

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



ANJA KLJUČEVŠEK

**DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE MOČI NEKATERIH
VINILOGNIH KISLIN Z METODO CELIČNE ANTIOKSIDATIVNE
AKTIVNOSTI**

**ANTIOXIDANT POWER DETERMINATION OF SOME
VINYLOGOUS ACIDS BY THE CELLULAR ANTIOXIDANT
ACTIVITY ASSAY**

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Zavodu RS za transfuzijsko medicino pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag.farm in somentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag.farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju, mag.farm. za vse strokovne in praktične nasvete ter somentorju izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm za vse usmeritve pri pisanju. Iskrena zahvala gre tudi Roku Martinčiču, mag. farm za nasvete pri interpretaciji rezultatov. Iz vsega srca pa se zahvaljujem fantu Tadeju za vso podporo in potrpežljivost med celotnim študijem. Največja zahvala pa gre moji družini, brez katere mi danes ne bi uspelo. Oči, mami, Špela, Jaka in Tadej, rada vas imam.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm. in somentorja izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Anja Ključevšek

Ljubljana, junij 2015

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI.....	2
1.1.1 Vrste reaktivnih kisikovih zvrsti.....	2
1.1.2 Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti	2
1.1.3 Vpletenost ROS v fiziološke procese	3
1.2 OKSIDATIVNA POŠKODBA BIOLOŠKIH MOLEKUL	4
1.3 VPLETENOST ROS V PATOGENEZO BOLEZNI.....	6
1.4 ZAŠČITA CELIC IN TKIV PRED ROS	7
1.4.1 Encimi, ki ščitijo pred ROS.....	7
1.4.2 Antioksidativne snovi, ki niso encimi	7
1.4.3 Primeri pomembnejših antioksidantov	9
1.5 DERIVATI PULVINSKE KISLINE.....	11
1.5.1 Pulvinska kislina.....	11
1.5.2 Derivati pulvinske kisline	12
2. NAMEN DELA.....	14
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Kemikalije in reagenti	16
3.1.2 Gojišče.....	16
3.1.3 Pufri	16
3.1.4 Laboratorijska oprema.....	17
3.1.5 Celične kulture	18
3.2 DELO S CELIČNIMI KULTURAMI	18
3.2.1 Priprava na delo.....	18
3.2.2 Določanje topnosti antioksidantov	18
3.2.3 Izolacija perifernih mononuklearnih celic s fokolom.....	19
3.2.4 Štetje celic.....	21
3.2.5 Gojenje celic	22
3.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI	22
3.4 DOLOČANJE CELIČNE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	23
3.5 STATISTIČNA ANALIZA	25
4. REZULTATI.....	26
4.1 VREDNOTENJE TOPNOSTI TESTIRANIH ANTIOKSIDANTOV	28

4.2	VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOST TESTIRANIH ANTIOKSIDANTOV .	29
4.3	VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE MOČI.....	31
5.	RAZPRAVA	37
5.1	TOPNOST IN CITOTOKSIČNOST TESTIRANIH SPOJIN	37
5.2	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST TESTIRANIH SPOJIN.....	37
5.3	NENADNA PORAST FLUORESCENCE	38
6.	SKLEP.....	41
7.	VIRI.....	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Potek lipidne peroksidacije	4
Slika 2: Mesta delovanja antioksidantov	8
Slika 3: Antioksidativna mreža.....	10
Slika 4: Norbadion A(levo) in pulvinska kislina (desno).....	11
Slika 5: Splošna struktura derivatov pulvinske kisline.....	12
Slika 6: Izolacija PBMC s fokolom PRED centrifugiranjem.....	20
Slika 7: Izolacija PBMC s fokolom PO centrifugiranju.....	21
Slika 8: Prikaz štetja celic.....	22
Slika 9: Test celične antioksidativne aktivnosti s PMA	24
Slika 10: Živost celic PBMC po 24 h tretiranja s testiranimi antioksidanti pri koncentraciji 125 μM (razen spojina 6 pri 62,5 μM).....	29
Slika 11: Živost celic PBMC po 24 h tretiranja s testiranimi antioksidanti pri koncentraciji 62,5 μM (razen spojina 6 pri 31,25 μM).....	30
Slika 12: : Živost celic PBMC po 24 h tretiranja s testiranimi antioksidanti pri koncentraciji 31,25 μM (razen spojina 6 pri 15,625 μM).....	30
Slika 13: DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI pri koncentraciji 62,5 μM	31
Slika 14: : DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI pri koncentraciji 31,25 μM	32
Slika 15: Naraščanje fluorescence spojine 1 v odvisnosti od časa.....	33
Slika 16: Naraščanje fluorescence spojine 2 v odvisnosti od časa.....	33
Slika 17: Naraščanje fluorescence spojine 3 v odvisnosti od časa.....	34
Slika 18: Naraščanje fluorescence spojine 4 v odvisnosti od časa.....	34
Slika 19: Naraščanje fluorescence spojine 5 v odvisnosti od časa.....	35
Slika 20: Naraščanje fluorescence spojine 6 v odvisnosti od časa.....	35
Slika 21: Naraščanje fluorescence spojine 7 v odvisnosti od časa.....	36

KAZALO ENAČB

Štetje celic (enačba 1).....	22
------------------------------	----

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Virtualna knjižnica testiranih antioksidantov.....	26
---	----

Preglednica II: Prikaz topnosti testiranih antioksidantov.....	28
--	----

POVZETEK

S testom celične antioksidativne aktivnosti (CAA) smo vrednotili antioksidativno moč sedmih vinilognih kislin. Ta test nam omogoča določanje privzema spojine v celico, celično metaboliziranje antioksidanta in porazdeljevanje v membrane. To so ključne prednosti celičnih testov pred kemijskimi.

Za testni sistem smo izbrali periferne mononuklearne celice (PBMC), izolirane iz sveže človeške krvi in najprej preverili toksičnost spojin. Minimalen vpliv spojin na viabilnost celic smo določili pri koncentraciji 62,5 in 31,25 μM , zato smo vrednotenje antioksidativnega delovanja izvedli pri teh koncentracijah. Za test CAA smo uporabili barvilo diklorofluorescin diacetat (DCFH-DA), ki se v celici zlahka deacetilira in oksidira do fluorescentnega diklorofluorescina (DCF). Celicam smo dodali forbol 12-miristat 13-acetat (PMA), s katerim smo povzročili porast reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v celici. Antioksidativno kapaciteto spojin smo določili glede na padec fluorescence v primerjavi s kontrolo. Največji potencial za zmanjševanje ROS sta pokazali spojini **3** in **4**.

Pri delu s testiranimi spojinami moramo biti pozorni na pogoje testiranja (prisotnost kovinskih ionov in vrsto topila), saj se testirani antioksidanti lahko začnejo obnašati prooksidativno. Ugotovili smo, da dimetilsulfoksid (DMSO) ni primerno topilo za vrednotenje antioksidativnosti, saj lahko deluje kot oksidant. Prooksidativnim učinkom pa se lahko izognemo tako, da raztopine vinilognih kislin pripravljamo tik pred vsakim testiranjem.

ABSTRACT

In our study, we evaluated antioxidative activity of seven vinyl acids. This assay allows to determine the uptake of the compound into the cell, metabolism, and spreading in the membrane. These are the key advantages of cell assays when compared to assays that are based on isolated enzymes/receptors or even in a classical chemical reaction.

We have chosen peripheral mononuclear cells (PBMC) isolated from fresh human blood for CAA assay. Firstly, we evaluated the cytotoxicity of compounds. Minimal impact of the compounds on the cell viability was defined at a concentration of 62,5 and 31, 25 μM , and consequently, we evaluated antioxidant activity at these concentrations. We used a dye dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), that is easily trapped within cells and oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF). To trigger the production of reactive oxygen species (ROS), we used phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) to stimulate cell cultures. Antioxidant capacity of testing compounds were defined according to decrease in cellular fluorescence compared to the control cells. The greatest potential for the reduction of ROS was demonstrated for compounds **3** and **4**.

Assay procedure needs to be monitored carefully (presence of metal ions and the type of solvent) because the tested antioxidants can behave as prooxidants. We found that dimethyl sulfoxide (DMSO) is not a suitable solvent for the evaluation of antioxidant activity because it can act as an oxidant. We can avoid prooxidant effects of antioxidant by preparing solutions of vinyl antioxidants just before each testing.

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

CAA	Test celične antioksidativne aktivnosti
DCFH-DA	Diklorofluorescin diacetat
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
DPBS	Raztopina fosfatnega pufra
EC ₅₀	Koncentracija, pri kateri je dosežen 50% učinek
FBS	Fetalni goveji serum
G	Relativna centrifugalna sila
GSH-Px	Glutation peroksidaza
GR	Glutation reduktaza
H ₂ O ₂	Vodikov peroksid
LDL	Lipoproteini majhne gostote
MAPK	Z mitogenom aktivirane proteinske kinaze
MDA	Malondialdehid
•OH	Hidroksilni radikal
O ₂ •-	Superoksidni anion
PBMC	Periferne mononuklearne celice izolirane iz krvi
PKC	Protein kinaza C
PMA	Forbol 12-miristat 14-acetat
QSAR	Kvantitativen odnos med strukturo in delovanjem
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti
ROO•	Peroksilni radikal
SOD	Superoksidna dismutaza
UV	Ultravijolično valovanje

1. UVOD

Živimo v okolju, kjer smo izpostavljeni številnim oblikam stresa. Tako fizični, psihični kot tudi kemični stres lahko sproži kaskado negativnih reakcij in naše telo spravi iz ravnovesja. Poznamo posebno obliko neravnovesja, ki jo povzročajo oksidanti - oksidativni stres. Slednji je vrsta kemičnega stresa, ki nastane kot posledica porušenega ravnotežja med škodljivimi reaktivnimi zvrstmi in antioksidativno obrambo. Ravnotežje se lahko poruši zaradi prevelike produkcije reaktivnih zvrsti ali zmanjšane antioksidativne obrambe (1).

Največje žrtve oksidativnega stresa smo aerobni organizmi, saj pridobivamo energijo s pomočjo kisika (2). Govorimo lahko o kisikovi dvojni funkciji. Medtem ko je po eni strani nujno potreben za preživetje človeškega organizma, pa se njegove toksične lastnosti izražajo preko t.i. reaktivnih kisikovih zvrsti, ki v celicah povzročajo poškodbe. Zanimiv je način prilagajanja organizmov na toksične učinke kisika: nekateri danes živeči predhodniki anaerobnih bakterij so razvili mehanizme za preprečevanje penetracije kisika v notranjost, pri aerobih pa je evolucija poskrbela za obrambo preko eksogenih in endogenih antioksidantov (3).

Že nekaj časa je znano, da so reaktivne kisikove in druge zvrsti udeležene v patologiji človeških bolezni, kot so rak, ateroskleroza, avtizem, revmatoidni artritis, pospešujejo pa tudi staranje in nevrodegenerativne bolezni (Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, Huntingtonova bolezen) (2,4,5).

1.1 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI (ang. Reactive oxygen species)

Izraz reaktivne kisikove zvrsti (ROS) se nanaša na radikale in neradikale, ki so sposobni nenadzorovano oksidirati celične molekule (1). ROS so vpletene v koristne fiziološke in škodljive patološke procese. Normalno nastajajo med celičnim metabolizmom in funkcijsko aktivnostjo ter imajo pomembno vlogo v celični signalizaciji, apoptozi, ekspresiji genov in transportu ionov (5). Njihov presežek pa povzroči vrsto funkcijskih in strukturnih ireverzibilnih poškodb. ROS lahko nastanejo kot posledica eksogenih in endogenih dejavnikov. Nastajajo pri obsevanju z UV, X ali gama žarki, so produkti kovinsko kataliziranih reakcij, prisotni so kot onesnaževalci v atmosferi, pri vnetju jih izločajo nevtrofilci in makrofagi ter so stranski produkti elektronske dihalne verige v mitohondrijih (3).

1.1.1 Vrste reaktivnih kisikovih zvrsti

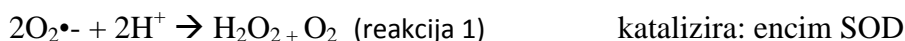
Pogosto govorimo samo o reaktivnih kisikovih zvrsteh, čeprav lahko v celici nastanejo tudi reaktivne dušikove (ang. *Reactive nitrogen species*) ali žveplove (ang. *Reactive sulphur species*) zvrsti. V katero skupino spada pa je odvisno od celične strukture, ki je žrtev oksidativnega stresa.

ROS razdelimo na kisikove radikale in neradikalske reaktivne kisikove spojine. Radikal je katerakoli kemijska vrsta (atom, molekula ali ion), ki v svoji strukturi vsebuje enega ali več nesparjenih elektronov. Radikali so v splošnem manj stabilni v primerjavi z neradikali in posledično bolj reaktivni (4). Radikal lahko reagira z drugim radikalom, lahko se adira na dvojno vez ali privzame vodik (1). Primeri pomembnejših radikalov v živih organizmih so hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$), superoksid ($\text{O}_2\bullet^-$), dušikov oksid ($\text{NO}\bullet$) in peroksilni radikal ($\text{ROO}\bullet$). Peroksinitrit (ONOO^-), hipoklorna kislina (HOCl), vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik ($^1\text{O}_2$) in ozon (O_3) niso radikali, so pa sposobni vstopati v radikalske reakcije v organizmu (4). Zdravju najbolj škodljive kisikove reaktivne zvrsti so $\text{O}_2\bullet^-$, H_2O_2 in $\bullet\text{OH}$.

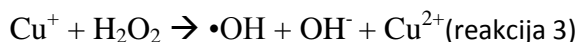
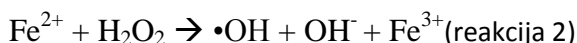
1.1.2 Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti

Superoksidni anion deluje kot »izhodiščni« prosti radikal pri številnih poškodbah celic in tkiv, medtem ko večino biokemičnih poškodb povzročajo sekundarne ROS, ki lahko nastanejo direktno z reakcijo s superoksidnim anionom ali pa preko encimsko ali kovinsko kataliziranih reakcij. Največ superoksida nastane kot stranski produkt celičnega dihanja,

kjer pride do uhajanja elektronov v mitohondriju. Vir nastanka so tudi encimi NADPH-oksidadza, ksantin oksidaze, monoksigenaze in ciklooksigenaze (3). Pri redukciji $O_2^{\bullet-}$ v vodnih raztopinah nastane H_2O_2 , reakcijo pa katalizira encim superoksid – dismutaza (SOD) (reakcija 1) (6).



Vodikov peroksid ni radikal. H_2O_2 prehaja skozi membrano in počasi oksidira celične komponente. V nizkih koncentracijah (μM) je slabo reaktiven, v visokih koncentracijah pa inaktivira glikolizne encime v celičnih strukturah, ki so zadolženi za pridobivanje energije (4). Na redoks stanje v celici imajo velik vpliv tudi *kovinski ioni*. Normalno v celici ni nevezanih železovih (Fe^{2+}) ionov, ob oksidativnem stresu pa njihova koncentracija naraste. Prosti Fe^{2+} ioni lahko sodelujejo v Fentonovi reakciji in tako prispevajo k nastanku najreaktivnejšega radikala – *hidroksilni radikal* ($\bullet OH$) (reakcija 2) (3). Poleg železovih lahko v Fentonovo reakcijo vstopajo tudi bakrovi ioni (reakcija 3) (4). Kovinski ioni močno prispevajo k nastajanju hidroksilnih radikalov, ki povzročajo modifikacije DNA baz, povečajo lipidno peroksidacijo in vplivajo na homeostazo žvepla in kalcija (3).



1.1.3 Vpletenost ROS v fiziološke procese

Reaktivne zvrsti imajo lahko koristne ali pa škodljive učinke v telesu. Koristni učinki so fiziološki in vključujejo obrambo pred mikroorganizmi. V oksidativni izbruh so vpleteni fagociti (nevtrofilci, makrofagi, monociti, eozinofilci) in predstavljajo način obrambe telesa proti tujim organizmom. Mehanizem nastanka radikalov poteka preko encima NADPH-oksidadza. Nastane superoksid, iz njega spontano nastaja vodikov peroksid, med $O_2^{\bullet-}$ in H_2O_2 pa poteka reakcija v kateri nastaja $\bullet OH$. Pod vplivom mieloperoksidaze nastaja v nevtrofilcih hipokloritni ion ($HOCl$), ki je zelo močan oksidant. Vse opisane reaktivne zvrsti fiziološko sodelujejo pri obrambi pred mikroorganizmi (7).

ROS so fiziološko pomembne tudi zaradi njihove funkcije pri mnogih celičnih signalnih poteh, kjer delujejo kot sekundarni prenašalci. V nižjih koncentracijah lahko ROS npr. povzročijo aktivacijo mitogene poti (aktivacija MAPK) in s tem spodbujajo proliferacijo in preživetje celic, višje koncentracije pa spodbujajo celično smrt in nekrozo (3).

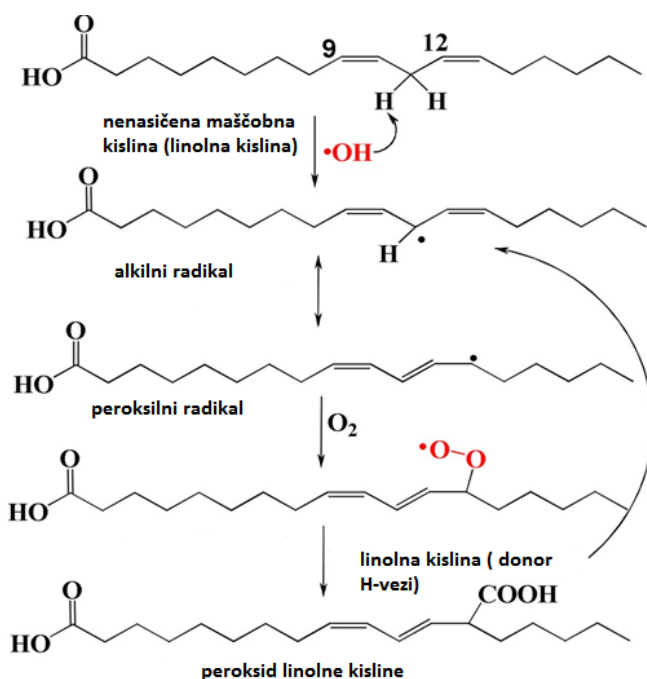
1.2 OKSIDATIVNA POŠKODBA BIOLOŠKIH MOLEKUL

Porast reaktivnih zvrsti je lahko dramatičen in povzroči oksidativni stres v celici. Poškoduje celične organele, te poškodbe pa so močan dejavnik v patogenezi številnih bolezni.

ROS napadajo baze nukleinskih kislinah, aminokislinske verige na proteinih in dvojne vezi na nenasičenih maščobnih kislinah (5).

• LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija je *in vivo* zelo pomembna, saj prispeva k razvoju kardiovaskularnih obolenj, kot je ateroskleroza. Peroksidacija povzroča oslabitev membranske funkcije, zmanjša fluidnost membrane, inaktivira membransko vezane encime in spremeni permeabilnost kalcija skozi membrano (4).



Slika 1: Potek lipidne peroksidacije (povzeto po 5)

Radikali reagirajo z nenasičenimi maščobnimi kislinami, fosfolipidi, glikolipidi, estri in samim holesterolom. Napadejo reaktivne $-\text{CH}_2-$ skupine in jim odtegnejo vodikov atom. Pri tem nastanejo alkilni radikali ($\text{R}\cdot$), ki lahko v aerobnih razmerah naprej reagirajo še s O_2 , pri čemer nastane peroksilni radikal ($\text{ROO}\cdot$) (5).

Nastanek $\text{ROO}\cdot$ je začetek verižne reakcije oksidacije lipidov ali iniciacija. V naslednjem procesu propagacije, peroksili reagirajo z nenasičenimi maščobnimi kislinami, kot produkta pa nastaneta hidroperoksid (ROOH) in nov radikal. Propagacija tekmuje s procesom terminacije, kjer prevladujejo radikal-radikalne reakcije. V njih peroksilni radikali reagirajo med seboj in nastanejo neradikalni produkti (8).

Končni produkt peroksidacije je malondialdehid (MDA), ki lahko povzroči poškodbe proteinov. Napada njihove funkcionalne skupine, pri tem pa nastajajo veliki agregati nefunkcionalnih proteinov (9).

- POŠKODBA DNK

Oksidativna poškodba jedrne ali mitohondrijske DNK se *in vivo* dogaja ves čas. •OH deluje najbolj genotoksično. Največ •OH nastaja preko kovinskih ionov s Fentonovo reakcijo. Posledica •OH napada so poškodbe purinskih in pirimidinskih baz ali deoksiriboze na nukleotidih, ireverzibilne poškodbe DNK pa povzročajo celično smrt ali mutacije. Takšne celične deformacije so vpletene v nevrodegenerativne in kardiovaskularne bolezni, raka in staranje (5,9).

- POŠKODBE PROTEINOV

Oksidativni stres na proteinih *in vivo* vpliva na funkcije receptorjev, encimov, transportnih proteinov in lahko povzroči nastanek novih antigenov, ki stimulirajo imunski odziv. Produkti oksidacije proteinov lahko prispevajo k sekundarnim poškodbam drugih molekul, na primer preko inaktivacije popravljalnih mehanizmov DNK (4).

Kovinsko katalizirana poškodba proteinov povzroča poškodbo stranskih verig aminokislin. Rezultat je izguba histidinskih ostankov, bitirozinske povezave in nastanek alkilnih, alkoksilnih in alkilperoksilnih radikalov. Alkoksilni in hidroksilni radikali povzročajo cepitev peptidnih vezi. Proteinska poškodba je največkrat popravljiva in predstavlja neletalni dogodek za celico. ROS in kovinski ioni reagirajo tudi s sulfidno skupino na cisteinu in oblikujejo intramolekularne in intermolekularne disulfidne vezi. To povzroči spremembo konformacije proteina in aktivacijo transdukcije (3).

1.3 VPLETENOST ROS V PATOGENEZO BOLEZNI

Povečanje oksidativnega stresa se opazi šele ob izbruhu različnih bolezni. Porast ROS v celici je posledica okolja v katerem živimo. Izpostavljeni smo povečanemu sevanju in onesnaženosti, k povečanju oksidativnega stresa pa prispeva tudi stil življenja, nepravilna prehrana, uživanje alkohola, kajenje, neustrezna telesna dejavnost, psihični stres itd. Bolezni, ki so povezane z naraščanjem oksidativnega stresa v telesu so srčno-žilne bolezni, sladkorna bolezen in rak. Oksidativni stres pa je vpleten tudi v proces staranja (2).

Proces staranja je posledica spremembe proteinov in DNK, oksidativni stres pa celicam onemogoča popravilo teh poškodb. K upočasnitvi staranja pripomoreta normalna telesna teža in telesna aktivnost, saj vplivata na oksoredukcijsko ravnovesje v telesu (2).

Srčno-žilne bolezni so povezane z lipidno peroksidacijo. Radikali oksidirajo lipoproteine majhne gostote (LDL), ki se nalagajo v stenah žil. Rezultat je vnetje na mestu oksidacije LDL, agregacija trombocitov in začetek procesa ateroskleroze (2).

Pri sladkorni bolezni tipa 2 radikali preprečujejo izločanje inzulina, s tem pa naraste koncentracija glukoze. Hiperglikemija in inzulinska rezistenca povzročata manjšo antioksidativno obrambo in porast radikalov v krvi (2).

Kancerogeneza je večstopenjski proces, ki ga povzročajo karcinogene snovi. Rakotvorne snovi razdelimo na genotoksične in epigenetske (negenotoksične). Genotoksične so ponavadi kemikalije, ki direktno poškodujejo DNK in s tem sprožijo mutacijo. Negenotoksične snovi pa vplivajo na regulacijo celične rasti in celične smrti. Večina karcinogenih snovi poveča nastajanje radikalov, le-ti pa nato povzročajo poškodbe in mutacije DNK (3).

1.4 ZAŠČITA CELIC IN TKIV PRED ROS

Antioksidanti so encimi, proteini, peptidi in najrazličnejše druge spojine endogenega ali eksogenega izvora, ki že v nizkih koncentracijah (v primerjavi s koncentracijo tarčne snovi) preprečijo, odložijo ali zavirajo oksidacijo tarčne snovi (9,10). Znotrajcelični antioksidativni encimi in privzemanje antioksidantov iz hrane pomagajo vzdrževati zadosten nivo antioksidantov v telesu (5).

1.4.1 Encimi, ki ščitijo pred ROS

Celice so se normalno sposobne braniti pred ROS poškodbo preko intracelularnih encimov. Poznamo dve vrsti encimov, ki ščitijo celico pred prostimi radikali. Antioksidativno delovanje imajo hidroperoksidaze (katalaza in peroksidaze) in superoksid–dismutaza (SOD). SOD v mitohondriju in citosolu odstranjuje $O_2^{\bullet-}$ s pretvorbo v H_2O_2 . Peroksidaze in katalaze pa so zadolžene za razgrajevanje H_2O_2 . Katalaza v peroksiomih pretvori H_2O_2 v O_2 in H_2O (4).

Pomembnejši encim za odstranjevanje H_2O_2 pa je glutation–peroksidaza (GSH- Px), ki je prisoten v mitohondriju in citosolu. GSH-Px odstranjuje H_2O_2 tako, da ga porablja za oksidacijo glutationa in nastane dimer (GSSG) (9). Sledi regeneracija glutationa s pomočjo encima glutation reduktaze (GR), ki igra pomembno vlogo za nemoteno delovanje GSH–Px (2).

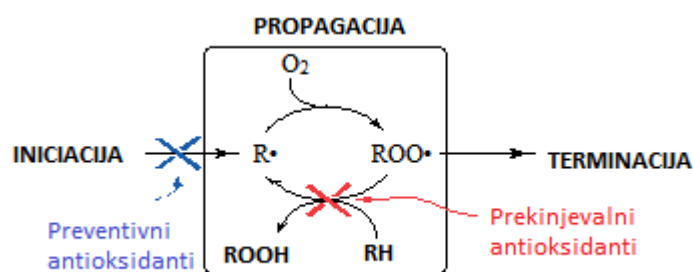
1.4.2 Antioksidativne snovi, ki niso encimi

V to skupino uvrščamo vse naravne antioksidante, glutation in nekatere biološke komponente z antioksidativno vlogo (transferin, laktoferin, feritin) (2). Večina naravnih antioksidantov je pridobljenih iz sadja, zelenjave, začimb in zelišč (ginseng, kurkuma, ginko, rožmarin, zeleni čaj, grozdje, ingver, česen). Vsebujejo široko paleto antioksidantov, kot so fenoli (fenol in polifenoli), flavonoidi, karotenoidi, steroidi in tiolne spojine. Ti antioksidanti pomagajo ščititi celico pred oksidativnim stresom in s tem zmanjšujejo tveganje za kronične bolezni (5).

Antioksidanti delujejo preko več mehanizmov:

Direktni antioksidanti s sprejemanjem ali doniranjem elektronov nevtralizirajo proste radikale. Antioksidanti lahko direktno reagirajo z reaktivni radikali in jih uničijo tako, da radikale naredijo manj aktivne, dlje živeče in manj nevarne (5). Delimo jih na dve skupini:

- I. Preventivni antioksidanti; delujejo na proces iniciacije, kjer upočasnijo ali ustavijo začetno oblikovanje radikala (8).
- II. Prekinjevalni antioksidanti; antioksidanti, ki prekinjejo verigo oksidacije (*ang. Chain-breaking antioxidants*); tarča teh je proces propagacije ali širitve oksidacije. Reagirajo s peroksilnimi radikali preden ti reagirajo s celičnimi organeli. V to skupino spada največ antioksidantov kot so vitamin C in E ter flavonoidi (8).



Slika 2: Mesta delovanja antioksidantov (povzeto po 8)

Tarča indirektnih antioksidantov pa so različni endogeni encimi. Nekateri antioksidanti so namreč sposobni regulacije z ROS povezanimi encimi. Lahko delujejo na dveh različnih mestih:

- I. Zmanjšujejo aktivnost ali ekspresije encimov, ki povečujejo nastanek radikalov, kot sta NAD(P)H (NOX) in ksantin-oksidadza (XO). Ti encimi katalizirajo prenose elektronov (5).
- II. Povečujejo aktivnost in ekspresijo antioksidativnih encimov kot so SOD, katalaza in glutation peroksidaza, ki predstavljajo pomembno obrambo pred prostimi radikali (5).

1.4.3 Primeri pomembnejših antioksidantov

A. α -tokoferol

Je fenolni antioksidant. Alkilna razvejanost mu daje lipofilne lastnosti, zato se lahko nahaja v membranah. Tam preprečuje posledice lipidne peroksidacije s prispevanjem vodika peroksilnem radikal (9,10). Po reakciji s ROO• nastane fenilni radikal, ki se lahko razgradi sam, lahko pa ga regenerira vitamin C.

B. Askorbinska kislina (vitamin C)

Je vodotopen in kisli antioksidant, kar je posledica vinilogije. Po reakciji z radikali nastane askorbil radikal(10). Glavna prednost vitamina C pred drugimi antioksidanti je, da je sposoben nevtralizacije radikalskih oblik drugih antioksidantov (npr. vitamin E). Sam pa se regenerira z NADH ali NADPH reduktazo (5).

C. Glutation

Je glavni celični tiolni antioksidant (10). Je tripetid, ki skupaj z glutation peroksidazo in glutation reduktazo odstranjuje H₂O₂ iz celice(2). Glutation (GSH) odstrani radikal in nastane GS•, ta pa ponavadi reagira z drugim GS• in nastane disulfid. Telo ima encimske sisteme, ki reducirajo disulfid nazaj v glutation (10).

D. α -lipojska kislina

Lipojska kislina je koristen antioksidant, topen v vodi in maščobah, kar mu omogoča dobro porazdeljevanje v membranah in citosolu. Velja za enega močnejših antioksidantov, saj zmanjšuje koncentracijo ROS, regenerira endogene (glutation) in eksogene (vitamin C in vitamin E) antioksidante, deluje kot kelator kovinskih ionov in obnavlja poškodbe proteinov (3).

E. Karotenoidi

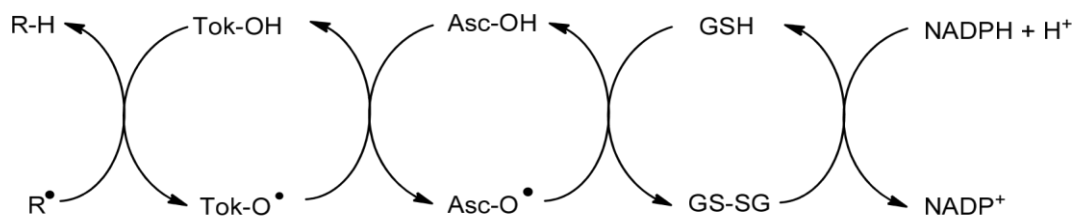
Karotenoidi so pigmenti v rastlinah in mikroorganizmih. Zaradi konjugiranega sistema so dobri antioksidanti. V visokih koncentracijah lahko preprečujejo lipidno peroksidacijo (3).

F. Flavonoidi

Flavonoidi so najpomembnejša skupina polifenolov. So odlični lovilci peroksilnih radikalov in s tem preprečevalci lipidne peroksidacije. Reakcije odstranjevanja radikalov jim omogoča polihidroksilirana in konjugirana struktura (3).

Antioksidativna mreža

Večina antioksidantov se v reakcijah z radikali porablja. Obstajajo pa tudi obnovljivi antioksidanti (npr. vitamin C, vitamin E in glutation). Vstopajo v antioksidativno mrežo, v kateri drug drugega regenerirajo.



Tok-OH: α -tokoferol (vitami E)

Tok-O•: α -tokoferil radikal

Asc-OH: askorbinska kislina (vitamin C)

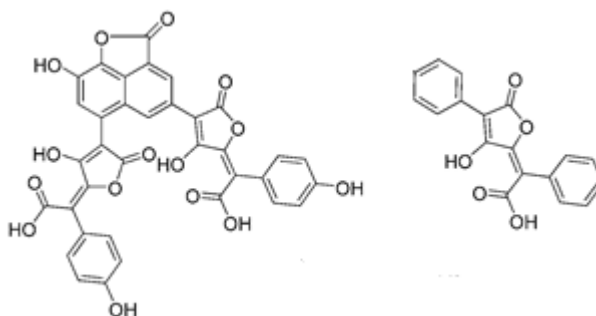
Slika 3: Antioksidativna mreža (povzeto po 8) Vitamin C regenerira tokoferilni radikal, glutation pa je sposoben regenerirati askorbilni radikal. Obnavljanje glutationa je malo drugačno. Dva žveplova radikala reagirata med seboj, nastane disulfid, reduktaze pa ga reducirajo do GSH.

1.5 DERIVATI PULVINSKE KISLINE

1.5.1 Pulvinska kislina

Pulvinsko kislino v naravi najdemo kot pigmente v lišajih in glivah. Naravni pigmenti se razlikujejo glede na naravo hidroksilirane arilne skupine (11).

Z raziskovanjem lišajev in gliv so odkrili polifenol Norbadion A, ki se kot pigment nahaja v gobah *Xerocomus badius* in *Pisolithus tinctorius*. Norbadion A se je pri testiranju antioksidativnih lastnosti pod vplivom UV in gama sevanja ob prisotnosti H_2O_2 izkazal kot zaščitnik timidina. Zaščitno lastnost je izgubil pri Fentonovih pogojih (H_2O_2 , Fe^{3+}) in je deloval kot prooksidant (12). To pomeni, da kljub antioksidativnim lastnostim povzroči oksidativne procese. Ko so odkrili antioksidativno moč Norbadiona A, so želeli sintetizirati takšen produkt, ki ne bo imel prooksidativnega delovanja. Norbadion A so ločili na dve enoti in dobili dva derivata pulvinske kisline (13).



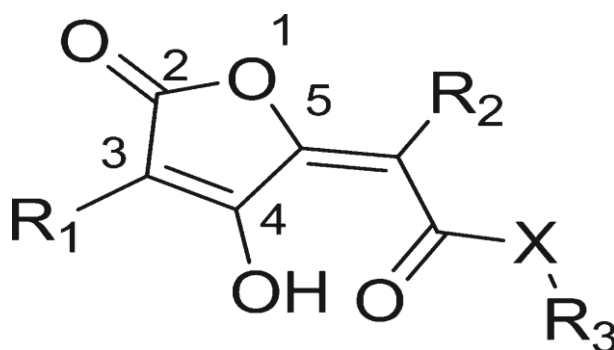
Slika 4: Norbadion A(levo) in pulvinska kislina (desno) (povzeto po 13)

Antioksidativne lastnosti pulvinske kisline izvirajo iz dejstva, da se OH skupina na mestu 4. zlahka deprotonira pri fiziološkem pH in nastane enol. Pulvinska kislina vsebuje vinilogno kislino, ki je sposobna stabilizacije konjugiranega sistema z elektroni dvojne vezi, hidroksilne skupine in karbonilne skupine. Stabilizacija radikala pa ni popolna, če na mestu 3 ni aromata (11). Pulvinska kislina je po mehanizmu stabilizacije radikala zelo podobna askorbinski kislini. Tudi vitamin C stabilizira radikal preko konjugiranega sistema.

Pulvinska kislina je za raziskovalce zelo zanimiva, ker vsebuje samo eno hidroksilno skupino, zaradi česar predstavlja zanimiv nov antioksidativni skelet. Drugim antioksidantom, kot so flavonoidi, stilbeni in kumarini, antioksidativno moč namreč določa ravno polihidroksilirana struktura (12).

1.5.2 Derivati pulvinske kisline

Pulvinska kislina je radioprotektant. To je spojina, ki varuje normalna tkiva pred poškodbami in spodbuja k popravilu poškodb in celičnemu preživetju. Celice izpostavimo radioprotektantu preventivno. Z namenom razvoja novih radioprotektivnih snovi je bilo narejenih več študij, ki se fokusirajo na sintezo hidrofilnih in amfifilnih derivatov pulvinske kisline (13).



Slika 5: splošna struktura derivatov pulvinske kisline (14)

S študijami so želeli ovrednotiti odnos med strukturo in delovanjem (SAR). Raziskovali so vpliv dveh fenolnih obročev (na R₁ in R₂), substituentih na fenilnih obročih (vpliv funkcionalnih skupin) in razvejanost lateralne verige (mesto X in R₃) (12,14).

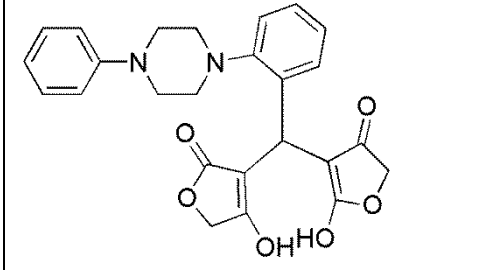
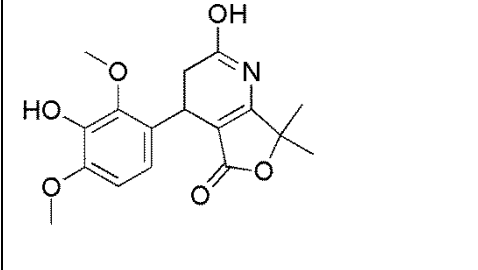
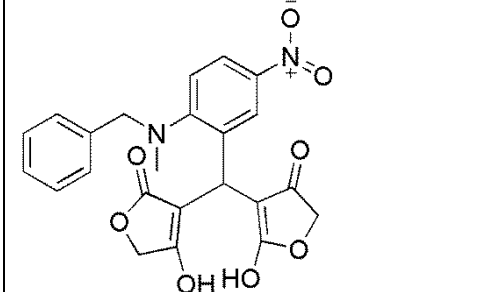
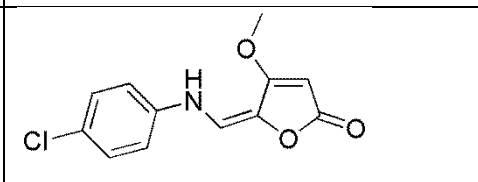
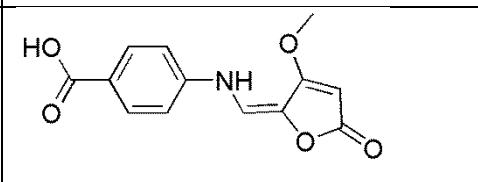
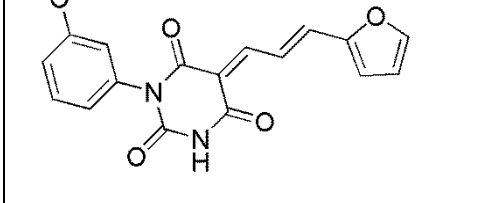
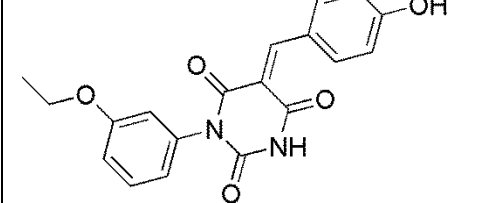
Raziskovalci so primerjali vpliv fenilne skupine na mestih R₁ in R₂. Derivate so testirali z dvema načinoma povzročanja oksidativnega stresa. Izpostavili so jih UV - sevanju v prisotnosti H₂O₂ ali z Fe³⁺ in H₂O₂ izzvali Fentonovo reakcijo. Dokazali so, da se antioksidativnost nanaša na laktonski obroč in spodnji fenilni obroč na mestu R₁. Poudarek je bil tudi na vplivu substitucije eksociklične dvojne vezi na mestu X in cikličnih para-substituentov na R₁. Največji antioksidativni potencial je pokazala spojina z R₁: 4-OMe Ph, R₂: Me, X: NH R₃: (CH₂)₃ CH₃ (12).

V člankih so glede na eksperimentalno testiranje oblikovali računalniške modele (QSAR) za predvidenje antioksidativne aktivnosti. QSAR modele so zasnovali tako, da se nanašajo na kemijsko strukturo spojin, fizikalne lastnosti in biološko aktivnost. Glavni cilj QSAR modelov je napovedovanje aktivnosti novih spojin in pojasnjevanje, katere kemijske lastnosti so zaslužene za posamezno dejavnost. QSAR modeli so lahko zelo uporabni za izdelavo prioriteten seznamov spojin za eksperimentalna testiranja, s čimer se poveča verjetnost, da najdemo dejansko aktivne spojine, hkrati pa se zmanjša vloženi čas in stroški. Preko računalniških modelov so prišli do 4-hidroksikumarinov, ki niso bili poznani kot

antioksidanti. Strukturno se pulvinska kislina in kumarini razlikujejo, vendar so v stabilizacijo radikala vključene enake vezi. Skupna jima je OH skupina na mestu 4 (14,15).

2. NAMEN DELA

Oksidativni stres v veliki meri prispeva k številnim kroničnim obolenjem, raku in staranju. V zadnjih dveh desetletjih se raziskovalci trudijo sintetizirati čim več takšnih spojin, ki bodo ta stanja umirila in upočasnila. S tem namenom se intenzivno raziskuje področje novih potencialnih antioksidantov. Na Kemijskem inštitutu so odkrili sedem novih spojin, za katere so predpostavljali, da bi lahko imele antioksidativno delovanje. Do teh struktur je prišel mladi raziskovalec Rok Martinčič preko rešetanja virtualnih knjižnic. Vse strukture so derivati pulvinske kisline, razen C₁ in C₂. V magistrski nalogi bomo novim analogom pulvinske kisline in spojinama C₁ in C₂ skušali dokazati antioksidativno delovanje. Želimo torej ovrednotiti antioksidativno moč posamezne spojine na celičnem testnem sistemu.

A ₅		A ₇	
A ₉			
B ₁		B ₂	
C ₁		C ₂	

Določanja antioksidativnosti se bomo lotili s testom celične antioksidativne aktivnosti, ki nam dobro predstavi kompleksnost bioloških sistemov. Pri tem bomo kot testni sistem uporabljali mononuklearne celice, predhodno izolirane iz človeške krvi (PBMC).

Sam eksperiment bo potekal v treh stopnjah. Najprej bomo spojinam določili topnost v ustreznem topilu. Glede na to, da imamo opravka s polarnimi in nepolarnimi spojinami, si bomo izbrali polarno aprotično topilo. V drugi stopnji bomo določali citotoksičnost spojin v izbranem topilu. Celice bomo izpostavili različnim koncentracijam spojine in določili, katera koncentracija ni toksična. V zadnjem delu pa bomo antioksidantom skušali določiti maksimalno koncentracijo, pri kateri je dosežen 50 % učinek (EC_{50}). EC_{50} bomo določali s fluorescenčnim barvilom DCFH-DA in forbolnim estrom PMA. V celicah bomo s PMA povzročili oksidativni izbruh in s pomočjo fluorescentnega barvila merili, ali spojine zmanjšajo koncentracijo reaktivnih zvrsti v celici.

Pulvinska kislina je antioksidant. Predvidevali smo, da imajo tudi derivati pulvinske kisline antioksidativne lastnosti.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in reagenti

Sterilen DMSO (dimetilsulfoksid)	WAK –Chemie Medical GmbH, Nemčija
Fetalni goveji serum	Gibco, ZDA
Raztopina tripanskega modrila	Sigma – Aldrich, Velika Britanija
Fikol	Cedarlane, Kanada
Antibiotik gentamicin	Sigma – Aldrich, Nemčija
Glutamin (Glutamax™)	Gibco, ZDA
Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA)	Sigma – Aldrich, Nemčija
2',7' - diklorofluorescin diacetat (DCFH-DA)	Sigma – Aldrich, Nemčija
L – askorbinska kislina	Tokyo Chemical Industry, Japonska
Galna kislina	Tokyo Chemical Industry, Japonska
Gojišče RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Austria

3.1.2 Gojišče

Sestava:

- RPMI 1640
- 10 % FBS (fetalni goveji serum)
- 0,1 % gentamicin (50 mg/ml)
- 1 % glutamin (200 mM)

Priprava gojišča:

V 500 ml gojišča RPMI 1640 smo dodali 50 ml FBS, 500 µl gentamicina in 5 ml glutamina. Pripravljeno raztopino smo dobro premešali.

3.1.3 Pufri

- DPBS: Fosfatni pufer (brez CaCl₂, MgCl₂), Gibco, Velika Britanija

3.1.4 Laboratorijska oprema

Analitska tehtnica	Metter Toledo, Švica
Svetlobni mikroskop (Nikon Eclipse Ti)	Nikon, Japonska
<i>Bürker-Türkova</i> števna ploščica	Blau Brandt, Nemčija
Hladilnik in zamrzovalnik	Electrolux, Nemčija
Zamrzovalnik	Liebherr, Nemčija
Inkubator	Heraeus, Nemčija
Komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra PIO, Slovenija
Avtomatske pipete (0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 10 - 100 µl; 100 - 1000 µl)	Eppendorf, Nemčija
Plastični nastavki za pipete (do 10 ul, 100 ul, 1000 ul)	Eppendorf, Nemčija
Pipete boy	Integra science, Švica
Serološke pipete za enkratno uporabo (10 in 25 ml)	Greiner Bio One, Avstrija
Števec za štetje celic (Vi - Cell™ XR, Cell Viability Analyzer)	Beckman Coulter, ZDA
Centrifuga CR 4i	Thermo Electron Industries SAS, Francija
Centrifugirke (15 in 50 ml)	Sarstedt, Nemčija
Pretočni citometer FACSCalibur	Becton Dickinson, ZDA
Plastične epruvetke (epice)	Eppendorf, Nemčija
Mikrotitrne ploščice za gojenje celic (48 vdolbinic)	Thermo Fischer Scientific, Danska
Vsebniki za gojenje celičnih kultur (T-flask)	Sarstedt, Nemčija
Stresalnik (Vortex mixer)	IKA Works INC, ZDA
Namizna centrifuga Mini SPIN PLUS	Eppendorf, Nemčija
Pasteurjeva pipeta	Copan, ZDA

3.1.5 Celične kulture

Periferne mononuklearne celice (*ang. peripheral blood mononuclear cells-PBMC*) so krvne celice z okroglim jedrom. V to skupino spadajo monociti, makrofagi in limfociti (T, B in NK). Te krvne celice so glavna komponenta imunskega odziva in igrajo pomembno vlogo pri obrambi telesa pred tujki (16). PBMC smo izolirali iz zgoščenih levkocitov (Buffy coat-a), ki smo jih dobili iz krvi zdravih krvodajalcev.

3.2 DELO S CELIČNIMI KULTURAMI

3.2.1 Priprava na delo

Magistrsko nalogo sem opravljala na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, natančneje v laboratoriju na oddelku OTS (Oddelek za terapevtske storitve). V laboratoriju veljajo določena pravila čistoče, ki se jih držijo vsi zaposleni in študentje. Pred laboratorijem je predprostor, kjer smo se preobuli v čisto obutev. Pred delom smo se preoblekli v čisto haljo in rokavice. Delo s celicami je potekalo v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF). To je prostor, kjer delo poteka po aseptičnem postopku. V komori ne pride do uničenja mikroorganizmov, ampak se vzdržujejo standardi čistoče prostora pred kontaminacijo. Najmanj 15 minut pred uporabo smo vključili pretok zraka v komori. Preden smo začeli z delom, smo roke z rokavicami in delovno površino v komori razkužili s 70 % etanolom.

3.2.2 Določanje topnosti antioksidantov

Za določanje antioksidativnih lastnosti spojin je pogoj, da so le-te dobro topne v topilu. Imamo sedem potencialnih antioksidantov in dva standarda, askorbinsko in galno kislino. Vseh devet spojin smo raztopili v ustreznem topilu. Za topilo smo izbrali DMSO (dimetilsulfoksid). To je polarno aprotično topilo, zato so bile tako polarne kot nepolarne spojine v njem dobro topne. Pri vrednotenju topnosti moramo upoštevati dejstvo, da je DMSO lahko toksičen za celice. V celičnem gojišču je 1% DMSO še znosen za celice. V kolikor pa količina DMSO preseže 1% začnejo celice umirati.

POSTOPEK: Pripravili smo izhodne raztopine s koncentracijo 25 mM. Topilo DMSO je za celice v koncentraciji nad 1% toksičen, zato smo izhodne raztopine 100x redčili na koncentracijo 250 μ M (5 μ l antioksidanta izhodne koncentracije in 500 μ l DPBS pufra). Po mešanju smo določili topnost, tako da smo v vsako luknjico na mikrotitrski ploščici dali

200 µl pripravljene raztopine. Organoleptični pregled raztopine je kazal na dobro topnost spojina, ko pa smo pogledali pod mikroskopom smo ugotovili, da spojina C₁ ni topna, saj je bila očitno vidna oborina kristalov. Dodali smo ji še enkratno količino DMSO in dobili smo polovično koncentracijo (12,5 mM). Postopek 100x redčenja s fosfatnim pufrom smo ponovili in znova določali topnost pod mikroskopom. Tokrat je bila spojina topna.

3.2.3 Izolacija perifernih mononuklearnih celic s fikolom

Ena najpogosteje uporabljenih metod separacije PBMC iz krvi je gradientno centrifugiranje s pomočjo fikola. To je sintetičen, vodotopen kopolimer glukoze in epiklorhidrina. Uporabljamo ga za pripravo gostotnega gradienta pri centrifugiranju. S fikolom ločujemo krvne celice po plasteh. Plast monocitov in limfocitov leži pod plastjo plazme (17). Fikol ima tudi druge pozitivne lastnosti. Ni pretirano toksičen za celice (zlasti ne v krajših časovnih obdobjih), ni drag in je zelo stabilen (18). Ločevanje PBMC iz krvi poteka približno 1h. Sam čas izolacije pa je odvisen od števila PBMC, ki ga želimo izolirati. Večje število celic kot želimo izolirati, daljši bo čas izolacije, saj bomo morali pripraviti večje število centrifugirk krvi na fikolu.

Ločevalna tehnika s fikolom po centrifugiranju ne spreminja fenotipa ali funkcije izoliranih mononuklearnih celic. Plast mononuklearnih celic je pogosto kontaminirana z eritrociti. Ti se pojavijo kot skupke celic na spodnji mononuklearni plasti. Sam izkoristek izolacije je odvisen od kontaminacije z granulociti, trombociti in eritrociti. Slaba stran eritrocitov je, da se zbirajo v skupke, v njih pa ujamejo skupke limfocitov. To nam zmanjša izkoristek izolacije. Da bi zmanjšali zlepljanje eritrocitov, redčimo fikol z majhnim volumnom pufru PBS pred centrifugiranjem (19).

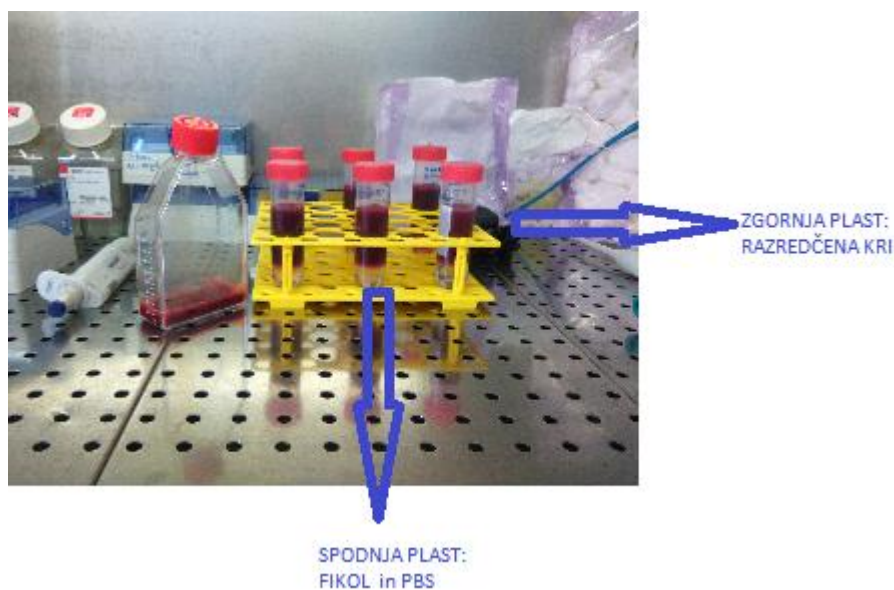
Pozorni moramo biti tudi na temperaturo. Pomembni sta tako temperatura fikola pred nanašanjem krvi kot tudi temperatura centrifugiranja. Fikol moramo pred nanosom krvi segreti na sobno temperaturo, saj v nasprotnem primeru ločitev plasti ne bo dobra. Tudi pri nižjih temperaturah centrifugiranja se izkoristek zmanjša, saj je potreben daljši čas centrifugiranja. Pri višjih temperaturah pa se zmanjša sposobnost preživetja in eritrociti se hitreje združujejo v skupke. Optimalna temperatura je od 18 do 20 °C (19).

PBMC smo vsakokrat izolirali iz zgoščenih levkocitov (*ang. Buffy coat*). Zgoščeni levkociti so bili pripravljene iz sveže krvi zdravih krvodajalcev.

POSTOPEK:

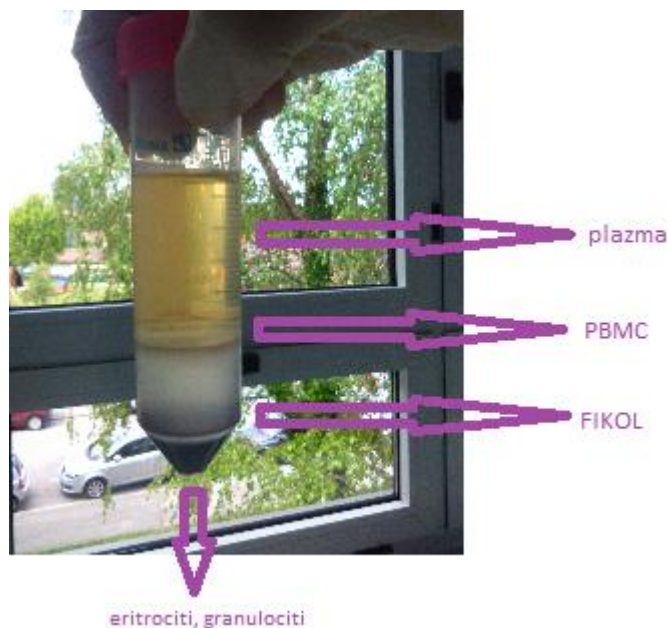
V LAF komori smo pripravili 6 cetrifugirk (V=50 ml), vanje dali 11,5 ml fikola in 1 ml DPBS ter jih pustili 30 min na sobni temperaturi. Fikol smo redčili zaradi bolj učinkovitega posedanja eritrocitov. Medtem smo celoten volumen levkocitov prenesli v vsebnik za gojenje celičnih kultur (T-flask) in razredčili do 175 ml z DPBS. 25 ml razredčene krvi smo zelo počasi nanесли na mešanico fikola in pufra DPBS.

Razmerje fikol : kri = 1 : 2



Slika 6: Izolacija PBMC s fikolom PRED centrifugiranjem

1. Centrifugirali smo pripravljeno kri s fikolom pri naslednjih pogojih: 950 G, t = 15 min, pospešek = 1 in zavora = 1. Po centrifugiranju smo s Pasteurjevo pipeto "pobirali" monuklearne celice. PBMC iz 2 centrifugirk smo zbirali v 1, tako da smo iz 6 dobili 3 centrifugirke, ki smo jih do vrha napolnili s pufrom DPBS.



Slika 7: Izolacija PBMC s fikolom PO centrifugiranju

2. PBMC, pomešane s pufrom smo centrifugirali pri pogojih: 660 G, t = 10 min, pospešek = 5 in zavora = 5. Po centrifugiranju smo odlili supernatant. Na dnu je ostal sediment, ki smo ga resuspendirali v 10 ml DPBS. Rastopino s celicami smo iz 3 centrifugirk prenesli v 1 in z DPBS dopolnili do vrha.
3. Celice smo morali dobro sprati. Centrifugirali smo pri pogojih: 300 G, t = 10 min, pospešek = 5 in zavora = 5. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in sediment resuspendirali v poljubnem volumnu DPBS ter s pufrom dopolnili do vrha. Postopek centrifugiranja pri teh pogojih smo 3x ponovili. Po 3. centrifugiranju smo supernatant odlili in PBMC resuspendirali v poljubnem volumnu DPBS.

3.2.4 Štetje celic

Z namenom ugotoviti število živih celic v izolirani suspenziji in določiti izkoristek same izolacije smo PBMC po vsaki izolaciji prešteli z Bürker-Türkovo števno ploščico ali z analizatorjem celične viabilnosti (Vi – Cell™ XR, Cell Viability Analyzer).

- *Bürker-Türkova števna ploščica*

Štetje celic je potekalo z Bürker-Türkovo števno ploščico pod mikroskopom. Preštevali smo celice v znanem volumnu in rezultat podali kot koncentracijo celic v suspenziji (št.celic/ml). Odmerili smo 180 µl tripan modrega barvila v mikrotitrsko ploščico. Tripan

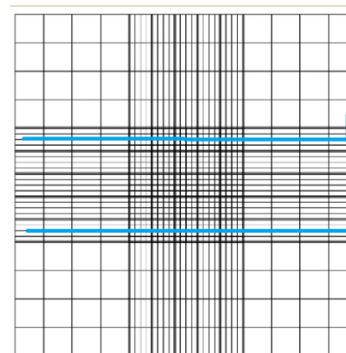
modro obarva mrtve celice. Iz volumna resuspendiranih PBMC smo odpipetirali 20 μl in jih primešali volumnu barvila. Na števno ploščico smo fiksirali krovno steklo. Tik podenj smo nanesti toliko suspenzije PBMC z barvilom, da jo "posrka" pod krovno stekelce, ostanek pa smo odstranili. Nato smo pod mikroskopom prešteli število celic v 25 kvadratih, kot je prikazano na sliki.

Število celic smo izračunali po naslednji enačbi:

$$N = A \times V \times 10^6 / 10 \text{ (enačba 1)}$$

A.....število prešteti celic v 25 kvadratih (---)

V.....volumen resuspendiranih PBMC



Slika 8: Prikaz štetja celic

- *Vi – CellTM XR, Cell Viability Analyzer*

V plastično stekleničko za merjenje smo odmerili 475 μl pufru DPBS in 25 μl resuspendirane suspenzije PBMC. Po zagonu programa je potekalo najprej spiranje analizatorja, šele potem smo merili. Ta analizator deluje na podoben princip kot poteka delo z Bürker-Türkovo števno ploščico. Za štetje celic naprava obarva mrtve celice s tripan modrim barvilom, žive pa prešteje. Dobili smo podatke o odstotku živosti celic in številu živih celic v 1 ml.

3.2.5 Gojenje celic

Celice smo gojili v mikrotitrskih ploščicah in v vsebnikih za gojenje celic (T-flask). Gojenje je potekalo v inkubatorju, kjer so zagotovljeni pogoji za optimalno rast celic (pogoji: temperatura 37 °C in 5% CO₂).

3.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Citotoksičnost smo določali pri različnih koncentracijah antioksidanta. Maksimalna koncentracija antioksidantov in dveh standardov je bila 250 μM (razen C₁ = 125 μM). Celice smo tretirali tudi s polovičnimi, četrtinskimi in osminskimi vrednostmi maksimalne koncentracije antioksidantov. Celice smo izpostavili določeni koncentraciji antioksidanta

in po 24 urah inkubacije izmerili živost celic s pretočnim citometrom. Ta naprava nam razdeli levkocite glede na velikost in granuliranost celic. Vsebuje različne fotodetektorje, ki merijo svetlobo pri različnih valovnih dolžinah. Omogočajo nam merjenje fluorescence in signala določenega fluorescentnega barvila. Za določanje citotoksičnosti se uporablja barvilo propidijev jodid, ki dobro obarva mrtve celice. Fluorescenco propidijevega jodida zazna detektor FL – 2. Rezultat na pretočnem citometru smo dobili prikazan kot odstotek živih celic.

POSTOPEK:

Na mikrotitrsko ploščico smo nanašali 1 ml gojišča v vsako luknjico. Gojišču smo dodali 10 μ l izbrane raztopine antioksidanta, raztopljenega v DMSO, z izhodno koncentracijo 25 mM (razen $C_1 = 12,5$ mM). Tako smo dosegli maksimalno koncentracijo 250 μ M (razen spojina $C_1 = 125$ μ M). Po dobrem mešanju smo v vsako luknjico dodali 1 milijon PBMC. Spet smo dobro premešali in postavili v inkubator (37°C , 5 % CO_2) za 24 ur. Zraven smo inkubirali tudi 2 kontroli, samo netretirane celice in netretirane celice z dodatkom 1 μ l DMSO. Po enem dnevu smo suspenzijo iz posamezne luknjice odpipetirali v epruvete za pretočno citometrijo in jih dvakrat sprali z 1 ml DPBS pri naslednjih pogojih centrifugiranja: $G = 500$, $t = 5$ min, pospešek = 5 in zavora = 5. Po drugem centrifugiranju smo odlili supernatant in celice resuspendirali v 400 μ l DPBS.

Isti postopek smo uporabili tudi pri določanju citotoksičnosti za polovično (125 μ M), četrtinsko (62,5 μ M) in osminko (31,25 μ M) koncentracijo antioksidanta.

3.4 DOLOČANJE CELIČNE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

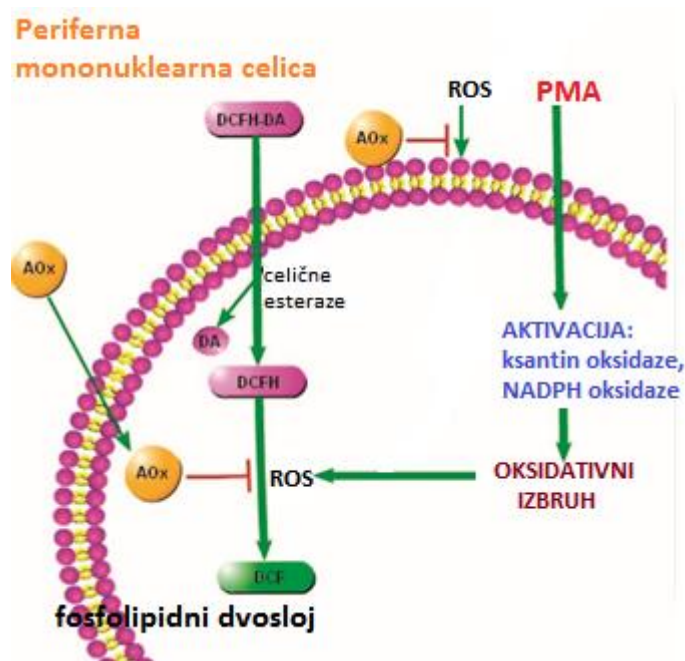
Na voljo so kemijske in biološke metode za merjenje antioksidativne moči spojin. Kemijske metode so hitre, poceni in nam podajo indeks vrednosti antioksidanta (glede na ekvivalent Troloxa). Kemijski *in vitro* testi niso dovolj za določanje antioksidativne aktivnosti. Za ugotavljanje potencialov antioksidativnosti spojin potrebujemo *in vivo* kakor tudi *in vitro* študije (20). Kemijske metode so danes široko uporabljene vendar slabo predvidijo *in vivo* dogodke. Zavedati se moramo nujnosti *in vivo* testov, saj nobena kemična metoda ne upošteva biološke uporabnosti, privzema in metabolizma antioksidantov. Biološki sistemi so bolj kompleksni kot kemijski. Do najbolj relevantnih meritev lahko pridemo s pomočjo živalskih modelov in v kliničnih študijah. Res pa je, da

so drage in trajajo dolgo časa. Del bioloških sistemov so tudi modeli s celičnimi kulturami. Celične kulture so stroškovno ugoden model, relativno hiter in nam dajejo podatke o prehodu spojine skozi lipidni dvosloj, porazdelitvi spojine in celičnemu metabolizmu (21).

Test celične antioksidativne aktivnosti (CAA) predstavlja pomembno orodje za določanje antioksidativne aktivnosti spojin. Metoda ocenjuje potencial antioksidanta na celičnem nivoju in ne samo vrednotenje antioksidanta kot reducenta (20).

2',7' - diklorofluorescein diacetat (DCFH-DA) je sonda, ki se ujame v celico in se pod vplivom reaktivnih zvrsti preprosto oksidira do fluorescentnega diklorofluorescina (DCF). Deluje kot indikator oksidativnega stresa v celici (21). DCFH – DA prehaja s pasivno difuzijo skozi fosfolipidni dvosloj. Intracelularne esterase poskrbijo za odcep acetatne skupine in nastane nefluorescentni DCFH. Ta pa se po oksidaciji z ROS pretvori v fluorescentni DCF. DCFH – DA je pogosto uporabljen za merjenje oksidativnega stresa v celici, ni pa jasno katere ROS so odgovorne za oksidacijo DCFH do DCF (22). To je relativno enostavna in uporabna metoda za merjenje koncentracije oksidantov in spremljanje redoks signalnih sprememb pod vplivom oksidativnega stimulanta (23).

Metoda z DCFH- DA je hitra in stabilna. Pri delu moramo paziti le, da po dodatku barvila suspenzijo celic ne izpostavimo svetlobi. Barvilo je namreč občutljivo na bledenje.



Slika 9: Test celične antioksidativne aktivnosti s PMA (povzeto po 21)

Celice imunskega odziva smo izpostavili močnemu aktivatorju, ki med drugim povzroči oksidativni izbruh. Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) je aktivator proteinske kinaze C (PKC). Ta pa aktivira NADPH-oksidozo (24) in ksantin-oksidozo (25), ki povzročita povečano produkcijo ROS v mononuklearnih celicah. Oksidativni izbruh povzročen s PMA povzroči porast DCFH oksidacije v limfocitih (26) in monocitih (27).

Aktiviranim PBMC smo dodali antioksidant v netoksični koncentraciji in opazovali padec fluorescence s pretočnim citometrom.

POSTOPEK:

V plastične epruvete smo pripravili raztopine standardov (vitamin C in galna kislina) in testitanih antioksidantov v gojišču (RPMI 1640 in 10 % FBS) s prvo netoksično koncentracijo 62,5 μM (razen $C_1 = 31,25 \mu\text{M}$). V vsako epico smo odpipetirali 1 ml gojišča in 2,5 μl antioksidanta izhodne koncentracije (25mM, $C_1 = 12,5 \text{ mM}$). Raztopine smo dobro premešali na vorteksu in jih prenesli v posamezno luknjico na mikrotitrsko ploščico za gojenje celic. V vsako luknjico smo k raztopini antioksidanta dodali 1 milijon PBMC. Po mešanju smo tretirane celice inkubirali 1 uro pri pogojih optimalne rasti (37°C, 5 % CO₂). Po eni uri smo dodali 1 μl 20 mM fluorescentnega barvila DCFH-DA, raztopljenega v DMSO, dobro premešali in spet postavili v inkubator z istimi pogoji. Po 30 minutah smo PBMC aktivirali s PMA (s koncentracijo 1 μM v DMSO). Dodali smo 1 μl raztopine PMA, premešali in inkubirali 1 uro. Po 1 uri smo vsak alikvot prenesli v svojo centrifugirko (15 ml), dodali 4 ml DPBS in centrifugirali pri pogojih: $G = 500$, $t = 5 \text{ min}$, zavora in pospešek = 5. Tako smo celice sprali in odstranili fluorescentno barvilo na površini. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, dodali 5 ml DPBS in spet centrifugirali pri istih pogojih. Nato smo odlili supernatant, dodali 400 μl DPBS in alikvote prestavili v epruvete za pretočno citometrijo.

Istočasno smo v mikrotitrskih ploščicah uporabili tudi tri kontrole. Slepa kontrola so bile samo netretirane celice, v drugi kontroli smo celice isto izpostavili 20 μM raztopini DCFH – DA, v tretji pa smo PBMC poleg dodatka DCFH – DA aktivirali še s PMA.

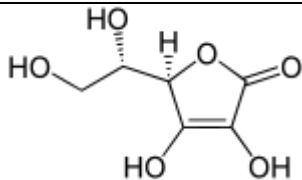
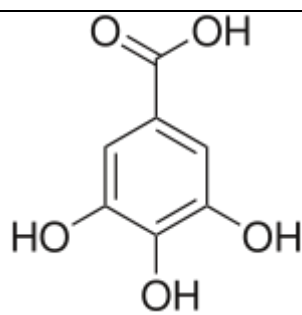
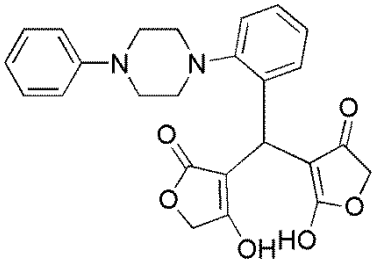
3.5 STATISTIČNA ANALIZA

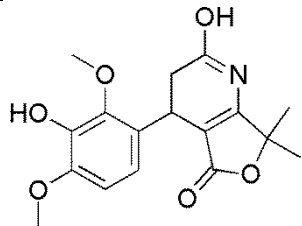
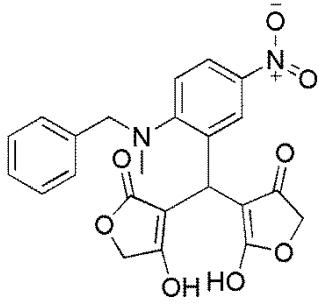
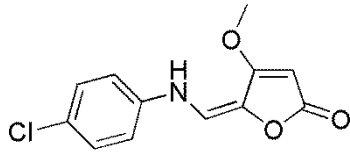
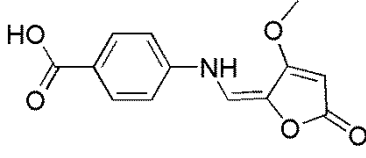
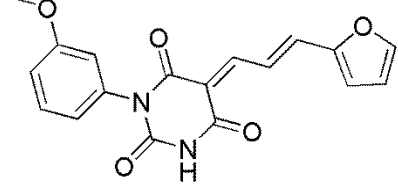
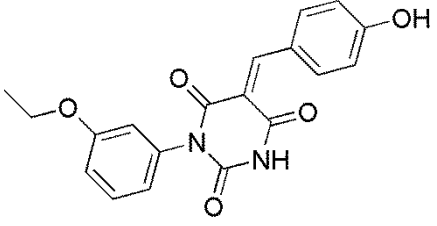
Rezultate smo obdelali s programom Microsoft Office Excel 2013. Rezultate smo podali kot povprečje ponovitev s standardnim odklonom. Sledila je statistična primerjava rezultatov vzorcev z rezultati kontrol ($p < 0,05$).

4. REZULTATI

V zadnjih dveh desetletjih so ugotovili pomembno vlogo reaktivnih zvrsti pri človeških boleznih, v biologiji in toksikologiji. Posledično je naraslo zanimanje za sintezo novih antioksidantov, ki bodo varovali telo pred poškodbami povzročenih z ROS.

Testirane antioksidante so odkrili z rešetanjem virtualne knjižnice. QSAR modeli so matematične strukture, ki se nanašajo na kemijsko, fizikalno in biološko merjenje aktivnosti. Glede na QSAR različnih spojin je v virtualni knjižnici nastal model, ki je sposoben te značilnosti povezovati. S tem je nastal prioritetni seznam spojin za poskusno testiranje. Večina testiranih spojin je derivatov pulvinske kisline, razen C₁ in C₂. Vsi pa so predstavniki vinilognih kislin. Vse testirane antioksidante smo ovrednotili na celičnem nivoju, pri tem pa smo se osredotočili na antioksidativno aktivnost spojin.

Oznaka spojine	ID spojine	Kemijska struktura
ST1	Askorbinska Kislina (31)	
ST2	Galna Kislina (32)	
1	A ₅	

2	A ₇	
3	A ₉	
4	B ₁	
5	B ₂	
6	C ₁	
7	C ₂	

Preglednica I: Virtualna knjižnica testiranih antioksidantov

Vrednotenje antioksidativnega delovanja smo izvajali z metodo CAA. Pred izvedbo te metode smo morali določiti tisto koncentracijo, pri kateri so vsi testirani antioksidanti topni in necitotoksični.

4.1 VREDNOTENJE TOPNOSTI TESTIRANIH ANTIOKSIDANTOV

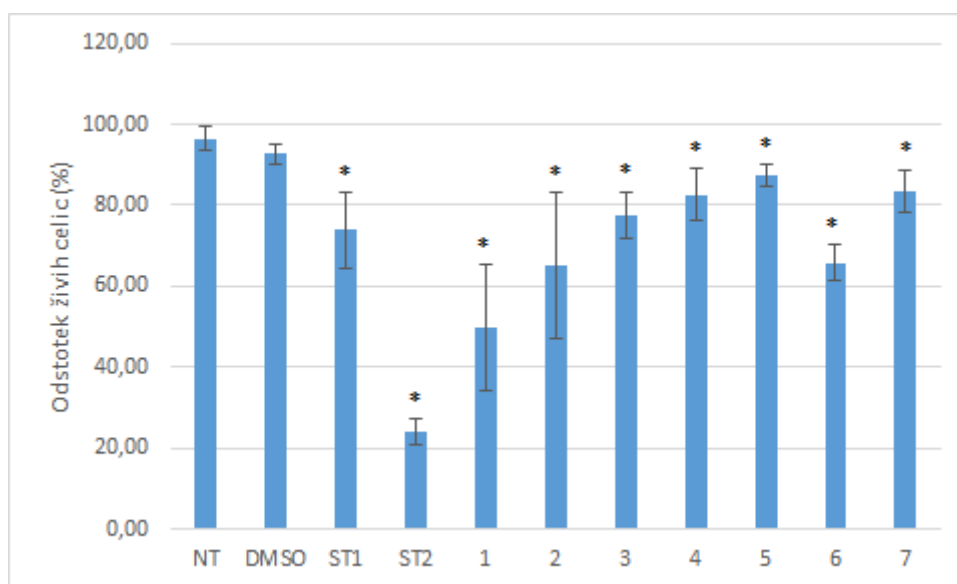
Določali smo topnosti testiranih antioksidantov v DMSO, ki je polarno aprotično topilo. Topnost smo vrednotili pri koncentraciji 250 μM . Vse spojine so topne pri tej koncentraciji, razen spojina **6**. Pri spojini **6** so bili vidni kristali, zato smo jo redčili na polovično koncentracijo. Pri koncentraciji 125 μM je bila tudi spojina **6** dobro raztopljena.

SPOJINA	Topnost pri koncentraciji 250 μM	Topnost pri koncentraciji 125 μM
ST1	<i>Dobro topna</i>	-
ST2	<i>Dobro topna</i>	-
1	<i>Dobro topna</i>	-
2	<i>Dobro topna</i>	-
3	<i>Dobro topna</i>	-
4	<i>Dobro topna</i>	-
5	<i>Dobro topna</i>	-
6	<i>Slabo topna</i>	<i>Dobro topna</i>
7	<i>Dobro topna</i>	-

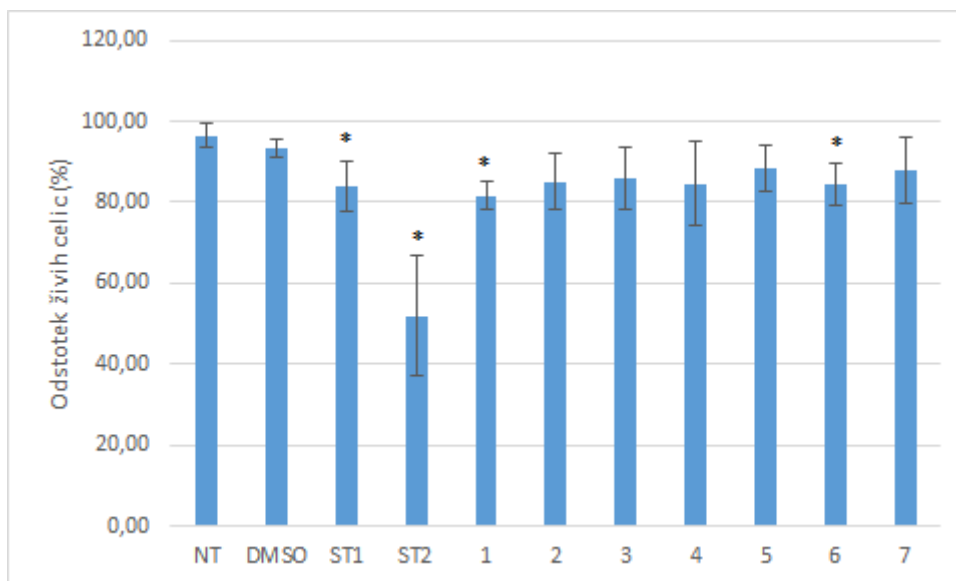
Preglednica II: Prikaz topnosti testiranih antioksidantov

4.2 VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI TESTIRANIH ANTIOKSIDANTOV

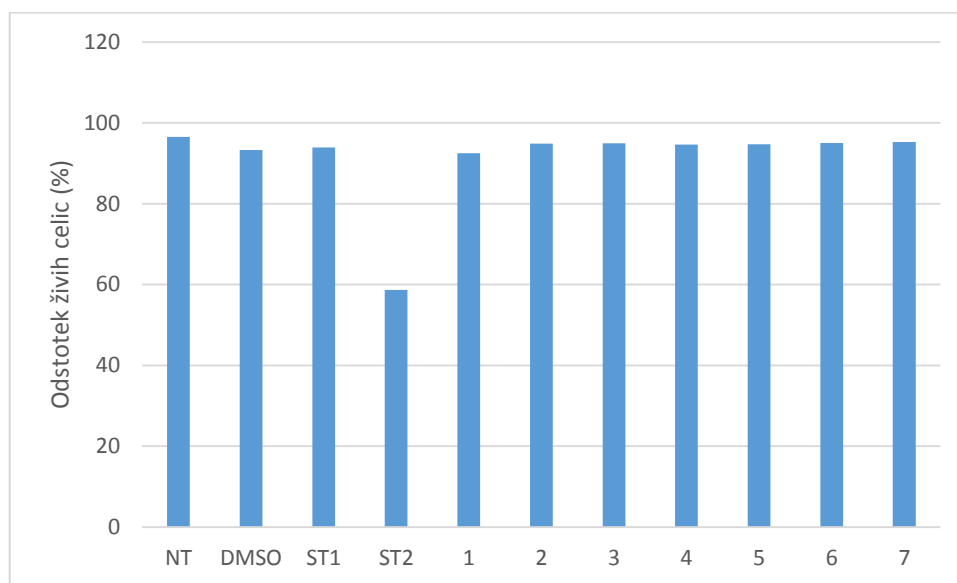
Za določanje antioksidativnega delovanja testiranih vinilnih kislin smo morali prej določiti koncentracijo, ki ni toksična za celice PBMC. Celice smo tretirali s spojinami **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7** ter z dvema standardoma, vitaminom C (ST1) in galno kislino (ST2) pri štirih koncentracijah: 250 μM , 125 μM , 62,5 μM in 31,25 μM . Po 24 urah smo s pomočjo barvila propidijevega jodida merili živost celic s pretočnim citometrom, kot je opisano v materialih in metodah. Propidijev jodid v žive celice ne more vstopiti zaradi celične membranske integritete. Kot rezultat smo podali odstotek živih celic glede na koncentracijo antioksidanta s katero smo tretirali celice PBMC. Rezultate smo prikazali pri treh koncentracijah; 125 μM , 62,5 μM in 31,25 μM .



Slika 10: Živost celic PBMC po 24 h tretiranja s testiranimi antioksidanti pri koncentraciji 125 μM (razen 6 pri 62,5 μM); NT = netretirane celice, DMSO = netretirane celice z dodatkom DMSO, * = $p < 0,05$ glede na NT



Slika 11: Živost celic PBMC po 24 h tretiranja s testiranimi antioksidanti pri koncentraciji 62,5 μM (razen 6 pri 31,25 μM); NT = netretirane celice, DMSO = netretirane celice z dodatkom DMSO; * = $p < 0,05$ glede na NT

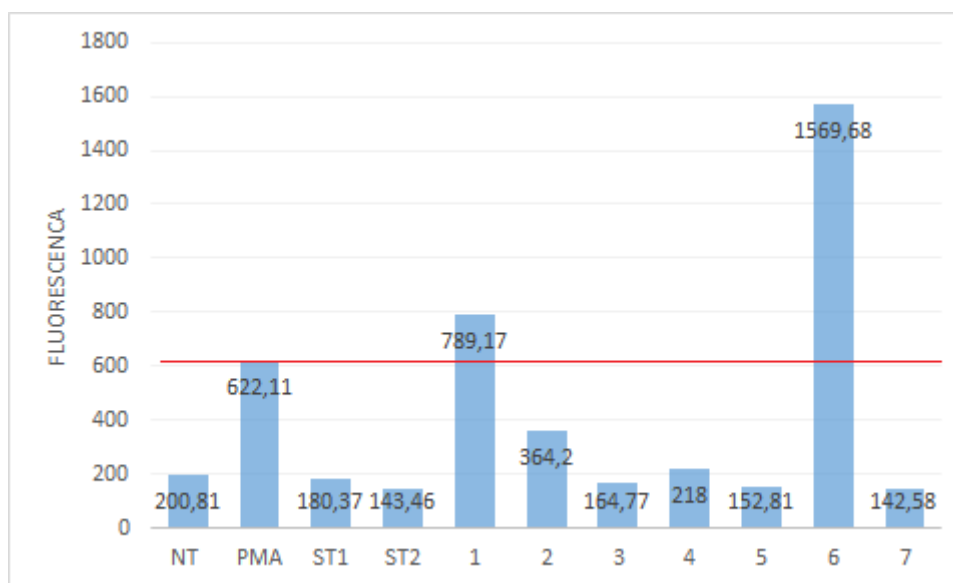


Slika 12: : Živost celic PBMC po 24 h tretiranja s testiranimi antioksidanti pri koncentraciji 31,25 μM (razen 6 pri 15,625 μM); NT = netretirane celice, DMSO = netretirane celice z dodatkom DMSO

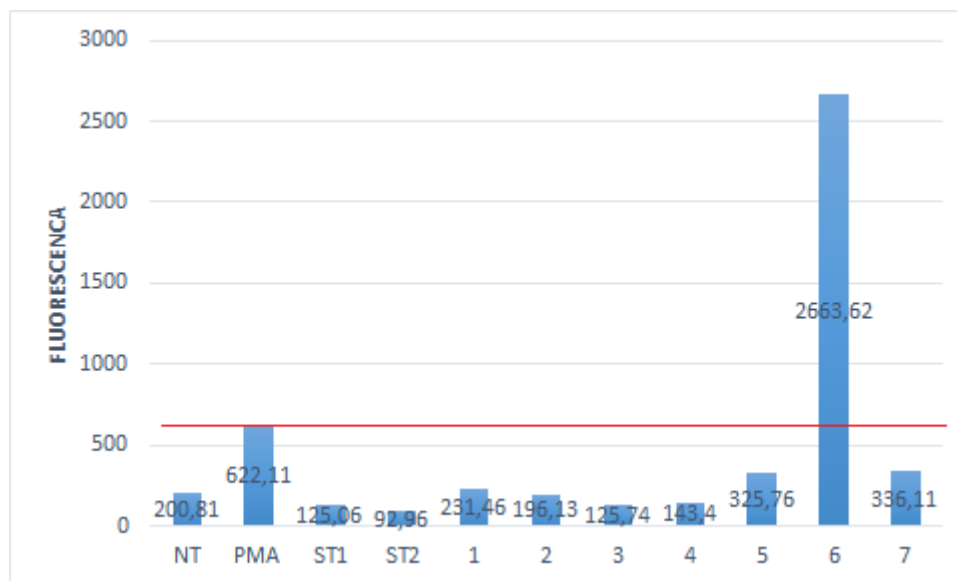
4.3 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE MOČI

Antioksidativno moč smo določali z metodo CAA, ki je učinkovito orodje za *in vitro* vrednotenje potenciala antioksidanta. Dober antioksidant je dober lovilec radikalov in na to lastnost smo se osredotočili pri vrednotenju. S PMA smo v celici povzročili porast reaktivnih zvrsti. Moč antioksidanta smo določali glede na potencial, ki ga imajo spojine za zadušitev oksidativnega izbruha. Ocena je potekala s pomočjo fluorescentnega barvila DCFH – DA, ki je sposoben difundirati skozi membrano. V celici ga esterase deacetilirajo do nefluorescentnega DCFH. Radikali povzročijo oksidacijo DCFH in tako nastane fluorescentni DCF. Fluorescenco DCF pa lahko pomerimo in na ta način ugotovimo, kako spojina vpliva na zmanjšanje redoks potenciala.

Celice smo tretirali s prvo (62,5 μM) in drugo netoksično koncentracijo (31,25 μM). Po 1 uri smo dodali fluorescentno barvilo DCFH – DA za 30 minut in nato še aktivator oksidativnega izbruha PMA za 1 uro. Opazovali smo padec fluorescence pri celicah, tretiranih z antioksidanti, ter jih primerjali z netretiranimi aktiviranimi celicami.



Slika 13: DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI pri koncentraciji 62,5 μM (razen spojina 6 pri 31,25 μM); (NT = netretirane celice z dodatkom DCFH – DA, PMA = netretirane celice z dodanim DCFH – DA in PMA)

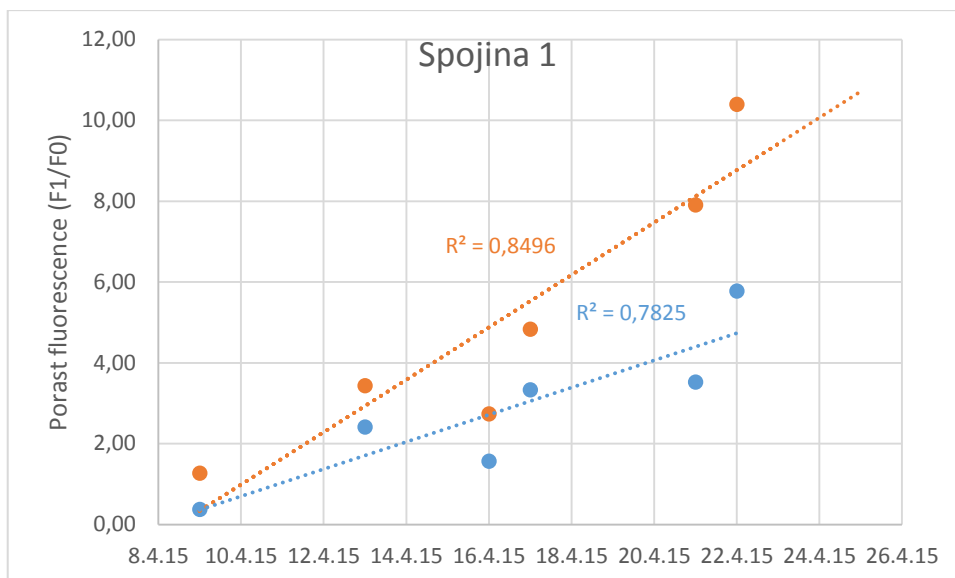


Slika 14: DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI pri koncentraciji 31,25 μM (razen spojina 6 pri 15,625 μM); (NT = netretirane celice z dodatkom DCFH – DA, PMA = netretirane celice z dodanim DCFH – DA in PMA)

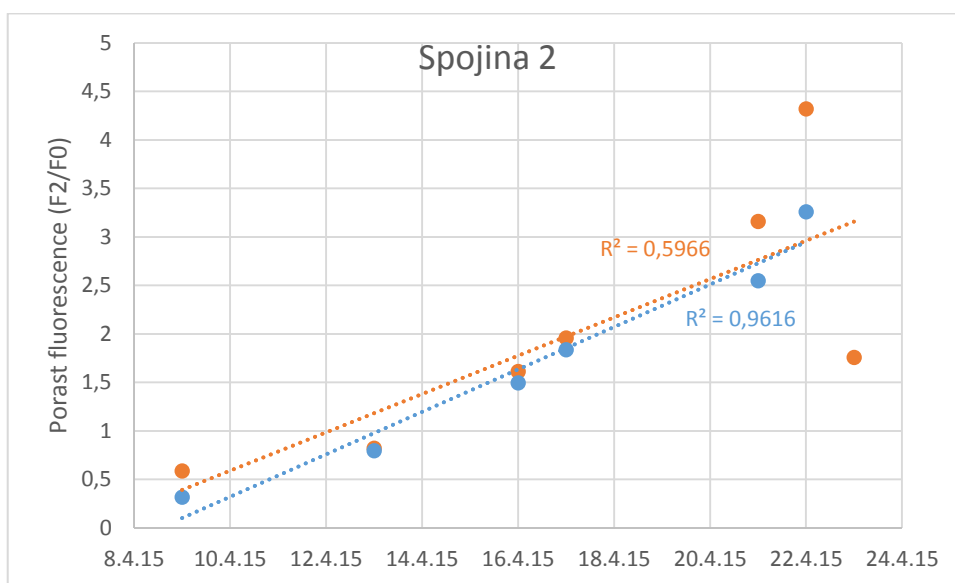
Nadaljnji cilj je bil določitev tiste koncentracije, pri kateri bo učinek 50 % (EC_{50}). EC_{50} bi bila vrednost, ki bi za 50 % znižala fluorescenco netretiranih celic po dodatku antioksidanta oziroma vrednost, ki bi za 50 % zmanjšala delež reaktivnih zvrsti po aktivaciji netretiranih celic s PMA.

Nadaljnja testiranja pa so pripeljala do presenetljivih rezultatov. Izmerjena fluorescenca je pri vseh vzorcih nepričakovano naraščala. Testiranja smo ponavljali pri istih koncentracijah, torej 62,5 μM in 31,25 μM (razen spojina 6 pri 31,25 μM in 15,625 μM). V nadaljevanju smo prikazali linearen porast fluorescence pri vseh spojinah v odvisnosti od časa shranjevanja.

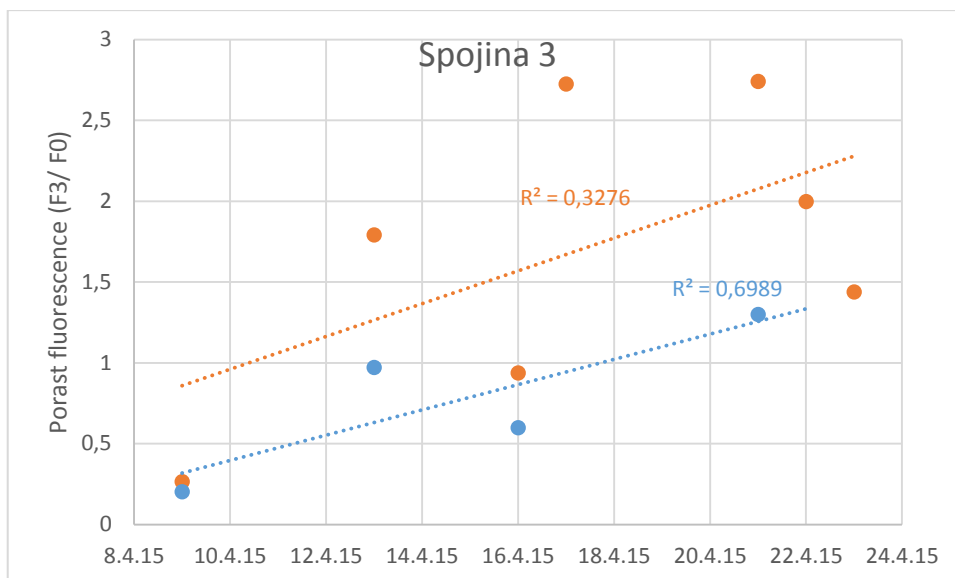
$$\text{Porast fluorescence} = \frac{F_x}{F_0} \quad (\text{fluorescenca z dodatkom antioksidanta in PMA}) / F_0(\text{fluorescenca po dodatku PMA})$$



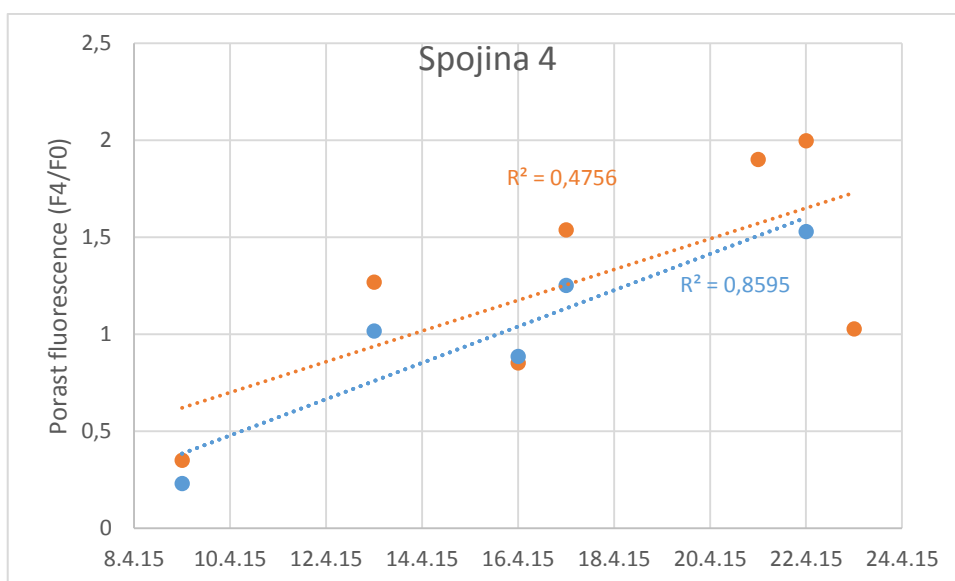
Slika 15: Naraščanje fluorescence spojine 1 v odvisnosti od časa (-----= rezultati pri 62,5 µM, -----=rezultat pri 31,25 µM)



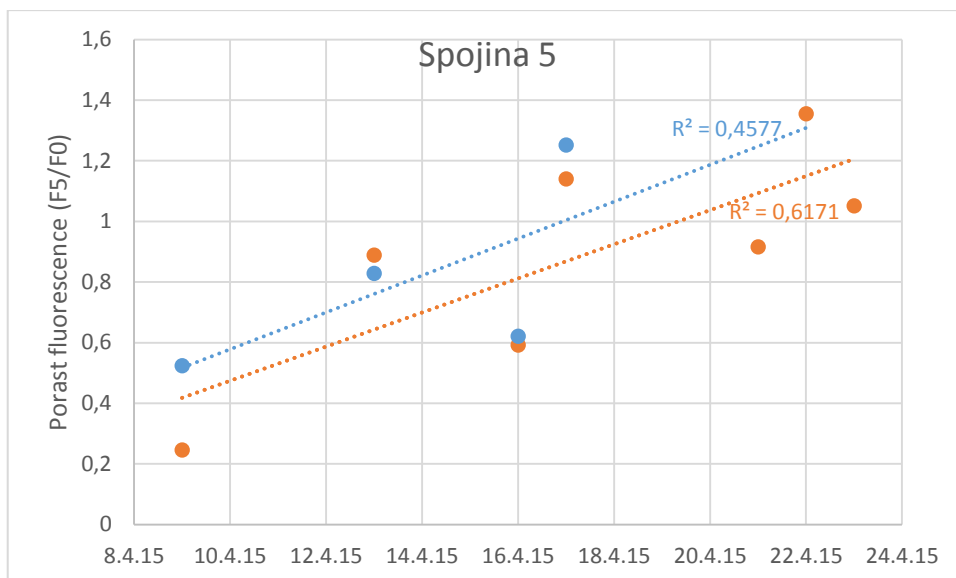
Slika 16: Naraščanje fluorescence spojine 2 v odvisnosti od časa (-----= rezultati pri 62,5 µM, -----=rezultat pri 31,25 µM)



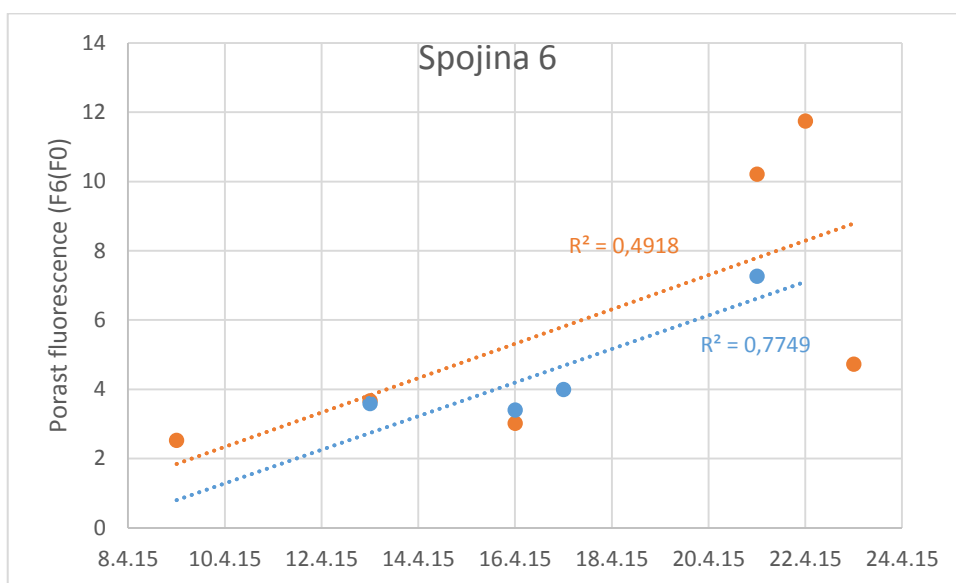
Slika 17: : Naraščanje fluorescence spojine 3 v odvisnosti od časa (- - - - = rezultati pri 62,5 μM , - - - - = rezultat pri 31,25 μM)



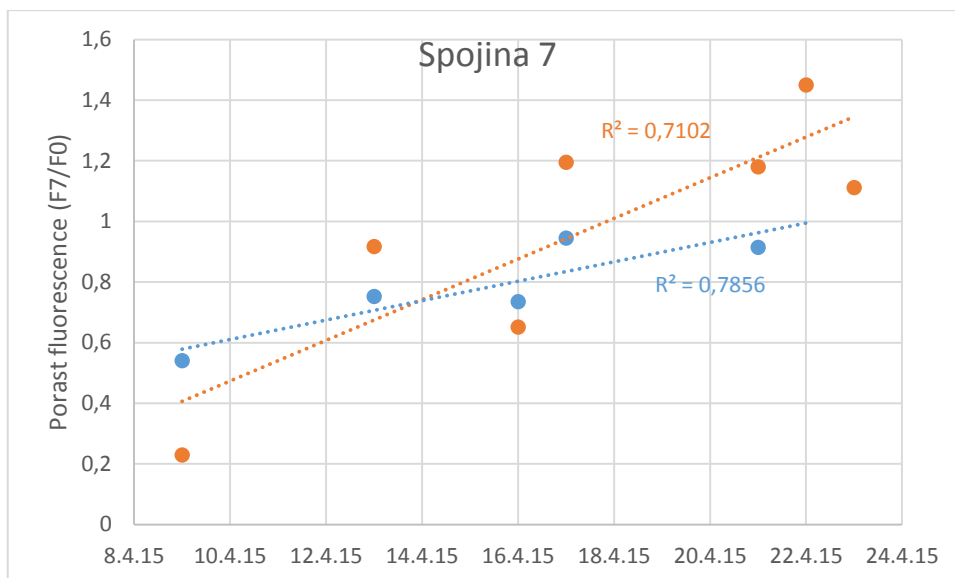
Slika 18: : Naraščanje fluorescence spojine 4 v odvisnosti od časa (- - - - = rezultati pri 62,5 μM , - - - - = rezultat pri 31,25 μM)



Slika 19: Naraščanje fluorescence spojine 5 v odvisnosti od časa (-----= rezultati pri 62,5 μM, -----=rezultat pri 31,25 μM)



Slika 20: Naraščanje fluorescence spojine 6 v odvisnosti od časa (-----= rezultati pri 31,25 μM, -----=rezultat pri 15,625 μM)



Slika 21: : Naraščanje fluorescence spojine 7 v odvisnosti od časa (- - - - - = rezultati pri 62,5 μM , - - - - - = rezultat pri 31,25 μM)

5. RAZPRAVA

5.1 TOPNOST IN CITOTOKSIČNOST TESTIRANIH SPOJIN

Pred testiranjem antioksidativne aktivnosti z metodo CAA, smo določali topnost spojin v DMSO. Ugotovili smo, da so vse spojine dobro topne pri 250 μM (razen spojina **6** pri 125 μM). S temi koncentracijami smo na naslednji stopnji izvedli test citotoksičnosti testiranih vinilognih kislin. Naš cilj je bil doseči živost celic PBMC po tretiranju z antioksidanti nad 80 %. Ugotovili smo, da je koncentracija 250 μM preveč toksična, saj je živost celic, tretiranih z antioksidanti, skoraj pri vseh manjša od 80 % (rezultati niso prikazani). Pri polovični koncentraciji (125 μM) so bile vrednosti celične viabilnosti malo boljše, vendar so bili antioksidanti še vedno preveč toksični za PBMC. Postopek redčenja koncentracije antioksidanta smo nadaljevali. Ugotovili smo, da je koncentracija 62,5 μM najugodnejša, saj je viabilnost celic pri vseh antioksidantih nad 80 %. Koristno je, da smo uporabili dva standarda pri testiranju, saj vidimo, da je galna kislina precej citotoksična. Test citotoksičnosti smo izvedli še pri osminski koncentraciji maksimalne koncentracije (31,25 μM). Pri tej vrednosti je bila viabilnost pri vseh vzorcih nad 90 %, razen pri galni kislini (ST2). Glede na rezultate smo v naslednji stopnji antioksidativno aktivnost z metodo CAA določali pri koncentraciji 62,5 μM in 31,25 μM .

5.2 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST TESTIRANIH SPOJIN

Test CAA uporabljamo za določanje intracelularnega vpliva spojin. Ovrednotimo moč antioksidanta kot lovilca radikalov. Določimo lahko privzem antioksidanta v celice, metaboliziranje spojin v celicah in porazdeljevanje antioksidantov v membrane. To je ključna prednost celičnih testov pred izključno kemijskimi. Z metodo CAA ne moremo določiti vpliva antioksidativnih encimov in vmešavanja ROS v procese celičnega signaliziranja (28).

S testom CAA ocenjujemo sposobnost spojin, da preprečijo oksidacijo DCFH – DA. Za zrušenje oksoredukcijskega ravnotežja se v tradicionalnih testih uporablja oksidant 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (ABAP). Ta v celičnih membranah povzroči lipidno prekosidacijo. Spontano nastajajo peroksilni radikali, ki so glavna vrsta reaktivnih zvrsti *in vivo* (21). Mi pa smo za porast reaktivnih zvrsti v celici uporabili forbol miristat acetat (PMA). PMA posredno aktivira encima NADPH-oksidazo in ksantin oksidazo, ki sta največja proizvajalca superoksida v celici. S PMA naraste koncentracija znotrajceličnih

ROS, zato nam omogoča vrednotenje antioksidanta znotraj celice. Iz rezultatov vidimo (slika 13 in 14), da dodatek PMA netretiranim celicam povzroči porast fluorescence. Fluorescenca se je po dodatku PMA povečala za trikratno vrednost v primerjavi z netretiranimi celicami brez aktivatorja.

Večina testiranih vinilognih kislin (spojine **2**, **3**, **4**, **5**, **7**) je kazala antioksidativno aktivnost pri obeh necitotoksičnih koncentracijah (62,5 μM in 31,25 μM). Spojina **1** se je pri višji koncentraciji obnašala kot prooksidant, pri nižji pa je imela antioksidativno delovanje. Gre za primer antioksidanta, ki pri določeni koncentraciji spremeni svoj značaj v prooksidativno delovanje. Spojina **6** pa je prooksidant pri obeh koncentracijah. Prooksidanti so spojine, ki spodbujajo oksidacijo in s tem količina reaktivnih zvrsti v celici naraste. Pri ocenjevanju antioksidativne aktivnosti smo za primerjavo uporabili široko uporabljene antioksidante, askorbinsko in galno kislino. V primerjavi s standardoma sta se kot najučinkovitejša zmanjševalca oksidacije v celici izkazali spojini **3** in **4**. Njuna antioksidativna aktivnost je primerljiva z obema standardoma.

Ugotovili smo, da so spojine aktivne. S tem ko dokažemo da je neka spojina aktivna, ne mislimo samo antioksidativne aktivnosti. Sem vključujemo tudi sposobnost spojine, da vstopi v celico, se v njej dobro porazdeljuje in preživi celični metabolizem. To pa so lastnosti dobrega antioksidanta.

5.3 NENADNA PORAST FLUORESCENCE

Antioksidanti v splošnem zmanjšujejo antioksidativni stres v celici. Nizkomolekularni antioksidanti večinoma delujejo kot lovilci radikalov in s tem zmanjšujejo stopnjo oksidacije v celici. Za antioksidante pa je značilno tudi, da lahko pod določenimi pogoji preobrnejo svoj značaj in postanejo prooksidanti (npr. askorbinska kislina, α -tokoferol, kvercetin). Najbolje okarakteriziran primer prooksidativnega delovanja je redukcija kovinskih ionov (npr. Fe^{3+}), ki lahko nato vstopajo v Fentonovo reakcijo, pri čemer nastajajo najreaktivnejši in najbolj toksičen radikal – hidroksilni radikal (10). Primer antioksidanta sposobnega redukcije železovih ionov je askorbinska kislina. Tudi kvercetin (29) in α -tokoferol (10) sta sicer dobra antioksidanta, a se pod določenimi pogoji oksidirata in postaneta prooksidanta, zaradi česar lahko povzročata lipidno peroksidacijo.

Testirani antioksidanti so pri prvem merjenju izkazali velik potencial antioksidativne aktivnosti, čez čas pa se je njihovo obnašanje spremenilo. Opazili smo trend linearnega

naraščanja fluorescence s časom shranjevanja pri vseh testiranih spojinah. Ne samo, da so spojine izgubile antioksidativno aktivnost, ampak je njihova aktivnost postala prooksidativna. Iskali smo vzrok za takšno obnašanje in prišli do smiselnih zaključkov. Antioksidante smo predhodno natehtali v plastične epruvete in jih raztopili v DMSO. Tako smo pripravili izhodne raztopine s koncentracijo 25 mM (spojina **6** 12,5 mM), s katerimi smo operirali skozi celotno testiranje. Med enim in drugim testiranjem smo jih zamrzovali in odmrzovali. V tem pa najbrž tiči glavni vzrok za naše rezultate.

Antioksidanti so bili pred raztapljanjem v trdnem agregatnem stanju, kjer je bila stična površina s kisikom relativno majhna. Po njihovem raztapljanju v topilu pa se je stična površina molekul drastično povečala, kar je imelo za posledico povečan obseg oksidacije teh spojin, pri čemer so se najbrž pretvorile do prooksidantov.

Obstaja tudi možnost, da smo v izhodne raztopine vnesli kovinske ione, saj smo antioksidante tehtali s kovinsko spatulo. Možno je, da naše spojine izražajo prooksidativno delovanje na podoben način kot askorbinska kislina. Lahko da so sposobne redukcije kovinskih ionov, ki vstopajo v Fentonovo reakcijo in povzročajo nastanek novih radikalov. Možno je, da so antioksidanti med staranjem v raztopini prispevali k redukciji kovinskih ionov in se na ta način porabljali, zato je bilo v izhodnih raztopinah s časom vse več reduciranih kovinskih ionov in vse manj aktivnih antioksidantov. Temu problemu bi se lahko izognili tako, da bi tehtanje opravljali z nekovinskim materialom.

Zelo verjeten vzrok za takšne rezultate je tudi samo topilo. Antioksidanti so bili raztopljeni v polarnem aprotičnem topilu dimetilsulfoksidu (DMSO), za katerega je značilno, da deluje kot oksidant. Znano je, da lahko vstopa v reakcijo Pfitzner – Moffat oksidacije ali Swernove oksidacije. Obe reakciji potekata na primarnih in sekundarnih alkoholih, produkt reakcij pa so ketoni (30).

V mnogih primerih imajo glavno vlogo za antioksidativno delovanje hidroksilne skupine. Tudi v našem primeru gre za hidroksilirane strukture. Lahko da je zaradi raztapljanja spojin v DMSO prišlo do počasne oksidacije hidroksilnih skupin testiranih antioksidantov, kar je prispevalo k temu, da so spojine izgubile svojo antioksidativno aktivnost in pridobile prooksidativno.

Krivdo za naše rezultate pripisujemo dejstvu, da smo izhodne raztopine antioksidantov pripravljali vnaprej. V primeru sprotne priprave raztopin se oksidativni učinki reduciranih

kovinskih ionov in DMSO ne bi izrazili oziroma bi se izrazili v manjšem obsegu. Prav tako bi se zmanjšal obseg oksidacije spojin zaradi povečanja stične površine s kisikom po raztapljanju.

Poudariti želimo, da testirani antioksidanti imajo antioksidativno moč, vendar je pri eksperimentalnem delu potrebno biti izredno pozoren na pogoje testiranja (koncentracijo kovinskih ionov in vrsto topila). Pri delu z njimi moramo tehtanje opravljati s plastičnimi žlicami, da ne vnesemo kovinskih ionov v vsebnike izhodnih raztopin. Tudi izbira topila mora biti smiselna, saj le-ta ne sme biti oksidant. Predvsem pa je pomembno, da raztopine antioksidantov za testiranje pripravljamo sproti.

6. SKLEP

Že dolgo je znano, da je vinilogna kislina v strukturi askorbinske kisline odgovorna za antioksidativno aktivnost. Na Kemijskem inštitutu so preko virtualnih knjižnic prišli do nekaterih vinilognih kislin. V okviru te magistrske naloge smo spojine biološko ovrednotili s celičnimi modeli na krvnih mononuklearnih celicah (PBMC) in prišli do naslednjih ugotovitev:

- ❖ Spojine so dobro topne v dimetilsulfoksidu (DMSO) pri koncentraciji 250 μM , razen spojina **6** pri 125 μM .
- ❖ Pri koncentraciji 62,5 μM (spojina **6** 31,25 μM) so vse testirane spojine necitotoksične, zato je ta koncentracija primerna za nadaljnjo biološko vrednotenje.
- ❖ Spojine **2, 3, 4, 5, 7** zaježijo porast reaktivnih zvrsti induciran s forbol miristat acetatom, pri čemer najboljšo antioksidativno aktivnost izražata spojini **3** in **4**.
- ❖ Testirani antioksidanti prehajajo celično membrano, se dobro porazdeljujejo v celici in preživijo celični metabolizem.
- ❖ Ker so antioksidanti občutljivi na pogoje testiranja (koncentracijo kovinskih ionov in vrsto topila) jih tehtamo s plastičnimi žlicami in izberemo topilo, ki ni oksidant.
- ❖ DMSO ni ustrezno topilo pri vrednotenju antioksidativnosti spojin saj lahko deluje kot oksidant.

7. VIRI

- 1) Predavanja iz Farmacevtske kemije III, Janez Mravljak
(http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2011-12/Predavanja/Radikali_18102011__Združljivostni_način_.pdf)
- 2) Osredkar Joško, Oksidativni stres, Zdrav Vestn 2012, 81: 393-406
- 3) Valko M, Rhodes C.J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico – Biological Interactions* 2006;160: 1 – 40
- 4) Aruoma I. Okezie: Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS* 1998; Vol. 75, no.2: 199 – 212
- 5) Jian-Ming Lü, Peter.H Lin, Qizhi Yao, Changyi Chen: Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):840 – 860
- 6) Šuput D, Kramarič L: Izvor in reakcije radikalov. In: Ribarič S eds. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2001; 15 – 24
- 7) Šuput D, Kramarič L: Vnetje. In: Ribarič S eds. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2001; 45 – 52
- 8) Valgimigli L, Pratt A.D: Antioxidants in Chemistry and Biology. *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials* 2012; 1 – 55
- 9) Šuput D, Kramarič L: Reaktivne kisikove spojine v patoloških procesih. In: Ribarič S eds. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2001; 25 – 36
- 10) Farmacevtska kemija III Antioksidanti, Vaje in seminarji (http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Seminarji/Antioksidanti.pdf)
- 11) Nadal B, Thetiot-Laurent A.-L. S, Pin S, Renault JP, Cressier D, Rima G, Le Roux A, Meunier S, Wagner A, Lion C, Le Gall T: Synthesis and antioxidant properties of pulvinic acids analogues. *Bioorganic & Medical Chemistry* 2010;18: 7931 - 7939
- 12) Habrant D, Poigny S, Ségur-Derai M, Brunel Y, Heurtaux B, Le Gall T, Strehle A, Saladin R, Meunier S, Mioskowski C, Wagner A: Evaluation of Antioxidants

- Properties of Monoaromatic Derivates of Pulvinic Acids. *J. Med. Chem.* 2009; 52: 2454 – 2464
- 13) Le Roux A, Meunier S, Le Gall T, Denis JM, Bischoff P, Wagner A: Synthesis and Radioprotective Properties of Pulvinic Acid Derivates. *ChemMedChem* 2011; 6: 561 – 569
- 14) Le Roux A, Kuzmanovski I, Habrant D, Meunier S, Bischoff P, Nadal B, Thetiot-Laurent A.-L. S, Le Gall T, Wagner A, Novič M: Design and Synthesis of New Antioxidants Predicted by the Model Developed on a Set of Pulvinic Acid Derivates. *J.Chem.Inf.Model* 2011; 51: 3050 – 3059
- 15) Martinčič R, Kuzmanovski I, Wagner A, Novič M: Development of models for prediction of the antioxidant activity of derivates of natural compounds. *Analytica Chimica Acta* 2015 (article in press)
- 16) [http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/LPG/LED/LED_Documents/Application & Technical Notes/Centrifuges/Benchtop Centrifuges/General Purpose Centrifuges/D13981~.pdf](http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/LPG/LED/LED_Documents/Application_&Technical_Notes/Centrifuges/Benchtop_Centrifuges/General_Purpose_Centrifuges/D13981~.pdf)
- 17) <http://www.termania.net/slovarji/mikrobioloski-slovar/5669218/fikol>
- 18) Noble P.B, Cutts J.H, Carroll K.K: Ficol Flotation for the Separation of Blood Leukocyte Types. *Blood* 1968; 31:66 - 73
- 19) http://www.imba.oeaw.ac.at/uploads/media/PBMC_isolation_from_human_blood_02.pdf
- 20) López-Alarcón C, Denicola A: Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta* 2013; 763: 1 – 10
- 21) Kelly L. Wolfe, Rui Hai Liu: Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 8896 – 8907
- 22) Myhre O, Andersen M. J, Aarnes H, Fonnum F: Evaluation of the probes 2',7' - dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65: 1575 – 1582
- 23) Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies J.A. K, Dennery A. P, Forman HJ, Grisham B. M, Mann E. G, Moore K, Roberts II L. J, Ischiropoulos H: Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology & Medicine* 2012;52: 1 – 6

- 24) Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yan Yu H, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H: High Glucose Level and Free Fatty Acid Stimulate Reactive Oxygen Species Production Through Protein Kinase C-Dependent Activation of NAD(P)H Oxidase in Cultured Vascular Cells. *Diabetes* 2000; 49: 1939 - 1945
- 25) Jen- Kun Lin, Cheng-An Shih: Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/oxidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH3T3. *Carcinogenesis* 1994; Vol.15 No.8: 1717 - 1721
- 26) Van Reyk M. D, King J.C. N, Dinauer C. M, Hunt H. N: The intracellular oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein in murine T lymphocytes. *Radical Biology & Medicine* 2000; Vol.30, No.1: 82 – 88
- 27) Robinson J. P, Bruner H. L, Bassoe F.-C, Hudson L. J, Ward A. P, Phan H. S: Measurement of Intracellular Fluorescence of Human Monocytes Relative to Oxidative Metabolism. *Journal of Leukocyte Biology* 1988; 43: 304 – 310
- 28) Becker K, Schroecksnadel S, Gostner J, Zaknun C, Schennach H, Überall F, Fuchs D: Comparison of in vitro tests for antioxidants and immunomodulatory capacities of compounds. *Phytomedicine* 2014; 21: 164 – 171
- 29) Metodiewa D, Jaiswal K. A, Cenas N, Dickancaite E, Segura- Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; Vol.26, Nos.1/2: 107 – 116
- 30) en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl_sulfoxide
- 31) http://sl.wikipedia.org/wiki/Mednarodni_kemijski_identifikator
- 32) <http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Creslovina>