo določili koncentracijo, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ).

##### 3.1.1.1 Priprava spojin

Spojinne smo pripravili tako, da smo na osnovi njihove molekulske mase pripravili  $2 \cdot 10^{-2}$  M osnovne raztopine v 1 mL metanola ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Različne koncentracije spojin, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c, smo pripravili z redčenjem osnovne raztopine s fosfatnim pufrom (0,01 M; pH 7,4).

##### 3.1.2 Kemikalije in reagenti

Kemikalije in reagenti, ki smo jih uporabili pri magistrski nalogi, so prikazani v preglednici 2.

**Preglednica 2:** Prikaz kemikalij in reagentov

| Ime                        | Kemijska formula                           | Molska masa (g/mol) | Opozorilni znaki | Firma | R, S -stavki                         |
|----------------------------|--------------------------------------------|---------------------|------------------|-------|--------------------------------------|
| metanol                    | $\text{CH}_3\text{OH}$                     | 32,04               | F,T              | SIGMA | R:11-23/24/25-39<br>S: 7-16-36/37-45 |
| natrijev dihidrogen fosfat | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                  | 119,98              | /                | SIGMA | /                                    |
| natrijev hidroksid         | $\text{NaOH}$                              | 56,11               | C                | Merck | R: 22-35<br>S: 26-36/37/39-48        |
| dinatrijev hidrogen fosfat | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                  | 141,96              | /                | SIGMA | /                                    |
| ksantin                    | $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$ | 152,1               | /                | SIGMA | /                                    |
| ksantin oksidaza           | /                                          | /                   | /                | SIGMA | /                                    |
| citokrom c                 | /                                          | 12384               | /                | SIGMA | /                                    |
| katalaza                   | /                                          | 60000               | /                | SIGMA | /                                    |

### 3.1.3 Osnovne raztopine in njihova priprava

Osnovne raztopine, ki smo jih pripravili in uporabili pri magistrski nalogi, so:

#### Fosfatni pufer

Fosfatni pufer smo uporabili kot topilo. Uporabili smo 0,01 M raztopino fosfatnega pufra pH 7,4. Za pripravo smo uporabili kemikalije  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , proizvajalca SIGMA.

0,1 M fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo natehtali 2,747 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 0,6779 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  v merilno bučko in 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.

#### Citokrom c

Citokrom c je mitohondrijski protein za prenos elektronov v dihalni verigi. Je hemski protein, ki vsebuje enojno polipeptidno verigo in prostetično skupino hem, ki je kovalentno vezana na cistein-14 in cistein-17. Zaradi različnih možnih oksidacijskih stanj železa v citokromu c znotraj celic je citokrom c učinkovit biološki prenašalec elektronov in ima pomembno vlogo pri celični oksidaciji tako pri ljudeh kot živalih in rastlinah (10).

Uporabili smo Cytochrome c iz konjskega srca (kat. št. C 2506) proizvajalca SIGMA, ki ga je potrebno hraniti pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in je stabilen pet let (10).

Raztopino citokroma c smo pripravili tako, da smo v 1 mL fosfatnega pufra (0,01 M; pH 7,4) raztopili 10 mg citokroma c (15). Po pripravi je raztopina citokroma c stabilna dva tedna pri  $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  in dva meseca pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (10). Med izvajanjem meritev smo raztopino hranili na ledeni kopeli.

#### Ksantin ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$ )

Ksantin je katabolni produkt razgradnje purina. S pomočjo encima ksantin oksidaze se pretvori v sečno kislino oziroma urat. Naravni viri ksantina in njegovih derivatov so živalski organi, kvas, krompir, kavna zrna in čaj. Ksantin in ksantin oksidaza se uporabljata za tvorbo  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , ki se uporablja za merjenje aktivnosti SOD (10).

Uporabili smo Xanthine (kat. št. X 0626) proizvajalca SIGMA, ki ga je potrebno hraniti pri sobni temperaturi (24).

Raztopino ksantina (1 mM raztopino) smo pripravili tako, da smo v 5 mL vodne raztopine NaOH (0,02 M) raztopili 0,76 mg ksantina z molekulsko maso 152,11 g/mol (15). Po pripravi je raztopina ksantina stabilna en teden pri 2 – 8 °C. Med izvajanjem meritev smo raztopino hranili na ledeni kopeli (10).

#### Katalaza

Katalaza je encim, ki je sestavljen iz štirih podenot, ki imajo Fe-hem v aktivnih mestih. Pri človeku se nahaja predvsem v jetrih. Njena naloga je katalizirati razgradnjo  $\text{H}_2\text{O}_2$  v  $\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{O}_2$  /8/ (3,10).

Uporabili smo Catalase iz govejih jeter (kat. št. 280743) proizvajalca SIGMA, ki jo je potrebno hraniti pri -20 °C (10).

Raztopino katalaze smo pripravili tako, da smo v 1 mL fosfatnega pufra (0,01 M; pH 7,4) raztopili 5 mg katalaze (15). Med izvajanjem meritev smo raztopino hranili na ledeni kopeli.

#### Ksantin oksidaza

Ksantin oksidaza je molibden vsebujoči encim, ki ga najdemo v citosolu in je lahko močno inhibiran z flavonoidi. Ima ključno vlogo v metabolizmu nekaterih učinkovin kot tudi pri purinih in pirimidinih baz. Ksantin oksidaza pretvori ksantin v sečno kislino oziroma urat. Ksantin oksidaza je biološki vir ROS (10).

Uporabili smo Xanthine Oxidase (0,4 – 1,0 encimske enote/mg proteina) iz govejega mleka (kat. št. X 4500) proizvajalca SIGMA, ki ga je potrebno hraniti pri temperaturi 2 - 8 °C (10).

Pripravili smo takšno koncentracijo encima ksantin oksidaze, pri kateri je bila  $V_0$  med  $(0,025 - 0,030) \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ .

Odmerili smo 10  $\mu\text{L}$  encima 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) v 2990  $\mu\text{L}$  fosfatnega pufra (0,01 M; pH 7,4). Med izvajanjem meritev smo raztopino hranili na ledeni kopeli.

### Natrijev hidroksid (NaOH)

Uporabili smo 0,02 M raztopino NaOH proizvajalca Merks, kot topilo za pripravo raztopine ksantina.

### Metanol

Uporabili smo metanol CHROMASOLV<sup>®</sup> za HPLC  $\geq 99,9$  % čistostjo proizvajalca SIGMA, kot topilo za pripravo osnovnih raztopin vzorcev.

### Bidestilirana voda

Je voda brez ionov, elementov v sledovih in nečistot, ki so prisotne v vodovodni vodi. Uporabili smo jo kot topilo.

## **3.1.4 Merilni pripomočki in aparati**

Pri delu smo uporabili naslednje pripomočke:

- polavtomatske pipete BRAND Tranferpette<sup>®</sup>: 0,5 - 5 mL, 100 - 1000  $\mu$ L, 10 - 100  $\mu$ L (Nemčija),
- nastavke za pipete BRAND Tranferpette<sup>®</sup> (Nemčija),
- 5 mL penicilinke neoLAB (Nemčija),
- plastične kivete 1,5 mL, semimikro BRAND Tranferpette<sup>®</sup> (Nemčija),
- laboratorijsko steklovino različnih proizvajalcev,
- osebna zaščitna sredstva,
- ledeno kopel.

Pri delu smo uporabili naslednje aparate:

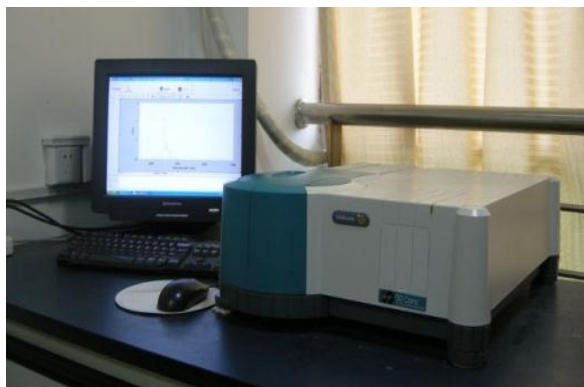
- analitsko tehniko AG 245 proizvajalca METTLER TOLEDO,
- ultrazvočno kopel Sonis 4 proizvajalca ISKRA pio d.o.o.,
- aparat UV-Visible spektrophotometer 50Conc proizvajalca Varian (Kalifornija),
- aparaturo za pripravo bidestilirane vode Milli-Q Advantage A10 proizvajalca Millipore.

## 3.2 METODE DE LA

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

#### 3.2.1.1 Izvedba metode

Metoda je delno avtomatizirana in se izvaja na aparatu UV-Visible spektrophotometer 50Conc proizvajalca Varian. Aparat je prikazan na sliki 9.



**Slika 9:** Aparat UV-Visible spektrophotometer 50Conc proizvajalca Varian

Analiza spojine poteka v kiveti, v katero odmerimo določen volumen osnovnih raztopin (fosfatnega pufra, ksantina, citokroma c, katalaze) in testne spojine. Osnovne raztopine, razen fosfatnega pufra, je potrebno do analize hraniti na ledeni kopeli, saj s tem podaljšamo stabilnost raztopin. Tik po vstavitvi kivete v vzorčno mesto v UV-Vis spektrofotometru se doda še ksantin oksidaza. Vzorčno mešanico dobro premešamo, saj se po dodatku ksantin oksidaze tvori  $O_2^{\bullet-}$  (15). Reakcija poteka pri sobni temperaturi. Postopek priprave raztopine v kiveti je prikazan v preglednici 3.

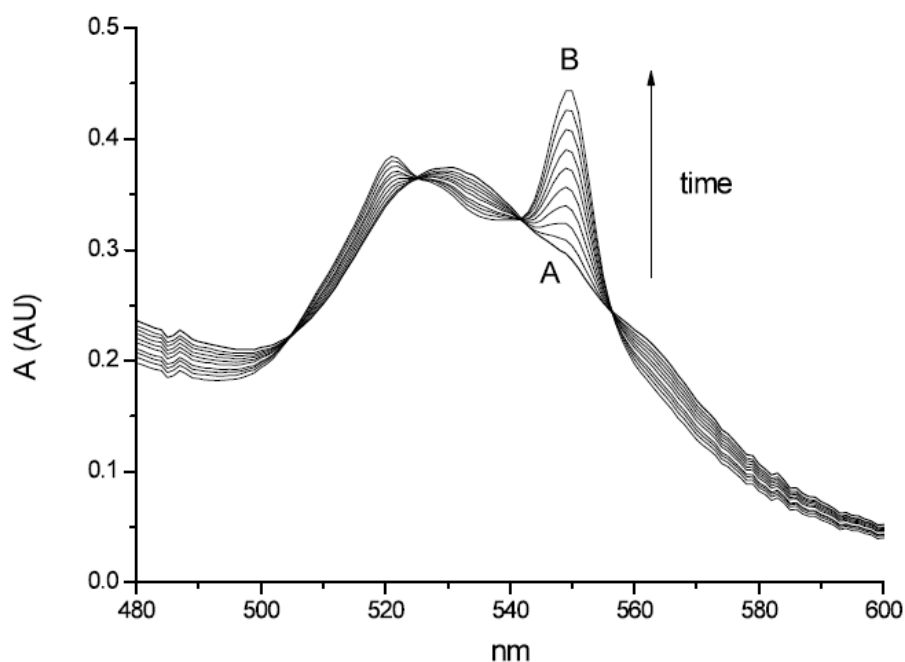
Pred samo analizo spojin smo izmerili slepi vzorec ( $V_0$ ) brez prisotnosti testne spojine, ki nam je služil kot kalibracija.  $V_0$  je vrednost nezmanjšane hitrosti redukcije citokroma c ( $\Delta A_{550nm}/\Delta t$ ), ki mora biti med  $(0,025 - 0,030) \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ . Če je izmerjena vrednost drugačna od te vrednosti, je potrebno spremeniti koncentracijo dodanega encima ksantin oksidaze, s katero uravnavamo  $V_0$  (15).

Postopek analize je računalniško podprt. Absorpcijo merimo pri valovni dolžini 550 nm vsakih 10 sekund, saj je pri tej valovni dolžini dobro vidna hitrost redukcije citokroma c, kar je vidno iz slike 10.

S pomočjo absorpcijske krivulje se izmerjeni signal preračuna v vrednost  $V_c$  ( $\Delta A/\text{min}$ ), ki se po dodatku spojine zmanjša in predstavlja zmanjšano hitrost redukcije citokroma c (15). Analiza traja 10 minut in zahteva 2000  $\mu\text{L}$  celotnega volumna osnovnih raztopin in analizirane spojine.

**Preglednica 3:** Prikaz postopka priprave vzorca v kiveti

| Kiveta                   | Volumen ( $\mu\text{L}$ ) | Koncentracija ( $\mu\text{M}$ ) |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| fosfatni pufer           | 1514                      | /                               |
| citokrom c               | 124                       | 50                              |
| ksantin                  | 100                       | 50                              |
| katalaza                 | 12                        | 30                              |
| ksantin oksidaza         | 50                        | /                               |
| spojina / fosfatni pufer | 200                       | /                               |
|                          | <b>2000</b>               | /                               |



**Slika 10:** 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 (glej A in B) (15)

### 3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel 2010. Izračunane vrednosti  $(V_0/V_c) - 1$  predstavljajo vrednost  $I_{50}$ .  $I_{50}$  je vrednost katera ustreza koncentraciji spojine za katero je  $V_0 = 2 \cdot V_c$ , in je vrednost  $(V_0/V_c) - 1 = 1$  na linearni premici. Vrednosti  $(V_0/V_c) - 1$  smo dobili iz vrednosti  $V_0$  ter iz vrednosti  $V_c$  ( $\Delta A/\min$ ), ki predstavljajo zmanjšano hitrost redukcije citokroma c pri različnih koncentracijah analiziranih spojin. Vnesli smo jih v računalniški program, s pomočjo katerega smo iz dobljenega grafa oblikovali umeritveno premico za vsako spojino.

Iz umeritvene premice smo pri vrednosti 1 izračunali koncentracijo (x), ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ). To koncentracijo smo podali kot  $x \pm$  standardna napaka (SN).

Izračunali smo naslednje statistične podatke: enačbo regresijske premice, koeficient determinacije in standardno napako.

#### 3.3.1 Linearna regresija

Z linearno regresijo skušamo prikazati povezavo in linearno medsebojno odvisnost med spremenljivkama  $(V_0/V_c) - 1$  in koncentracijo analizirane spojine, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v obliki enačbe premice (23).

Linearno regresijo premico smo izračunali za vsako analizirano spojino po enačbi regresijske premice.

Enačba regresijske premice:  $y = k \cdot x + n$

Pri čemer je:

y...absorbanca,

n...odmik regresijske premice na ordinati,

k...naklon regresijske premice,

x...koncentracija.

### 3.3.2 Koeficient determinacije

Koeficient determinacije ( $R^2$ ) je razmerje med pojasnjeno varianco in skupno varianco ter 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:  $R^2_{xy} = (\sum (y' - y_{pv})^2) / (\sum (y - y_{pv})^2)$

Pri čemer je:

$R^2_{xy}$ ...koeficient determinacije,

y...dejanska vrednost dane spremenljivke,

y'...predvidena vrednost iste spremenljivke y ob znani korelaciji med x in y ter vrednosti x.

### 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 (28). Ocenjeno za standardno napako dobimo na osnovi nepojasnjene variance, ki meri razpršenost točk okoli premice (32).

Za izračun SN smo uporabili statistično funkcijo STEYX v programu Excel (Microsoft Office 2010).

Enačba za standardno napako napovedanega y-a je:

$$SN^2 = 1/(n-2) \left| \sum (y-y') - \left| \sum (x-x')(y-y') \right|^2 / \sum (x-x')^2 \right|$$

Pri čemer je:

n...velikost vzorca,

$\bar{y}$ ...vzorčna srednja vrednost y,

y...matrika ali obseg odvisnih podatkovnih točk,

x...matrika ali obseg neodvisnih podatkovnih točk,

$\bar{x}$ ...vzorčna srednja vrednost x.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ŠTEVILO OPRAVLJENIH MERITEV

V magistrsko nalogo smo vključili 20 spojin, ki smo jih analizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Za vsako spojino smo opravili meritev pri petih ali šestih koncentracijah ter po eno meritev za določitev slepega vzorca. Skupaj je bilo opravljenih 119 meritev za določitev koncentracij, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ).

### 4.2 KVANTITATIVNO DOLOČANJE KONCENTRACIJE, KI JE POTREBNA ZA ZMANJŠANJE HITROSTI REDUKCIJE CITOKROMA C ZA 50 % ( $I_{50}$ )

Koncentracijo, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ), smo z UV-Vis spektrofotometrom določili tako, da smo pred analizo spojin izmerili slepi vzorec brez prisotnosti testirane spojine ( $V_0$ ), ki nam je služil kot kalibracija, in predstavlja nezmanjšano hitrost redukcije citokroma c ( $\Delta A_{550nm}/\Delta t$ ), ki mora biti med  $(0,025 - 0,030) \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ . Če je izmerjena vrednost drugačna od te vrednosti, je potrebno spremeniti koncentracijo dodanega encima ksantin oksidaze, s katerim uravnavamo  $V_0$ .

Za vsako spojino se s pomočjo absorpcijske krivulje izmerjeni signal preračuna v vrednost  $V_c$  ( $\Delta A/\text{min}$ ), ki predstavlja zmanjšano hitrost redukcije citokroma c pri različnih koncentracijah analiziranih spojin.

Izračunane vrednosti  $(V_0/V_c) - 1$ , katere smo dobili iz vrednosti  $V_c$ , ter iz vrednosti  $V_0$ , smo vnesli v računalniški program Microsoft Excel 2010, s pomočjo katerega smo iz dobljenega grafa oblikovali umeritveno premico za vsako spojino.

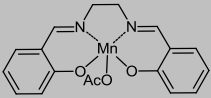
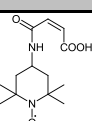
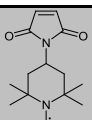
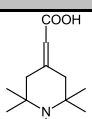
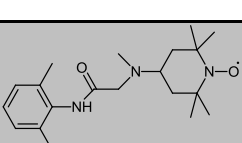
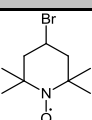
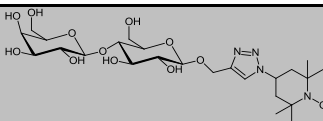
Iz umeritvene premice smo pri vrednosti 1 izračunali koncentracijo ( $x$ ), ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ). To koncentracijo smo podali kot  $x \pm$  standardna napaka (SN). Rezultati in ostali podatki o analiziranih spojinah so podani v preglednicah od 5 do 25.

### 4.3 KONCENTRACIJE, KI SO POTREBNE ZA ZMANJŠANJE HITROSTI REDUKCIJE CITOKROMA C ZA 50 % (I<sub>50</sub>) PRI IZBRANIH SPOJINAH

#### 4.3.1 Analizirane spojine

Spojine, ki smo jih analizirali v magistrski nalogi, so prikazani v preglednici 4.

**Preglednica 4:** Prikaz analiziranih spojin

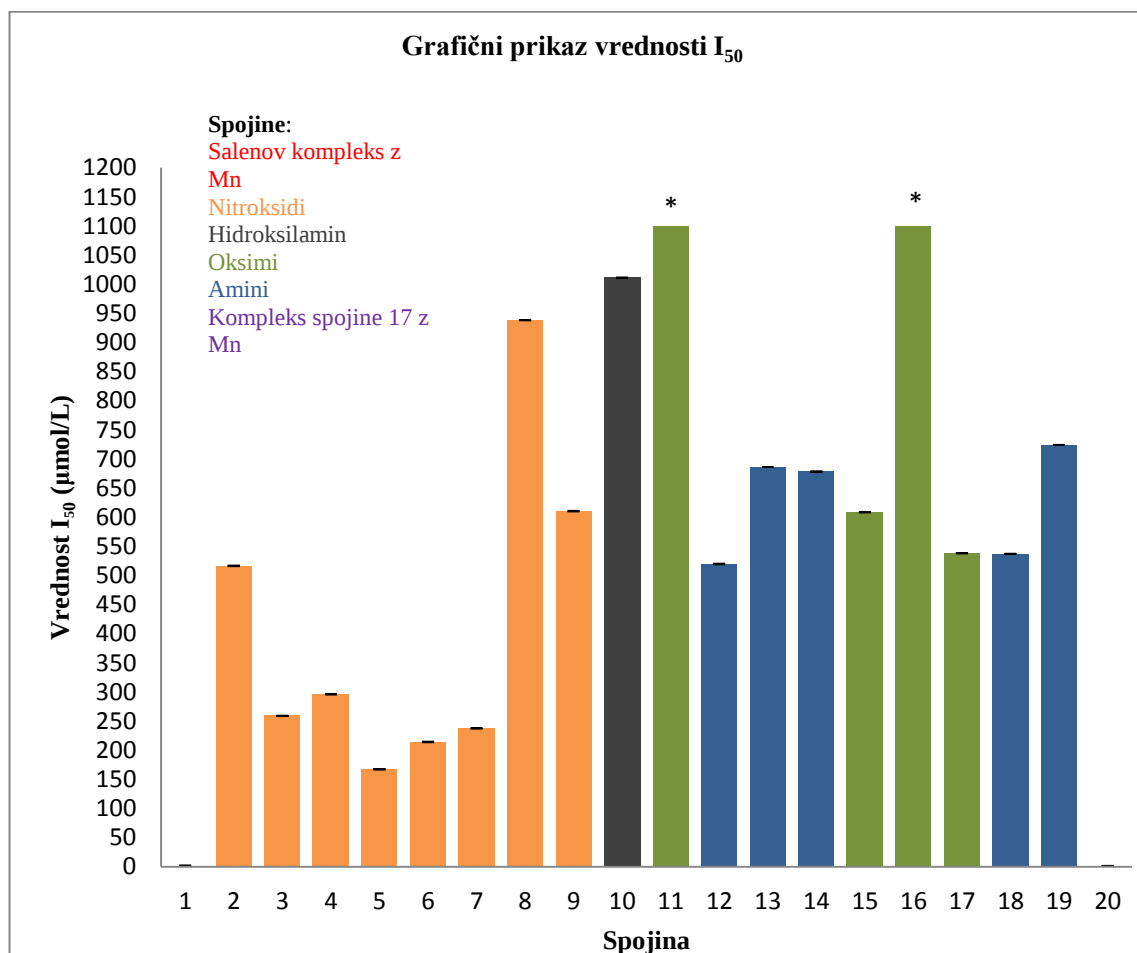
| Spojina | IUPAC ime spojine                                                                       | Kemijska formula                                                | Mol. masa (g/mol) | Kemijska struktura                                                                    |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1       | [Mn <sup>3+</sup> (salen)OAc]                                                           | C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> MnN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | 380,28            |    |
| 2       | 1-oksil-2,2,7,7-tetrametil-1,4-diazepan-5-on                                            | C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>    | 185,13            |    |
| 3       | 4-bromo-1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-karboksilna kislina                       | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> BrNO <sub>3</sub>               | 279,15            |   |
| 4       | (Z)-4-((1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-4-oksobut-2-enojska kislina     | C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>   | 269,32            |  |
| 5       | 1-(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-1H-pirol-2,5-dione                         | C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>   | 251,30            |  |
| 6       | 2-(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-iliden)ocetna kislina                          | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>3</sub>                 | 212,27            |  |
| 7       | N-(2,6-dimetilfenil)-2-((1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)(metil)amino)acetamid | C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>   | 346,25            |  |
| 8       | 4-bromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil                                             | C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> BrNO                             | 235,14            |  |
| 9       | *                                                                                       | C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>  | 577,60            |  |

| Spojina | IUPAC ime spojine                                                                                        | Kemijska formula       | Mol. masa (g/mol) | Kemijska struktura |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| 10      | 1-hidroksi-2,2,6,6-tetrametil-4-okso-1-piperidin-1-ijev klorid                                           | $C_9H_{18}ClNO_2$      | 207,70            |                    |
| 11      | (R,2Z,6Z)-2,6-bis(hidroksiimino) piperidin-3-amonijev klorid                                             | $C_5H_{11}ClN_4O_2$    | 194,62            |                    |
| 12      | 2,2,7,7-tetrametil-1,4-diazepan-5-on                                                                     | $C_9H_{18}N_2O$        | 170,25            |                    |
| 13      | N-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)acetamid                                                             | $C_{11}H_{22}N_2O$     | 198,31            |                    |
| 14      | N-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)formamid                                                             | $C_{10}H_{20}N_2O$     | 184,16            |                    |
| 15      | tert-butyl ((R,2Z,6Z)-2,6-bis(hidroksiimino) piperidin-3-il)karbamat                                     | $C_{10}H_{18}N_4O_4$   | 158,27            |                    |
| 16      | tert-butil ((R,1Z,5Z)-1,5-bis(hidroksiimino)pentan-2-il)karbamat                                         | $C_{10}H_{21}N_5O_4$   | 275,30            |                    |
| 17      | tert-butil ((R,2Z,5Z)-2,5-bis(hidroksiimino) pirolidin-3-il)karbamat                                     | $C_9H_{16}N_4O_4$      | 244,25            |                    |
| 18      | tert-butil ((S)-1-(((R,2Z,6Z)-2,6-bis(acetoksiimino) piperidin-3-il)amino)-1-okso-2-propan-2-il)karbamat | $C_{17}H_{27}N_5O_7$   | 413,43            |                    |
| 19      | tert-butil ((R,2Z,6Z)-2,6-bis(acetoksiimino) piperidin-3-il)karbamat                                     | $C_{14}H_{22}N_4O_6$   | 342,35            |                    |
| 20      | Kompleks 17 z manganovim(III) acetatom                                                                   | $C_{11}H_{17}MnN_4O_6$ | 356,21            |                    |

\* (2S,3R,4S,5R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,6R)-4,5-dihidroksi-6-((1-(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-2-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)oksi)-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triol

### 4.3.2 Grafični prikaz vseh vrednosti $I_{50}$

Iz grafa 1 je razvidna vrednost koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ), z upoštevanjem SN za spojine, ki izražajo SOD mimetično aktivnost. 18 spojin je izkazovalo SOD mimetično aktivnost, pri dveh spojinah pa vrednost  $I_{50}$  ni možna, saj spojini nista izkazovali SOD mimetične aktivnosti.



**Graf 1:** Graf koncentracij, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ), v izbranih spojinah, z upoštevanjem SN

Legenda:

\* Vrednost  $I_{50}$  ni možna, saj spojina pri koncentraciji 2,0 mmol/L ni bila aktivna

SN

### 4.3.3 Vrednosti $I_{50}$

#### 4.3.3.1 Salenov kompleks z manganom

##### Spojina 1

$$V_0 = 0,0270 \text{ (SN } \pm 0,0006)$$

**Preglednica 5:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 1. Graf je prikazan na grafu 2

| 1 ( $\mu\text{mol/L}$ ) | $V_c$ ( $\Delta\text{A/min}$ ) | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------|
| 0,5                     | 0,0215                         | 0,256           | 0,0022       |
| 1,3                     | 0,0157                         | 0,720           | 0,0035       |
| 2,0                     | 0,0128                         | 1,109           | 0,0039       |
| 2,66                    | 0,0110                         | 1,455           | 0,0045       |
| 4,0                     | 0,0076                         | 2,553           | 0,0044       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 0,647x - 0,136$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,989$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 1 je  $1,755 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ .

#### 4.3.3.2 Nitroksidi

##### Spojina 2

$$V_0 = 0,0236 \text{ (SN } \pm 0,0014)$$

**Preglednica 6:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 2. Graf je prikazan na grafu 3

| 2 ( $\text{mmol/L}$ ) | $V_c$ ( $\Delta\text{A/min}$ ) | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------|--------------|
| 0,2                   | 0,0170                         | 0,388           | 0,0022       |
| 0,4                   | 0,0154                         | 0,532           | 0,0033       |
| 0,8                   | 0,0090                         | 1,622           | 0,0048       |
| 1,33                  | 0,0055                         | 3,291           | 0,0048       |
| 2,0                   | 0,0032                         | 6,375           | 0,0035       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 3,357x - 0,734$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,973$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 2 je  $516,5 \pm 0,47 \mu\text{mol/L}$ .

Spojina 3

$$V_0 = 0,0251 \text{ (SN } \pm 0,0007)$$

**Preglednica 7:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 3. Graf je prikazan na grafu 4

| 3 (mmol/L) | $V_c (\Delta A/\text{min})$ | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| 0,133      | 0,0177                      | 0,418           | 0,0034       |
| 0,2        | 0,0153                      | 0,641           | 0,0035       |
| 0,266      | 0,0136                      | 0,856           | 0,0039       |
| 0,4        | 0,0089                      | 1,820           | 0,0036       |
| 0,5        | 0,0073                      | 2,438           | 0,0034       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 5,708x - 0,479$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,979$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojina 3 je  $259,1 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ .

Spojina 4

$$V_0 = 0,0229 \text{ (SN } \pm 0,0005)$$

**Preglednica 8:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 4. Graf je prikazan na grafu 5

| 4 (mmol/L) | $V_c (\Delta A/\text{min})$ | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| 0,133      | 0,0192                      | 0,193           | 0,0022       |
| 0,2        | 0,0158                      | 0,449           | 0,0027       |
| 0,3        | 0,0135                      | 0,696           | 0,0036       |
| 0,5        | 0,0079                      | 1,899           | 0,0034       |
| 0,8        | 0,0038                      | 5,026           | 0,0024       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 7,232x - 1,143$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,953$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojina 4 je  $296,4 \pm 0,50 \mu\text{mol/L}$ .

Spojina 5

$$V_0 = 0,0292 \text{ (SN } \pm 0,0006)$$

**Preglednica 9:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 5. Graf je prikazan na grafu 6

| 5 (mmol/L) | V <sub>c</sub> (ΔA/min) | (V <sub>0</sub> /V <sub>c</sub> ) - 1 | SN (±) |
|------------|-------------------------|---------------------------------------|--------|
| 0,133      | 0,0161                  | 0,814                                 | 0,0054 |
| 0,2        | 0,0125                  | 1,336                                 | 0,0060 |
| 0,3        | 0,0096                  | 2,042                                 | 0,0057 |
| 0,5        | 0,0061                  | 3,787                                 | 0,0049 |
| 0,8        | 0,0038                  | 6,684                                 | 0,0037 |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 8,817x - 0,476$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,997$ .

Vrednost I<sub>50</sub> za spojino 5 je  $167,4 \pm 0,15 \mu\text{mol/L}$ .

Spojina 6

$$V_0 = 0,0276 \text{ (SN } \pm 0,0005)$$

**Preglednica 10:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 6. Graf je prikazan na grafu 7

| 6 (mmol/L) | V <sub>c</sub> (ΔA/min) | (V <sub>0</sub> /V <sub>c</sub> ) - 1 | SN (±) |
|------------|-------------------------|---------------------------------------|--------|
| 0,133      | 0,0193                  | 0,430                                 | 0,0027 |
| 0,2        | 0,0149                  | 0,852                                 | 0,0030 |
| 0,3        | 0,0107                  | 1,579                                 | 0,0034 |
| 0,4        | 0,0078                  | 2,538                                 | 0,0029 |
| 0,5        | 0,0052                  | 4,308                                 | 0,0042 |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 10,2x - 1,186$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,954$ .

Vrednost I<sub>50</sub> za spojino 6 je  $214,3 \pm 0,38 \mu\text{mol/L}$ .

Spojina 7

$$V_0 = 0,0261 \text{ (SN } \pm 0,0009)$$

**Preglednica 11:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 7. Graf je prikazan na grafu 8

| 7 (mmol/L) | $V_c (\Delta A/\text{min})$ | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| 0,133      | 0,0184                      | 0,418           | 0,0024       |
| 0,2        | 0,0139                      | 0,878           | 0,0032       |
| 0,3        | 0,0121                      | 1,157           | 0,0037       |
| 0,5        | 0,0070                      | 2,729           | 0,0037       |
| 0,8        | 0,0040                      | 5,525           | 0,0032       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 7,656x - 0,819$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,982$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 7 je  $237,5 \pm 0,32 \mu\text{mol/L}$ .

Spojina 8

$$V_0 = 0,0229 \text{ (SN } \pm 0,0007)$$

**Preglednica 12:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 8. Graf je prikazan na grafu 9

| 8 (mmol/L) | $V_c (\Delta A/\text{min})$ | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| 0,2        | 0,0181                      | 0,265           | 0,0020       |
| 0,4        | 0,0133                      | 0,722           | 0,0032       |
| 0,8        | 0,0095                      | 1,411           | 0,0042       |
| 1,33       | 0,0080                      | 1,863           | 0,0051       |
| 2,0        | 0,0063                      | 2,635           | 0,0033       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 1,263x - 0,185$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,976$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 8 je  $938,4 \pm 17 \mu\text{mol/L}$ .

Spojina 9

$$V_0 = 0,0225 \text{ (SN } \pm 0,0007)$$

**Preglednica 13:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine **9**. Graf je prikazan na grafu 10

| <b>9 (mmol/L)</b> | <b>V<sub>c</sub> (ΔA/min)</b> | <b>(V<sub>0</sub>/V<sub>c</sub>) - 1</b> | <b>SN (±)</b> |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| <b>0,1</b>        | 0,0198                        | 0,136                                    | 0,0020        |
| <b>0,2</b>        | 0,0164                        | 0,372                                    | 0,0032        |
| <b>0,133</b>      | 0,0151                        | 0,490                                    | 0,0042        |
| <b>1,0</b>        | 0,0064                        | 2,516                                    | 0,0051        |
| <b>2,0</b>        | 0,0048                        | 3,688                                    | 0,0033        |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 1,882x - 0,152$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,964$ .

Vrednost I<sub>50</sub> za spojino **9** je  $610,6 \pm 0,35 \text{ } \mu\text{mol/L}$ .

**4.3.3.3 Hidroksilamin**Spojina 10

$$V_0 = 0,0245 \text{ (SN } \pm 0,0005)$$

**Preglednica 14:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine **10**. Graf je prikazan na grafu 11

| <b>10 (mmol/L)</b> | <b>V<sub>c</sub> (ΔA/min)</b> | <b>(V<sub>0</sub>/V<sub>c</sub>) - 1</b> | <b>SN (±)</b> |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| <b>0,2</b>         | 0,0178                        | 0,376                                    | 0,0041        |
| <b>0,5</b>         | 0,0124                        | 0,976                                    | 0,0053        |
| <b>0,8</b>         | 0,0103                        | 1,379                                    | 0,0063        |
| <b>1,0</b>         | 0,0068                        | 2,603                                    | 0,0050        |
| <b>2,0</b>         | 0,0064                        | 2,828                                    | 0,0041        |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 1,372x - 0,398$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,796$ .

Vrednost I<sub>50</sub> za spojino **10** je  $1011,1 \pm 0,55 \text{ } \mu\text{mol/L}$ .

**4.3.3.4 Oksimi****Spojina 11**

$$V_0 = 0,0216 \text{ (SN } \pm 0,0004)$$

**Preglednica 15:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 11

| 11 (mmol/L) | $V_c (\Delta A/\text{min})$ | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|-------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| 2,0         | 0,0160                      | 0,35            | 0,0100       |

Izračun enačbe regresijske premice ni možen.

Vrednost koeficienta determinacije ni možna.

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 11 ni mogoče določiti, saj pri tej koncentraciji ni bilo aktivnosti.

**Spojina 15**

$$V_0 = 0,0211 \text{ (SN } \pm 0,0005)$$

**Preglednica 16:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 15. Graf je prikazan na grafu 12

| 15 (mmol/L) | $V_c (\Delta A/\text{min})$ | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|-------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| 0,2         | 0,0165                      | 0,279           | 0,0021       |
| 0,4         | 0,0134                      | 0,575           | 0,0032       |
| 0,8         | 0,009                       | 1,344           | 0,0041       |
| 1,33        | 0,0063                      | 2,349           | 0,0044       |
| 2,0         | 0,0046                      | 3,587           | 0,0045       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 1,858x - 0,131$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,999$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 15 je  $608,6 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ .

**Spojina 16**

$$V_0 = 0,0216 \text{ (SN } \pm 0,0004)$$

**Preglednica 17:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 16

| 16 (mmol/L) | $V_c (\Delta A/\text{min})$ | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|-------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| 2,0         | 0,0205                      | 0,05            | 0,0040       |

Izračun enačbe regresijske premice ni možen.

Vrednost koeficienta determinacije ni možna.

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 16 ni moče določiti, saj pri tej koncentraciji ni bilo aktivnosti.

**Spojina 17**

$$V_0 = 0,0211 \text{ (SN } \pm 0,0012)$$

**Preglednica 18:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 17. Graf je prikazan na grafu 13

| 17 (mmol/L) | $V_c (\Delta A/\text{min})$ | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|-------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| 0,2         | 0,0173                      | 0,220           | 0,0025       |
| 0,4         | 0,0143                      | 0,476           | 0,0041       |
| 0,8         | 0,0082                      | 1,573           | 0,0054       |
| 1,33        | 0,0048                      | 3,396           | 0,0051       |
| 2,0         | 0,0031                      | 5,806           | 0,0040       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 3,172x - 0,707$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,991$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 17 je  $538,1 \pm 0,26 \mu\text{mol/L}$ .

**4.3.3.5 Amini****Spojina 12**

$$V_0 = 0,0245 \text{ (SN } \pm 0,0006)$$

**Preglednica 19:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 12. Graf je prikazan na grafu 14

| 12 (mmol/L) | $V_c$ ( $\Delta A/\text{min}$ ) | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|-------------|---------------------------------|-----------------|--------------|
| 0,2         | 0,0187                          | 0,310           | 0,0040       |
| 0,5         | 0,0141                          | 0,738           | 0,0067       |
| 0,8         | 0,009                           | 1,722           | 0,0067       |
| 1,0         | 0,0078                          | 2,141           | 0,0071       |
| 1,33        | 0,0047                          | 4,213           | 0,0057       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 3,351x - 0,742$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,925$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 12 je  $519,9 \pm 0,48 \mu\text{mol/L}$ .

**Spojina 13**

$$V_0 = 0,0291 \text{ (SN } \pm 0,0014)$$

**Preglednica 20:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine 13. Graf je prikazan na grafu 15

| 13 (mmol/L) | $V_c$ ( $\Delta A/\text{min}$ ) | $(V_0/V_c) - 1$ | SN ( $\pm$ ) |
|-------------|---------------------------------|-----------------|--------------|
| 0,2         | 0,0246                          | 0,183           | 0,0058       |
| 0,4         | 0,0209                          | 0,392           | 0,0078       |
| 0,8         | 0,0141                          | 1,064           | 0,0097       |
| 1,5         | 0,0082                          | 2,549           | 0,0097       |
| 2,0         | 0,0061                          | 3,770           | 0,0086       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 2,015x - 0,383$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,992$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino 13 je  $686,3 \pm 0,16 \mu\text{mol/L}$ .

**Spojina 14**

$$V_0 = 0,0233 \text{ (SN } \pm 0,0006)$$

**Preglednica 21:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine **14**. Graf je prikazan na grafu 16

| <b>14 (mmol/L)</b> | <b><math>V_c (\Delta A/\text{min})</math></b> | <b><math>(V_0/V_c) - 1</math></b> | <b>SN (<math>\pm</math>)</b> |
|--------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <b>0,2</b>         | 0,0187                                        | 0,246                             | 0,0038                       |
| <b>0,4</b>         | 0,0143                                        | 0,629                             | 0,0056                       |
| <b>0,5</b>         | 0,0146                                        | 0,596                             | 0,0060                       |
| <b>0,8</b>         | 0,0106                                        | 1,198                             | 0,0072                       |
| <b>1,0</b>         | 0,0092                                        | 1,533                             | 0,0073                       |
| <b>1,5</b>         | 0,0070                                        | 2,329                             | 0,0073                       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 1,611x - 0,093$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,993$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino **14** je  $678,4 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$ .

**Spojina 18**

$$V_0 = 0,0212 \text{ (SN } \pm 0,0006)$$

**Preglednica 22:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine **18**. Graf je prikazan na grafu 17

| <b>18 (mmol/L)</b> | <b><math>V_c (\Delta A/\text{min})</math></b> | <b><math>(V_0/V_c) - 1</math></b> | <b>SN (<math>\pm</math>)</b> |
|--------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <b>0,2</b>         | 0,0168                                        | 0,262                             | 0,0024                       |
| <b>0,4</b>         | 0,0147                                        | 0,442                             | 0,0040                       |
| <b>0,8</b>         | 0,0083                                        | 1,554                             | 0,0054                       |
| <b>1,33</b>        | 0,0048                                        | 3,417                             | 0,0045                       |
| <b>2,0</b>         | 0,0033                                        | 5,424                             | 0,0041                       |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 2,982x - 0,602$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,992$ .

Vrednost  $I_{50}$  za spojino **18** je  $537,0 \pm 0,23 \mu\text{mol/L}$ .

Spojina 19

$$V_0 = 0,0216 \text{ (SN } \pm 0,0004)$$

**Preglednica 23:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine **19**. Graf je prikazan na grafu 18

| <b>19 (mmol/L)</b> | <b>V<sub>c</sub> (ΔA/min)</b> | <b>(V<sub>0</sub>/V<sub>c</sub>) - 1</b> | <b>SN (±)</b> |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| <b>0,2</b>         | 0,0175                        | 0,234                                    | 0,0024        |
| <b>0,4</b>         | 0,0138                        | 0,565                                    | 0,0038        |
| <b>0,8</b>         | 0,0103                        | 1,097                                    | 0,0059        |
| <b>1,33</b>        | 0,0074                        | 1,919                                    | 0,0064        |
| <b>2,0</b>         | 0,0058                        | 2,724                                    | 0,0054        |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 1,389x - 0,006$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,998$ .

Vrednost I<sub>50</sub> za spojino **19** je  $724,3 \pm 0,06 \text{ } \mu\text{mol/L}$ .

**4.3.3.6 Kompleks z manganovim acetatom**Spojina 20

$$V_0 = 0,0232 \text{ (SN } \pm 0,0006)$$

**Preglednica 24:** Izmerjene hitrosti redukcije citokroma c ob prisotnosti različnih koncentracij spojine **20**. Graf je prikazan na grafu 19

| <b>20 (μmol/L)</b> | <b>V<sub>c</sub> (ΔA/min)</b> | <b>(V<sub>0</sub>/V<sub>c</sub>) - 1</b> | <b>SN (±)</b> |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| <b>0,4</b>         | 0,0165                        | 0,406                                    | 0,0006        |
| <b>0,8</b>         | 0,0137                        | 0,693                                    | 0,0009        |
| <b>1,0</b>         | 0,0108                        | 1,148                                    | 0,0013        |
| <b>1,66</b>        | 0,0062                        | 2,742                                    | 0,0013        |
| <b>2,0</b>         | 0,0054                        | 3,296                                    | 0,0013        |
| <b>2,25</b>        | 0,0036                        | 5,444                                    | 0,0013        |

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = 2,522x - 1,121$ .

Vrednost koeficienta determinacije znaša  $R^2 = 0,910$ .

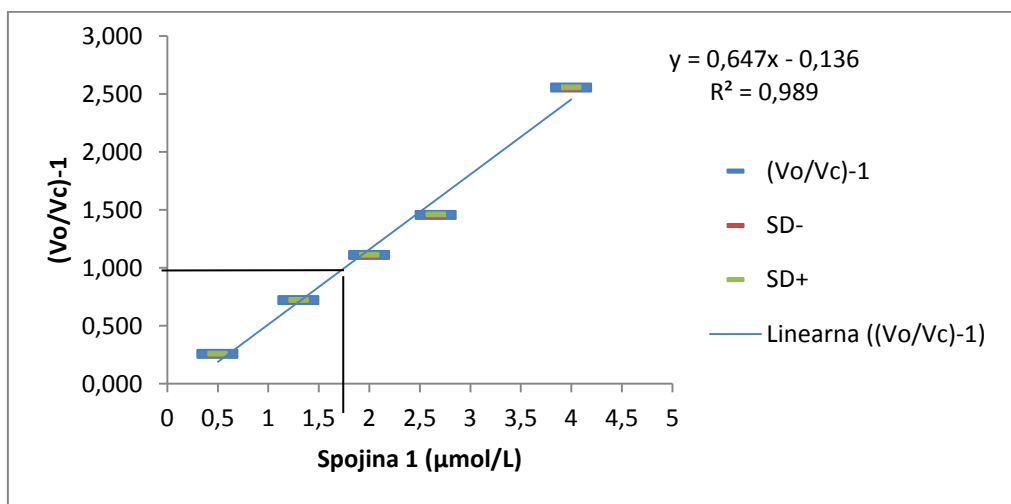
Vrednost I<sub>50</sub> za spojino **20** je  $0,8410 \pm 0,65 \text{ } \mu\text{mol/L}$ .

### 4.3.4 Prikaz izračuna koncentracije iz umeritvene krivulje, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ )

#### 4.3.4.1 Salenov kompleks z manganom

##### Spojina 1

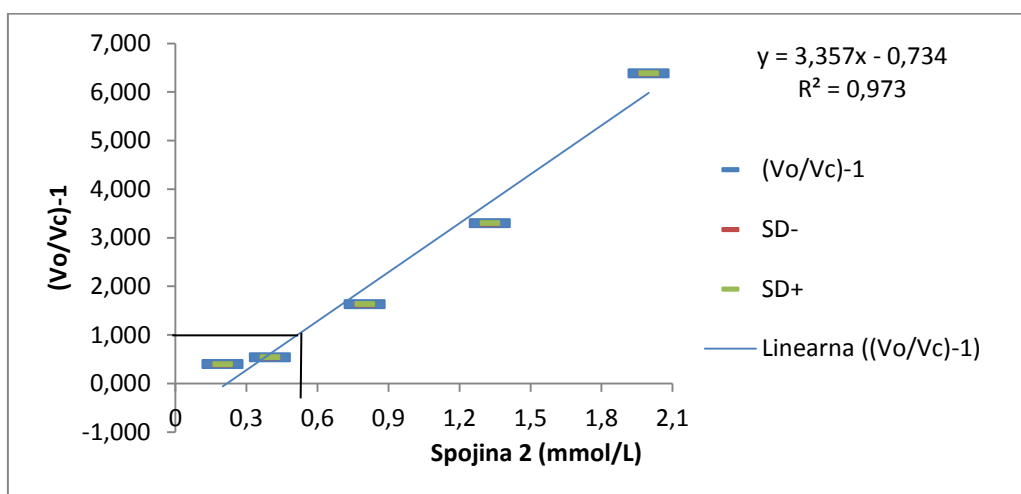
**Graf 2:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 1



#### 4.3.4.2 Nitroksidi

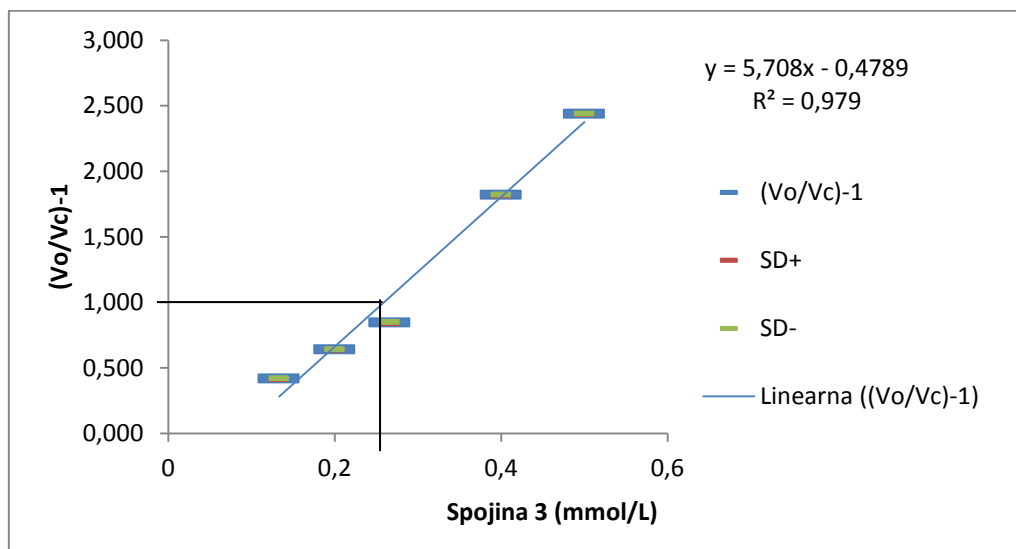
##### Spojina 2

**Graf 3:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 2

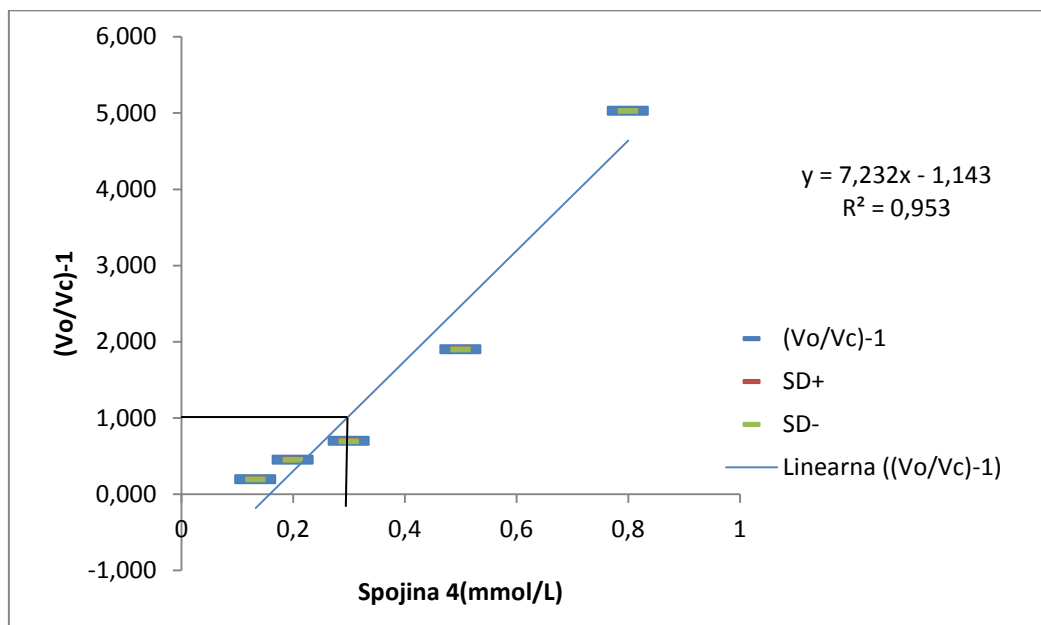


Spojina 3

**Graf 4:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 3

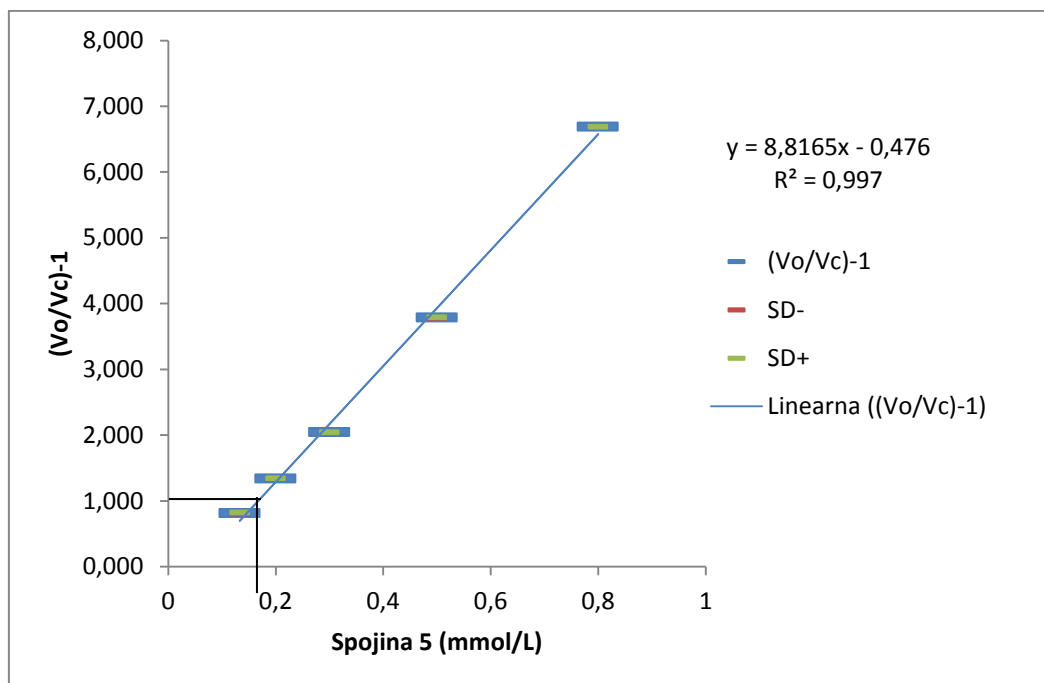
Spojina 4

**Graf 5:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 4

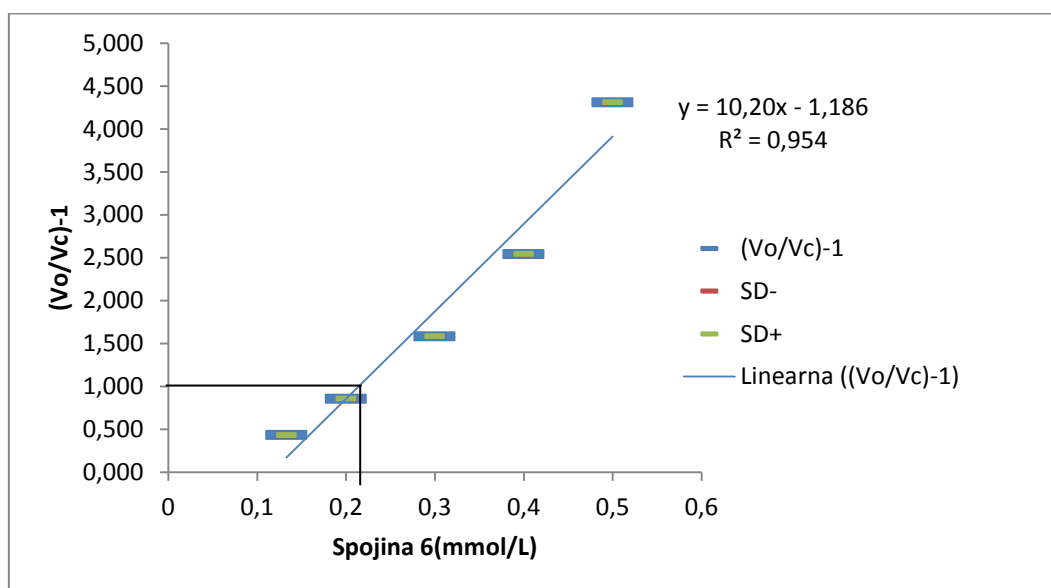


Spojina 5

**Graf 6:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 5

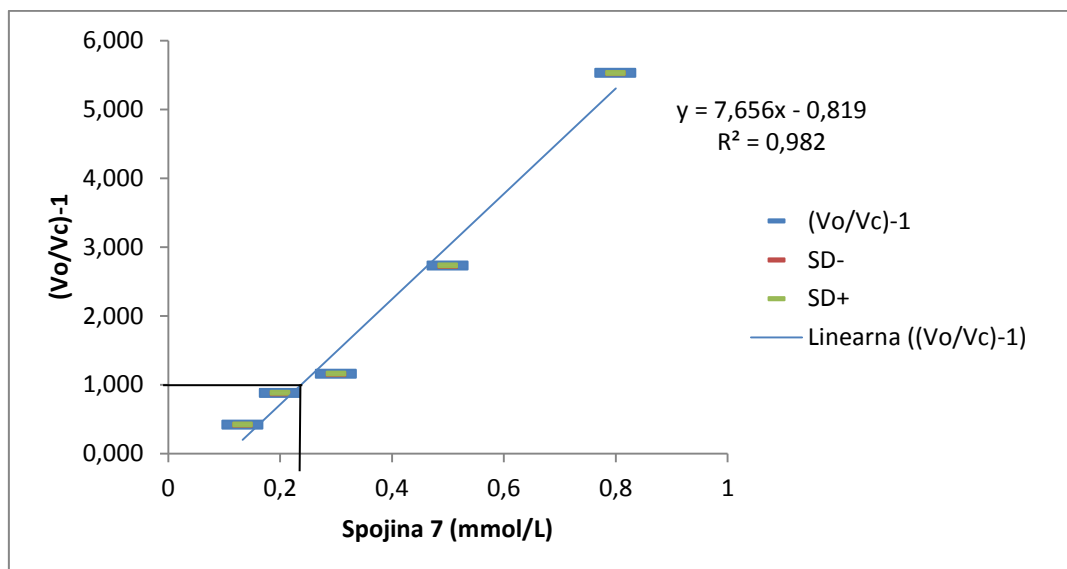
Spojina 6

**Graf 7:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 6

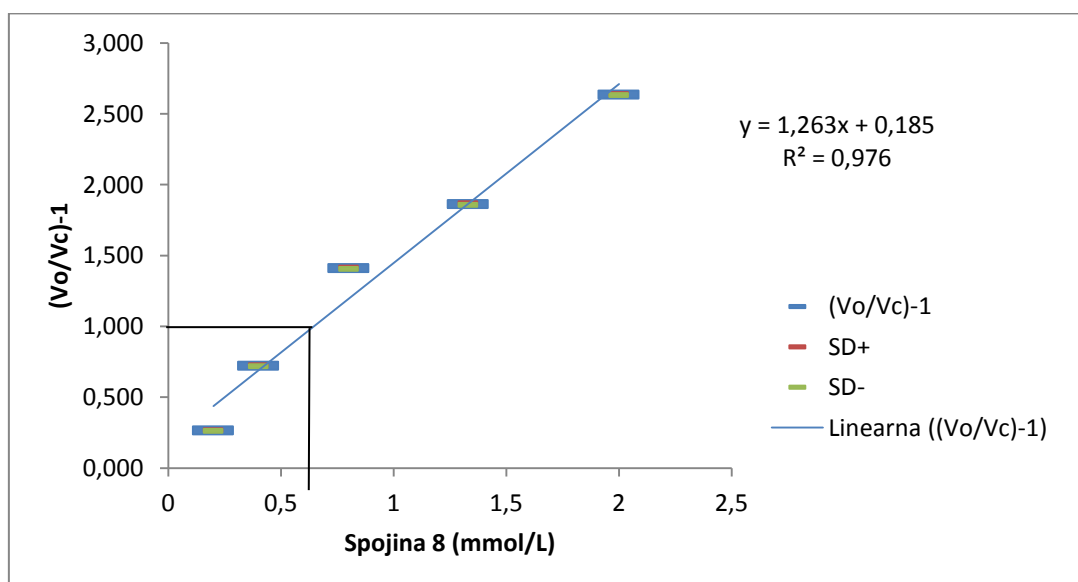


Spojina 7

**Graf 8:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 7

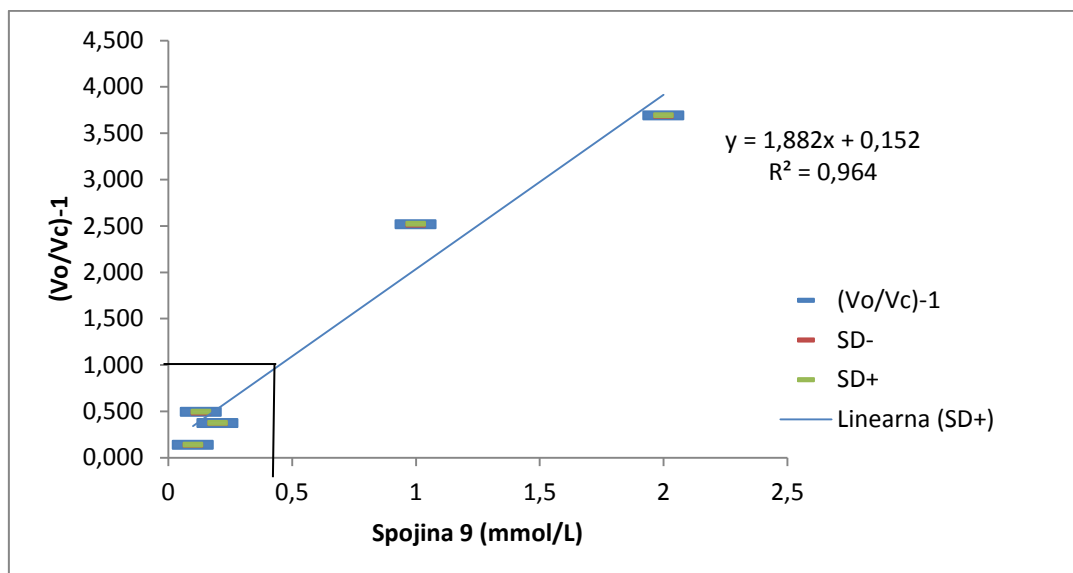
Spojina 8

**Graf 9:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 8



Spojina 9

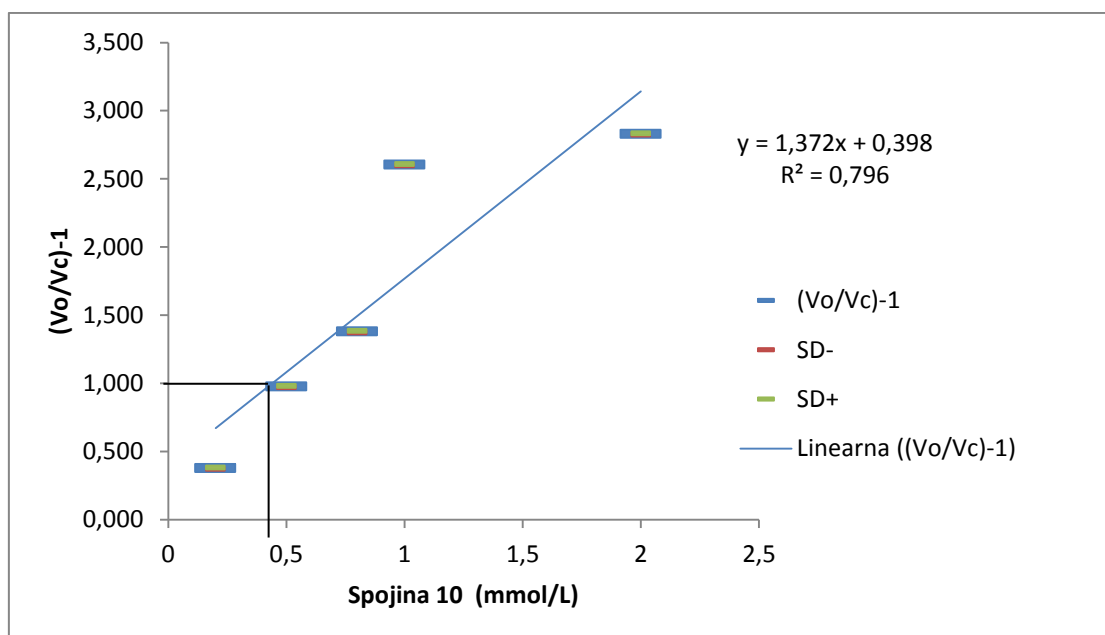
**Graf 10:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 9



## 4.3.4.3 Hidroksilamin

Spojina 10

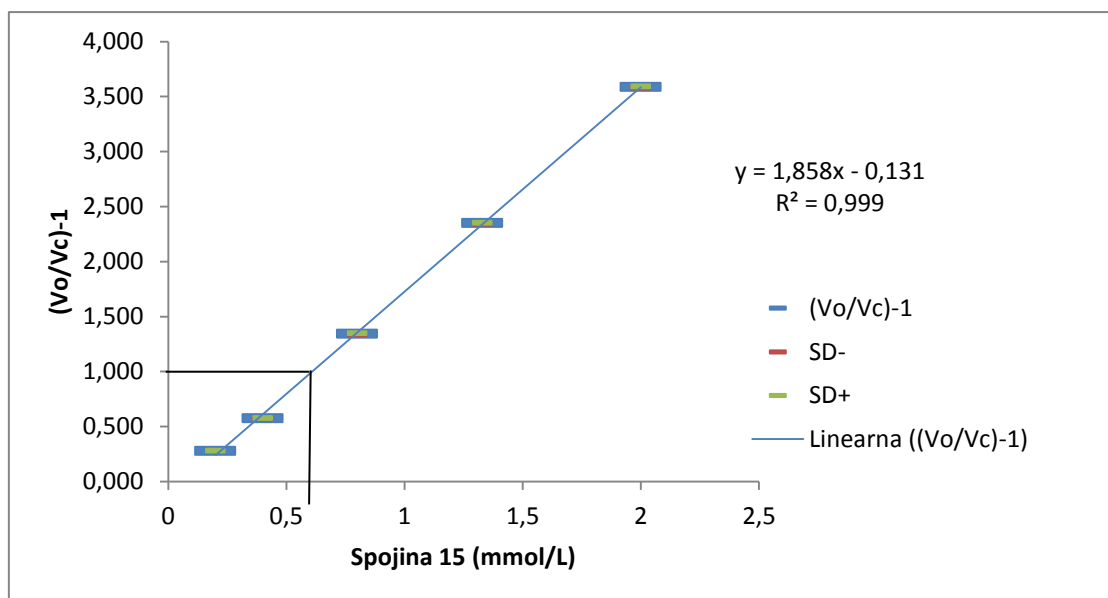
**Graf 11:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 10



#### 4.3.4.4 Oksimi

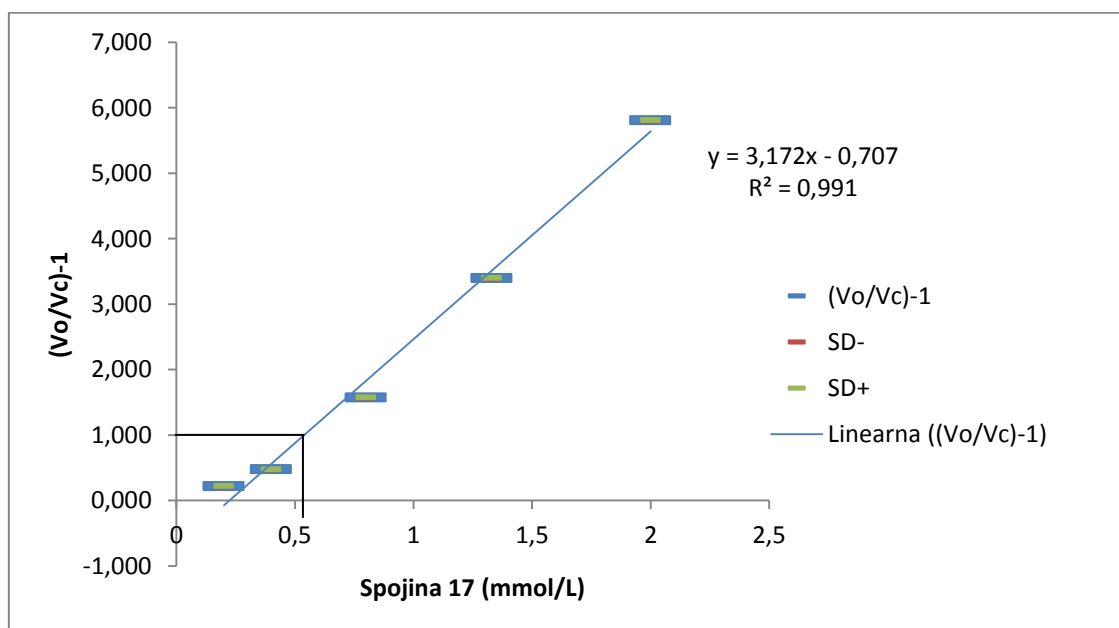
##### Spojina 15

**Graf 12:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 15



##### Spojina 17

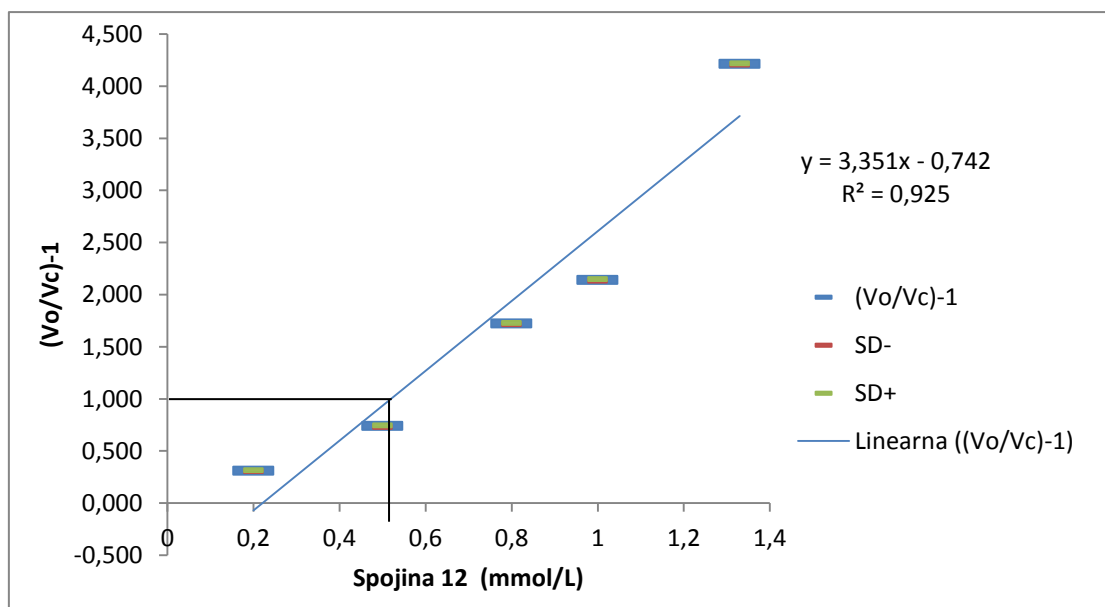
**Graf 13:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 17



#### 4.3.4.5 Amini

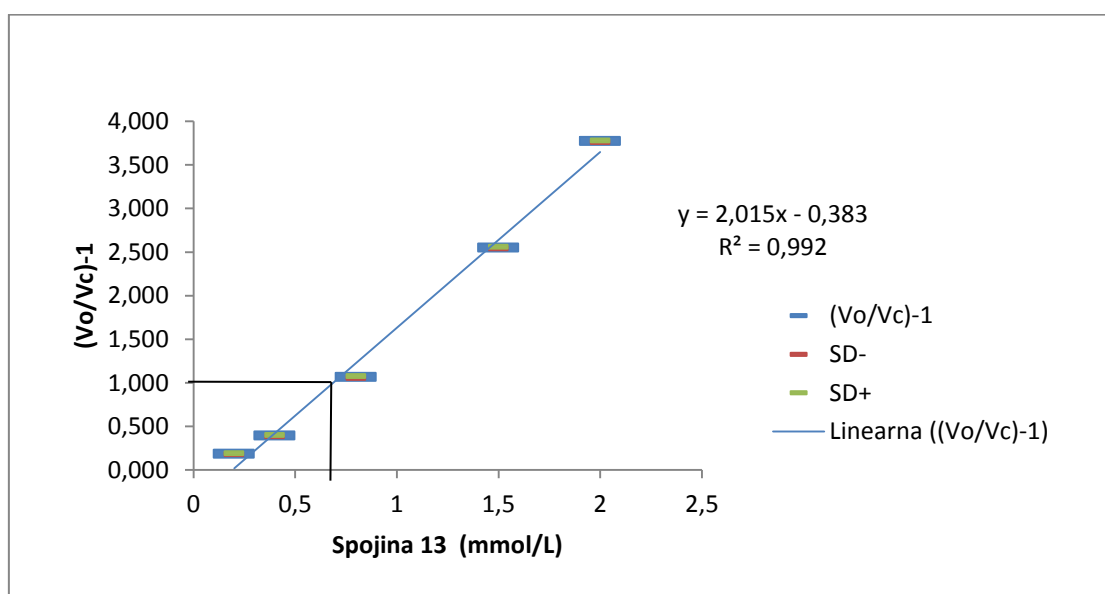
##### Spojina 12

**Graf 14:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 12



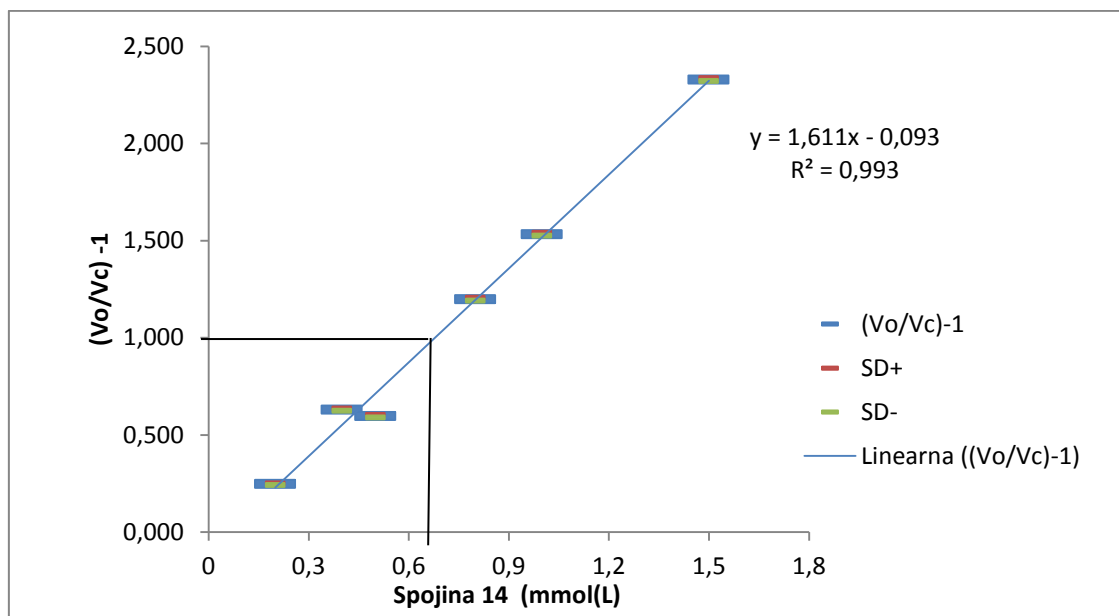
##### Spojina 13

**Graf 15:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 13

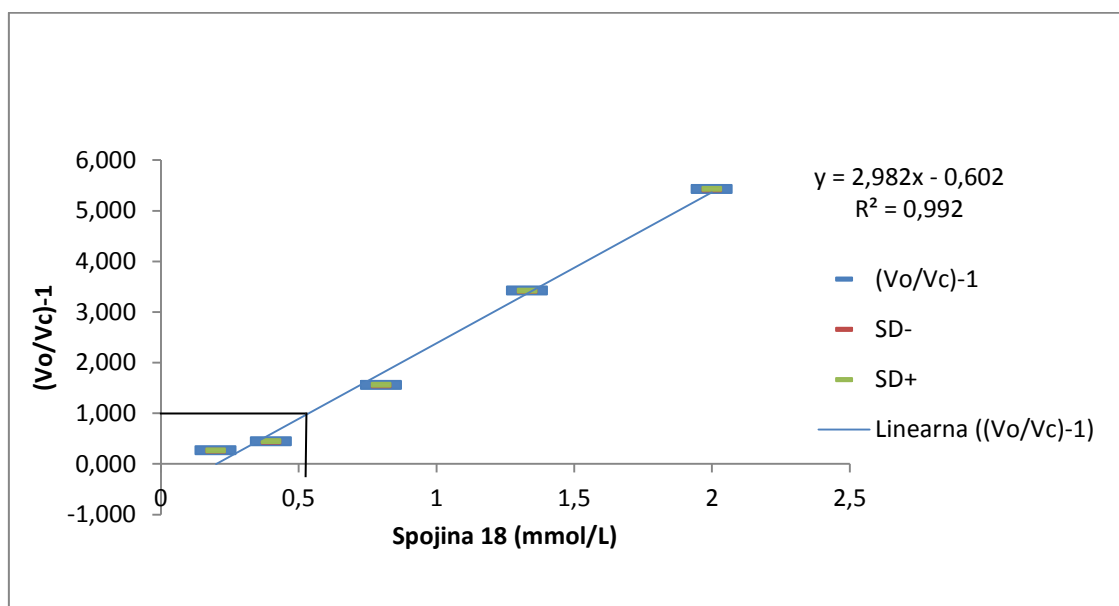


Spojina 14

**Graf 16:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 14

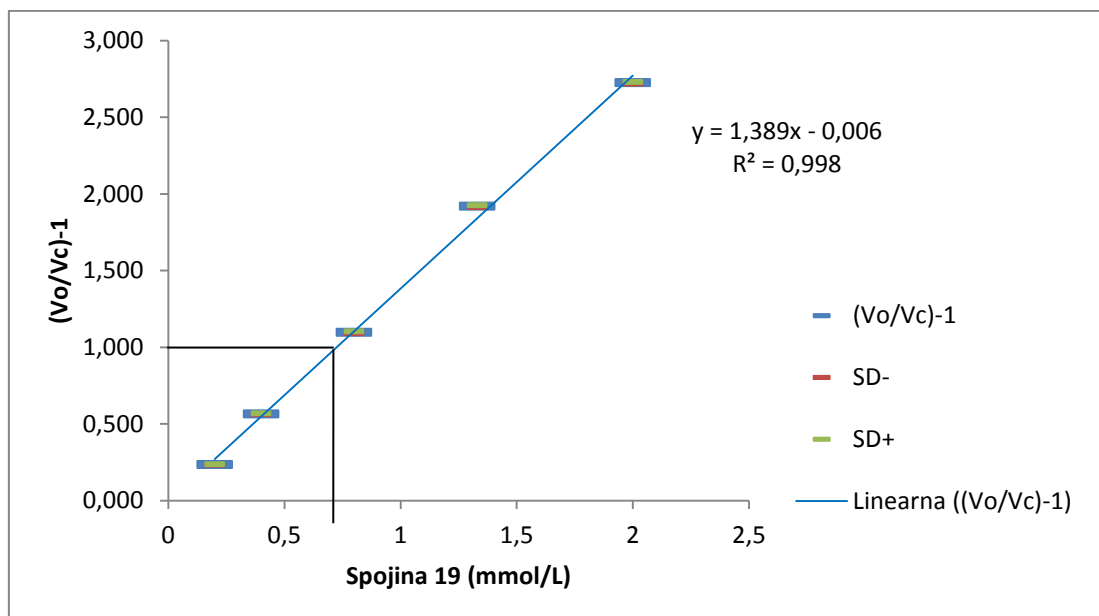
Spojina 18

**Graf 17:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 18

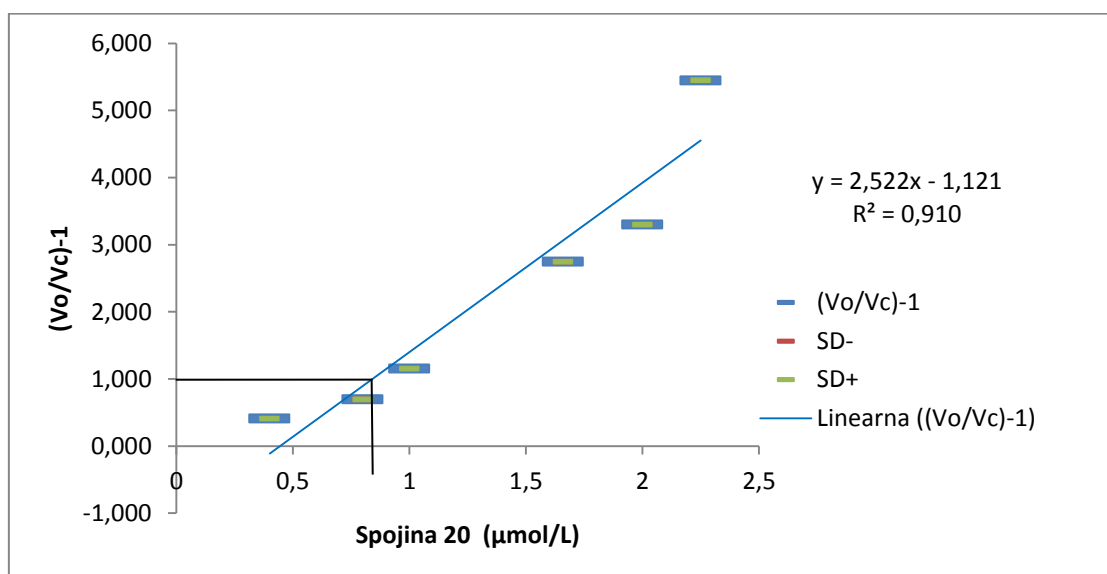


Spojina 19

**Graf 18:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 19

**4.3.4.6 Kompleks z manganovim acetatom**Spojina 20

**Graf 19:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $I_{50}$ ) v spojini 20



## 5 RAZPRAVA

Oksidativni stres je izraz, ki se uporablja za opis različnih škodljivih procesov, ki so posledica porušanja ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici. Pojavi se zaradi prekomernega nastajanja radikalov in reaktivnih intermediatov ter zmanjšanja učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Antioksidativni obrambni sistem je naravni obrambni sistem v telesu, v katerega uvrščamo številne spojine, ki so sposobne preprečiti nastajanje radikalov, upočasniti ali ustaviti radikalsko sprožene oksidacije, preprečiti delovanje  $^1\text{O}_2$  ter preprečiti sodelovanje ionov prehodnih kovin v prenosu elektronov. Po kemijski strukturi jih delimo na encimske antioksidante in antioksidante, ki niso encimi. Encim SOD je prva in najpomembnejša obrambna linija med encimskimi antioksidanti, ki odstranjujejo radikale in ROS. Je metaloprotein in glede na prisotnost iona kovine prehoda (Fe, Zn, Cu in Mn) v aktivnem mestu ločimo tri oblike izoencima SOD, ki so prisotni v različnih predelih celice, in sicer SOD 1, SOD 2 in SOD 3.

Sam encim SOD kaže obetajoče anti-vnetne značilnosti, vendar njegova uporaba v terapevtske in farmakološke namene ni primerna. Zaradi tega so raziskave stekle v oblikovanje SOD mimetikov, med katere so se uvrstili različni kovinski kompleksi (Cu, Fe, Mn). Največji poudarek pa je bil na razvoju Mn SOD mimetikov, saj so Mn-ioni v primerjavi z Cu- in Fe-ioni ob sprostitvi iz kompleksa najmanj toksični.

V okviru magistrske naloge smo z indirektno metodo ugotavljali, ali izbrane spojine lahko katalizirajo reakcijo pretvorbe  $\text{O}_2^{\bullet-}$  do  $\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$ , podobno kot encim SOD. Uporabljena metoda je t.i. Fridovich-eva metoda. Spojinam, ki pospešijo disproporcionacijo (dismutacijo)  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , smo določili koncentracije, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $\text{I}_{50}$ ). Kinetiko redukcije citokroma c smo spremljali z UV-Vis spektrofotometrom.

V magistrsko nalogo smo vključili 20 spojin, ki smo jih analizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Za vsako spojino smo opravili meritev pri petih ali šestih koncentracijah ter po eno meritev za določitev slepega vzorca. Skupaj je bilo opravljenih 119 meritev za določitev koncentracij, ki so potrebne za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % ( $\text{I}_{50}$ ).

Spojine so bile analizirane pri sobni temperaturi. Osnovne raztopine (ksantin, citokrom c, katalaza) razen fosfatnega pufra, smo do analize hranili na ledeni kopeli, saj s tem

podaljšamo stabilnost raztopin.

Edini problem, ki smo ga imeli pri pripravi osnovnih raztopin, je bil v postopni deaktivaciji ksantin oksidaze. Odpraviti smo ga tako, da smo pripravili novo koncentracijo raztopine, pri kateri je vrednost  $V_0$  ( $V_0$  je vrednost nezmanjšano hitrost redukcije citokroma c ( $\Delta A_{550\text{nm}}/\Delta t$ )), v območju  $(0,025 - 0,030) \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ .

Določanje koncentracije, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 %, smo določili na aparatu UV-Visible spektrophotometer 50Conc proizvajalca Varian. Metoda je delno avtomatizirana in temelji na absorpciji ultravijolične in vidne svetlobe.

Analiza spojine je potekala v kivetu, v katero smo odmerili določen volumen osnovnih raztopin (fosfatnega pufra, ksantina, citokroma c, katalaze) in testne spojine. Tik po vstavitvi kivete v vzorčno mesto v UV-Vis spektrofotometru smo v kiveto dodali še ksantin oksidazo. Vzorčno mešanico smo dobro premešali, saj se po dodatku ksantin oksidaze tvori  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Pred samo analizo spojin smo izmerili slepi vzorec ( $V_0$ ) brez prisotnosti testne spojine, ki nam je služil kot kalibracija.

Postopek analize je računalniško podprt. Absorpcijo merimo pri valovni dolžini 550 nm vsakih 10 sekund, saj je pri tej valovni dolžini dobro vidna hitrost redukcije citokroma c.

S pomočjo absorpcijske krivulje se izmerjeni signal preračuna v vrednost  $V_c$  ( $\Delta A/\text{min}$ ) ( $V_c$  predstavlja zmanjšano hitrost redukcije citokroma c), ki se po dodatku spojine zmanjša. Analiza traja 10 minut in zahteva 2000  $\mu\text{L}$  celotnega volumna osnovnih raztopin in analizirane spojine.

Metoda UV-Vis spektrofotometrija se uporablja za pridobivanje absorpcijskega spektra snovi v raztopini ali trdni snovi, ki nam daje informacijo o strukturi molekul ali ionov.

Dobljene podatke smo statistično obdelali. Izračunali smo enačbo regresijske premice, s katero smo pri osemnajstih od dvajsetih spojin prikazali povezavo in linearno medsebojno odvisnost med spremenljivkama  $(V_0/V_c) - 1$  in koncentracijo analizirane spojine, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 %. Koeficient determinacije pri osemnajstih od dvajsetih spojin kaže na veliko medsebojno povezavo med spremenljivkama  $(V_0/V_c)-1$  in koncentracijo analizirane spojine, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % določeno z regresijsko premico. Dvema

spojinama pa enačbe regresijske premice in koeficienta determinacije nismo mogli določiti, saj spojini nista kazali SOD mimetične aktivnosti.

V magistrsko nalogo smo vključili dvajset spojin, od tega je bilo osem nitroksidov, pet aminov, štiri oksimi, dva kompleksa z manganom in en hidroksilamin.

Glede na funkcionalno skupino, ki jo spojine imajo v svoji strukturi, lahko glede neencimske SOD mimetične aktivnosti sklepamo naslednje. Spojini **1** in **20**, ki imata v svoji strukturi  $\text{Mn}^{3+}$  kot ligand, kažeta zelo visoko SOD mimetično aktivnost. Koncentracija, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50% ( $I_{50}$ ), znaša za spojino **1** 1,75  $\mu\text{mol/L}$ , za spojino **20** pa 0,92  $\mu\text{mol/L}$ . Spojina **1** je salenov kompleks z Mn(III), je neselektivni SOD mimetik, ki ima enak mehanizem dismutacije  $\text{O}_2^{\bullet-}$  kot sam SOD encim. Spojina **20** je kompleks 17 z Mn(III) acetatom, z Mn kot ligandom v svoji strukturi in ima prav tako visoko SOD mimetično aktivnost. Iz tega lahko sklepamo, da imajo spojine, ki vsebujejo Mn kot ligand v svoji strukturi, zelo velik potencial v uporabi kot SOD mimetiki za terapevtske namene.

Biološka aktivnost nitroksidnih spojin je povezana z njihovimi redoks reakcijami, ki omogočajo prenos elektrona, in z njihovimi redoks potenciali. Zaščitni učinki nitroksidov niso odvisni samo od velikosti obroča, ampak tudi od substituentov na obročih in od naboja molekule. Analizirane spojine so 6- ali 7-členski piperidinski ali diazepanonski derivati nitroksidov z različnimi stranskimi skupinami. Spojine, ki so vsebovale enostavnejšo stransko skupino, torej spojine **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, in **7** z izjemo spojine **8**, so izkazovale SOD mimetično aktivnost pri nižjih koncentracijah kot pa spojina **9** s sterično večjo stransko skupino sladkorja. Nitroksidna skupina vseh nitroksidov je pomembna za SOD mimetično aktivnost.

Druga skupina spojin so sekundarni in terciarni amini, derivati amonijaka, z različnimi stranskimi skupinami, ki imajo za osrednjo funkcionalno strukturo dušikov atom, ki vsebuje prost elektronski par, ki lahko veže kislinski proton. Spojine **12**, **13**, **14**, **18** in **19** so izkazovale šibko SOD mimetično aktivnost. Za skupino aminov lahko rečemo, da izkazuje šibko SOD mimetično aktivnost.

Naslednja skupina spojin so oksimi, s funkcionalno skupino  $\text{R}_2\text{C}=\text{NOH}$ , ki nastanejo s kondenzacijo aldehida ali ketona s hidroksilaminom. Spojini **15** in **17** sta izkazovali šibko SOD mimetično aktivnost, spojini **11** in **16** pa SOD mimetične aktivnosti nista izkazovali.

Spojini **11** in **16** imata eno oziroma dve prosti primarni amino skupini, ki se lahko protonirata in preko naboja vplivata na spremembo redoks potenciala, kar neugodno vpliva na dismutacijo  $O_2^{\bullet-}$ . Za skupino oksimov, razen spojin **11** in **16**, lahko rečemo, da izkazuje šibko SOD mimetično aktivnost.

Spojina **10** je hidroksilamin in izkazuje zelo šibko SOD mimetično aktivnost. Pri tej spojini smo pričakovali večjo SOD mimetično aktivnost, saj se hidroksilamin v pufrni raztopini lahko oksidira z zračnim kisikom do nitroksidnega radikala.

Vse spojine, razen spojin **11** in **16**, so izkazovale SOD mimetično aktivnost, torej lahko katalizirajo reakcijo pretvorbe  $O_2^{\bullet-}$  do  $O_2$  in  $H_2O_2$ , verjetno podobno kot encim SOD, vendar je koncentracija, ki je potrebna za pospeševanje dismutacije  $O_2^{\bullet-}$ , veliko večja kot pri spojinah **1** in **20**, ki v svoji strukturi vsebujeta Mn kot ligand.

Relativno dobro SOD mimetično aktivnost pri dokaj nizki koncentraciji, so v primerjavi z ostalimi spojinami, če izključimo spojini **1** in **20**, izražali nitroksidi, in sicer spojine **3**, **4**, **5**, **6**, in **7**, in bi lahko tudi te spojine uporabili kot možne SOD mimetike, kar je razvidno iz grafa 1.

## 6 SKLEPI

1. Z enačbo regresijske premice smo pri osemnajstih od dvajsetih spojin, prikazali povezavo in linearno medsebojno odvisnost med spremenljivkama  $(V_0/V_c) - 1$  in koncentracijo analizirane spojine, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 %.
2. Koeficient determinacije pri osemnajstih od dvajsetih spojin kaže na veliko medsebojno povezavo med spremenljivkama  $(V_0/V_c) - 1$  in koncentracijo analizirane spojine, ki je potrebna za zmanjšanje hitrosti redukcije citokroma c za 50 % določeno z regresijsko premico.
3. Vse spojine, razen spojin **11** in **16**, so izkazovale SOD mimetično aktivnost, saj so spojine katalizirale reakcijo pretvorbe  $O_2^{\bullet-}$  do  $O_2$  in  $H_2O_2$  podobno kot encim SOD, vendar je koncentracija, ki je potrebna za pospeševanje dismutacije  $O_2^{\bullet-}$  veliko večja, kot pri kompleksnih spojinah, ki v svoji strukturi vsebujejo Mn kot ligand.
4. Spojine, razen spojin **11** in **16**, bi lahko ocenili kot možne spojine neencimskih SOD mimetikov.
5. Metoda UV-Vis spektrofotometrija je primerna za spremljanje kinetike redukcije citokroma c, vendar bi bilo za nastajanje ROS priporočljivo uporabiti še kakšno drugo metodo.
6. Z metodo UV-Vis spektroskopijo smo potrdili aktivnost salenovega kompleksa z Mn, ki je že znan in pogosto uporabljen SOD mimetik. Pri izvedbi magistrske naloge je služil kot referenca. Kompleks 17 z Mn(III) acetatom pa je nova, še nikoli preizkušena spojina kot SOD mimetik. Zato je ta kompleks potencialno zanimiv. Morebiti bi se izvedla študija za ocenitev možnosti uporabe spojine kot novi SOD mimetik v terapevtske namene.

## 7 LITERATURA

1. Halliwell B, Gutteridge J M C: Free radicals in biology and medicine, 4. izdaja, Oxford New York, 2007:
2. Perdih A, Pešar S: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. Pregledni članek. Farmacevtski vestnik 57; 2006: 24-29.
3. Osredkar O: Oksidativni stres. Pregledni članek. Zdravstveni vestnik 81; 2011: 393-406.
4. Šuput D, Kamarić L: Izvor in reakcije prostih radikalov. In: Rabarič S ade. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. izdaja. Univerza v Ljubljani; Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2001: 15-36.
5. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S: The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Bentham Science Publishers. Current Pharmaceutical Design 2004; 10/14: 1677–1694.
6. Sies H: Oxidative stresses: Oxidants and antioxidants, Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 1997; 82/2: 291-295.
7. Pečar S: Radikali v našem življenju. Strokovni članek – kemija. Fakulteta za farmacijo in Institut Jožef Stefan: 2006; 18/3: 13-19.
8. Chaudière J, Ferrari-Iliou R: Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol: 1999; 37 (9–10): 949 – 62.
9. Sies H: Strategies of antioxidant defense. Institut für Physiologische Chemie I. Eur J Biochem: 1993; 2: 213 – 9.
10. Sigma Aldrich  
<http://www.sigmaaldrich.com/slovakia.html> (junij 2012).
11. Zelko I N, Mariani T J, Folz R J: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD 1), Mn-SOD (SOD 2) and EC-SOD (SOD 3) gene structures, evolution and expression. Elsevier Science Inc. Free Radical Biology and Medicine: 2002; 33/3: 337-349.

12. Weiss R H, Flickinger A G, Rivers W J, Hardy M M, Aston K W, Ryan U S, Riley D P: Evalution of activity of putative superoxide dismutase mimcc. The journal of biological chemistry: 1993; 268/31: 23049-23054.
13. Urso M L, Clarkson P M: Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. Toxicology. Elsevier Science Ireland Ltd: 2003; 189: 41-54.
14. Kakš P: Na zdravje, starost. Mohorjeva Celovec. Novo Mesto: 1999: 39-49.
15. Lanza V, Vecchio G: Synthesis of SOD enzyme mimetics. University of Catania. Journal of Chemical Education 2009; 86: 1419-1421.
16. Spletni slovar  
<http://www.spletnislovar.com/disproporcionacija-2/> (junij 2012).
17. <http://sl.wikipedia.org/wiki/> (junij 2012).
18. Salvemini D, Riley D P, Cuzzocrea S: Sod mimetics are coming of age. Nature publishig grupe. Droge Discovery: 2002; 1: 367-374.
19. Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C: SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. Hindawi Puglishing Corporation: Italy 2011: 1-9.
20. Basics of UV-VISible spectroscopy  
<http://cnx.org/content/m34525/1.1/> (junij 2012).
21. Praktikum iz biofizike  
<http://biofiz.mf.uni-lj.si/studij/literatura/bfpraktikum.pdf> (julij 2012).
22. Burtis A C, Ashwood R E: Tietz Textbook of Clinikal Chemistry. Second edition. The Curtis center. Philadelphija 1994: 111-122.
23. Mrhar A, Primožič S: Statistične metode v farmaciji. Univerzitetna tiskarna v Ljubljani. Slovensko farmacevtsko društvo: 1983: 53-64.

- 
24. Ultraviolet and Visible (UV-Vis) absorption spectroscopy (junij, 2008).  
<http://www.standardbase.com/tech/FinalHUTechUV-Vis.pdf>
25. Koller J: Struktura atomov in molekul: osnove kvantne mehanike, atomov. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Visokošolski učbenik. Univerza v Ljubljani, 2010: 61.
26. [http://en.wikipedia.org/wiki/Superoxide\\_dismutase](http://en.wikipedia.org/wiki/Superoxide_dismutase)
27. Offer T, Russo A, Samuni A: The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. The FASEB Journal: 2000;14: 1215-1223.
28. Funkcija STEYX  
<http://office.microsoft.com/sl-si/excel-help/steyx-HP005209284.aspx> (december, 2012).
29. Kuthan H, Haussmann H J, Werrigloer J: A spectrophotometric assay for superoxide dismutase activities in crude tissue fraction. Department of Toxicology. Biochem Journal: 1986; 237: 175-180.
30. Turrens J F: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. Department of Biomedical Sciences. The physiological Society: 2003; 552.2: 335-344.
31. Kinnula V L, Crapo J D: Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. American Journal and Critical Care Medicine: 2003; 167: 1600-1619.
32. Statistika  
<http://www.fk.uni-mb.si/fkbv/images/stories/matematika/9pred-stat.pdf> (december, 2012).