

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA ZUPANČIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA ZUPANČIČ

**VREDNOTENJE IMID DIOKSIMOV Z
DEOKSIRIBOZNIM IN FEROZINSKIM TESTOM**

**EVALUATION OF IMID DIOXIMES WITH
DEOXYRIBOSE ASSAY AND FERROZINE ASSAY**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku za pomoč pri pripravi reagentov in analizi vzorcev ter nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

V veliko pomoč mi je bilo tudi osebje, ki je sočasno delalo v laboratoriju na Katedri za farmacevtsko kemijo.

Zahvalila bi se tudi svoji družini, ki me je spodbujala pri pisanju magistrske naloge in verjela v moje sposobnosti ter prijateljem, ki se niso pritoževali nad mojim pomanjkanjem časa.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko z naslovom Vrednotenje imid dioksimov z deoksiriboznim in ferozinskim testom izdelala samostojno, pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm..

Mojca Zupančič

Ljubljana, 2015

Predsednik komisije: prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

Mentor: doc. dr. Janez Mravljak

Član komisije: doc. dr. Jurij Trontelj

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	OKSIDATIVNI STRES	1
1.1.1	DEFINICIJA.....	1
1.1.2	POSLEDICE OKSIDATIVNEGA STRESA.....	1
1.1.3	VZROKI ZA OKSIDATIVNI STRES.....	1
1.1.4	TARČE REAKTIVNIH ZVRSTI	2
1.2	REAKTIVNE ZVRSTI	3
1.2.1	DEFINICIJA RADIKALA.....	3
1.2.2	NASTANEK RADIKALOV	4
1.2.3	ZNAČILNOSTI RADIKALOV	4
1.2.4	RADIKALSKE REAKCIJE.....	4
1.2.5	KISIK	5
1.2.6	REAKTIVNE ZVRSTI	6
1.3	URAVNAVANJE OKSIDATIVNEGA STRESA, ANTIOKSIDANTI.....	7
1.3.1	ANTIOKSIDATIVNI SISTEM	7
1.3.2	ANTIOKSIDANTI.....	8
1.3.3	PRO-OKSIDATIVNI UČINEK ANTIOKSIDANTOV	9
1.4	DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA	9
1.5	VREDNOTENJE ANTIOKSIDANTOV	11
1.5.1	FEROZINSKI TEST: DOLOČANJE SPOSOBNOSTI KELACIJE Fe^{2+}	11
1.5.2	DEOKSIRIBOZNI TEST S TIOBARBITURNO KISLINO (TBA)	13
1.6	PRINCIP UV/VIS SPEKTROSKOPIJE	14
2	NAMEN DELA	17
3	MATERIALI IN METODE.....	18
3.1	SPOSOBNOST TVORBE KOMPLEKSOV S KOVINSKIMI IONI (FEROZINSKI TEST)	18
3.1.1	VZORCI ZA FEROZINSKI TEST	18
3.1.2	UPORABLJENE APARATURE, LABORATORIJSKI PRIBOR IN REAGENTI.....	19
3.1.2.1	Uporabljene spojine, reagenti.....	19

3.1.2.2	Uporabljene aparature	20
3.1.2.3	Uporabljen laboratorijski pribor.....	20
3.1.3	PRIPRAVA REAGENTOV	20
3.1.3.1	250 µM FeCl ₂	20
3.1.3.2	1 mM ferozin.....	21
3.1.4	PRIPRAVA RAZTOPIN VZORCEV.....	21
3.1.5	POSTOPEK DELA	22
3.2	DEOKSIRIBOZNI TEST	24
3.2.1	VZORCI ZA DEOKSIRIBOZNI TEST.....	24
3.2.2	UPORABLJENE APARATURE, LABORATORIJSKI PRIBOR IN REAGENTI.....	25
3.2.2.1	Uporabljene spojine, reagenti.....	25
3.2.2.2	Uporabljene aparature	25
3.2.2.3	Uporabljen laboratorijski pribor.....	25
3.2.3	PRIPRAVA REAGENTOV	26
3.2.3.1	33,6 mM raztopina 2-deoksiriboze.....	26
3.2.3.2	Delovna raztopina 300 µM FeCl ₃	26
3.2.3.3	1,2 mM EDTA.....	26
3.2.3.4	50 mM NaOH.....	26
3.2.3.5	1,2 mM raztopina askorbinske kisline.....	27
3.2.3.6	33,6 mM H ₂ O ₂	27
3.2.3.7	Raztopina tiobarbiturne kisline (TBA) in trikloroacetne kisline (TCA)	27
3.2.4	PRIPRAVA VZORCEV	28
3.2.5	POSTOPEK DELA	29
3.3	METODA DOLOČANJA: UV/VIS SPEKTROSKOPIJA	31
3.3.1	ČITALEC MIKROTITRSKIH PLOŠČ SYNERGY™ HT, BIOTEK	31
3.3.2	UV/VIS SPEKTROFOTOMETER CARY 50 CONC, VARIAN	32
3.4	OBDELAVA PODATKOV.....	33
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	34
4.1	REZULTATI FEROZINSKEGA TESTA.....	34
4.1.1	SPOJINA ZJ-70.....	34
4.1.2	SPOJINA ZJ-70b.....	36
4.1.3	SPOJINA ZJ-168.....	37

4.1.4	SPOJINA ZJ-72b.....	39
4.1.5	SPOJINA ZJ-76.....	40
4.1.6	SPOJINA ZJ-84.....	41
4.2	REZULTATI DEOKSIRIBOZNEGA TESTA.....	43
4.2.1	SPOJINA ZJ-167_1.....	44
4.2.2	SPOJINA ZJ-176.....	46
4.2.3	SPOJINA ZJ-70.....	48
4.3	RAZPRAVA	49
5	SKLEPI.....	53
6	LITERATURA.....	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizem lipidne peroksidacije	3
Slika 2: Struktura kompleksa med ferozinom in železom.....	12
Slika 3: Nastanek obarvanega produkta v reakciji med TBA in MDA	13
Slika 4: Shematski prikaz enožarkovnega spektrofotometra (prirejeno po (16))	15
Slika 5: Prikaz nanašanja raztopin vzorcev v triplikatih, slepih vzorcev in slepih vzorcev reagenta na mikrotitrsko ploščico s skupnim končnim volumnom 300 µL	23
Slika 6: Primer priprave serije raztopin spojine ZJ-176 skupaj s slepimi vzorci.....	29
Slika 7: Čitalec mikrotitrskih plošč Synergy TM HT proizvajalca Biotek s katerim smo izmerili absorbance spojinam pri ferozinskem testu	31
Slika 8: UV/VIS spektrofotometer Cary 50 Conc proizvajalca Varian, s katerim smo izmerili absorbance spojinam pri deoksiriboznem testu	32
Slika 9: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-70	35
Slika 10: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-70b	36
Slika 11: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-168	38
Slika 12: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-72b	39
Slika 13: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-76	41
Slika 14: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-84	42
Slika 15: Graf odvisnosti 1/A od koncentracije vzorca ZJ-167_1	44
Slika 16: Graf % inhibicije poškodb 2-DR v odvisnosti od koncentracije spojine ZJ-167_1	45
Slika 17: Graf odvisnosti 1/A od koncentracije vzorca ZJ-176	46
Slika 18: Graf % inhibicije poškodb 2-DR v odvisnosti od koncentracije spojine ZJ-176..	47
Slika 19: Graf odvisnosti 1/A od koncentracije vzorca ZJ-70	48
Slika 20: Graf % inhibicije poškodb 2-DR v odvisnosti od koncentracije spojine ZJ-70...	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz spojin za ferozinski test	18
Preglednica II: Prikaz postopka priprave ustreznih raztopin	21
Preglednica III: Prikaz spojin za deoksiribozni test	24
Preglednica IV: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-70 pri različnih koncentracijah	34
Preglednica V: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-70b pri različnih koncentracijah	36
Preglednica VI: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-168 pri različnih koncentracijah	37
Preglednica VII: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-72b pri različnih koncentracijah	39
Preglednica VIII: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-76 pri različnih koncentracijah	40
Preglednica IX: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-84 pri različnih koncentracijah	41
Preglednica X: Izmerjene vrednosti absorbanc za različne koncentracije spojine ZJ-167_1 ter izračuni povprečnih vrednosti, standardne deviacije in % inhibicije	44
Preglednica XI: Izmerjene vrednosti absorbanc za različne koncentracije spojine ZJ-176 ter izračuni povprečnih vrednosti, standardne deviacije in % inhibicije	46
Preglednica XII: Izmerjene vrednosti absorbanc za različne koncentracije spojine ZJ-70 ter izračun % inhibicije	48

POVZETEK

Zaradi čedalje bolj stresnega življenja se na trgu pojavlja vedno večja potreba po prehranskih dopolnilih in pripravkih, ki vsebujejo antioksidante. Prevelika količina stresa vodi v zgodnje staranje in bolezni kot so ateroskleroza, srčni infarkt, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, kronični bronhitis, siva mrena in nekatere vrste raka. Posebna vrsta stresa, ki nastane pri aerobnih organizmih zaradi izkoriščanja kisika, pa se imenuje oksidativni stres. Oksidativni stres se pojavi, kadar je povečano nastajanje reaktivnih zvrsti in/ali zmanjšana antioksidativna obramba v celici. Antioksidanti so snovi, ki upočasnijo, preprečijo ali odstranijo poškodbe tarčnih molekul, ki so nastale zaradi oksidativnega stresa. Antioksidanti delujejo tako, da odstranjujejo reaktivne zvrsti ali pa preprečijo njihov nastanek.

Namen magistrske naloge je bil ovrednotiti antioksidacijske sposobnosti imid dioksimov z deoksiriboznim in ferozinskim testom. V nalogu smo vključili 8 spojin, 6 od teh spojin smo testirali s ferozinskim testom in 3 spojine z deoksiriboznim testom.

S ferozinskim testom smo določili, kako dobro spojine kelirajo dvovalentno železo. V testu, ki poteka na mikrotitrskih ploščah, spojina tekmuje s ferozinom za vezavo Fe^{2+} . Kompleks ferozina z železom je vijolično obarvan, kar lahko spektrofotometrično izmerimo pri 562 nm. Iz dobljenih absorbanc smo določili EC_{50} , ki je tista koncentracija spojine, ki kelira 50% Fe^{2+} . Štiri spojine so se izkazale za aktivne, medtem ko dve spojini nista kelirali železovih ionov. Spojino, ki je najbolje kelirala železove ione, smo testirali še z deoksiriboznim testom.

Z deoksiriboznim testom smo določali malondialdehid (MDA), ki nastane pri razgradnji deoksiriboze s hidroksilnim radikalom ($\cdot\text{OH}$). MDA tvori vijoličen produkt s tiobarbiturno kislino, ki ga lahko spektrofotometrično kvantificiramo pri 532 nm. Spojinam smo določali, koliko so sposobne reagirati s hidroksilnim radikalom in na ta način preprečiti poškodbe deoksiriboze. Iz dobljenih rezultatov smo določili % inhibicije delovanja hidroksilnega radikala. Pri dveh spojinah smo dobili dobre rezultate, saj sta dobro inhibirali delovanje $\cdot\text{OH}$, vendar smo pri visokih koncentracijah opazili tudi pro-oksidativni učinek.

Ključne besede: oksidativni stres, antioksidanti, ferozinski test, deoksiribozni test

ABSTRACT

There is a growing need for antioxidant-containing supplements on the market, due to ever more stressful life. High stress levels lead to early ageing and various diseases (atherosclerosis, heart stroke, Alzheimer's disease, diabetes, chronic bronchitis, cataract and some types of cancer). A special type of stress that occurs due to oxygen exploitation in anaerobic organisms is called oxidative stress. Oxidative stress develops at the increased occurrence of reactive species and/or decreased level of the antioxidative defence in the cell. Antioxidants are substances that slow down, prevent or remove damage in the targeted molecules as a result of oxidative stress. Antioxidants function by removing reactive species or by preventing their formation.

The main objective of this Master's Thesis was to evaluate the antioxidative abilities of imid dioximes with the deoxyribose assay and the ferrozine assay. 8 compounds were evaluated, 6 of which were tested with the ferrozine assay and 3 with the deoxyribose assay.

The ferrozine assay was used to determine how well the compounds chelate ferrous ions. Test is designed in microwell plates where the compound competes against ferrozine for binding Fe^{2+} . The ferrozine complex is coloured violet, which can be measured spectrophotometrically at 562 nm. The given absorbances were the basis for determining EC₅₀ – the compound concentration which chelates 50% of Fe^{2+} . Four compounds were active, while two compounds did not chelate iron ions. We decided to test the compound that chelated iron ions the best also with the deoxyribose assay.

With the deoxyribose assay we determined malondialdehyde (MDA), which forms in the process of deoxyribose decomposition with the hydroxyl radical ('OH). MDA occurs as a violet product with thiobarbituric acid and can be spectrophotometrically quantified at 532 nm. We determined the ability of the compounds to react with the hydroxyl radical, and thus to prevent deoxyribrosis damage. The end results served for determining the percentage of the inhibition in the functioning of the hydroxyl radical. Two compounds gave good results, because they inhibited the functioning of the 'OH well. Nevertheless, we noticed a pro-oxidative effect at high concentration levels.

Keywords: oxidative stress, antioxidants, ferrozine assay, deoxyribose assay

SEZNAM OKRAJŠAV

2-DR	2-deoksiriboza
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
CAT	katalaza
CUPRAC	CUPric Reducing Antioxidant Capacity
d-ROMs	The Reactive Oxygen Metabolites
DPPH	difenilpikrilhidrazil
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
GPx	glutation peroksidaza
GSH	glutation
MDA	malondialdehid
RNS	reaktivne dušikove spojine
ROS	reaktivne kisikove spojine
RSS	reaktivne žveplove spojine
SOD	superoksid dismutaza
TBA	tiobarbiturna kislina
TCA	triklorooacetna kislina

1 UVOD

1.1 OKSIDATIVNI STRES

1.1.1 DEFINICIJA

Človek je vsakodnevno izpostavljen določeni količini fizičnega, psihičnega ali kemičnega stresa. Majhna količina stresa je v telesu stalno prisotna in lahko celo pripomore k delovanju človeškega telesa. Problem se pojavi, ko je količina stresa povečana, kar ima škodljive posledice. Posebna vrsta stresa, ki smo mu zaradi izkoriščanja kisika izpostavljeni vsi aerobni organizmi, imenujemo oksidativni stres. Je patološko stanje, ki nastane zaradi povečane količine reaktivnih zvrsti, ki povzročajo poškodbe celic in tkiv v organizmu. O oksidativnem stresu govorimo, kadar je porušeno ravnotežje med nastajanjem reaktivnih zvrsti (radikali, reaktivne kisikove-ROS in reaktivne dušikove spojine-RNS) ter antioksidativno obrambo v celici (1).

1.1.2 POSLEDICE OKSIDATIVNEGA STRESA

Oksidativni stres pomembno prispeva k začetku razvoja bolezenskega procesa, ki je največkrat posledica prekomernega in nekontroliranega nastajanja superoksidnega radikala. Problem je, ker oksidativnega stresa na začetku ne prepoznamo, vse dokler ne nastanejo nepopravljive poškodbe in se pojavijo simptomi kroničnih bolezni. Oksidativni stres je glavni krivec za zgodnje staranje in razne bolezni, kot so npr. ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, kronični bronhitis, siva mrena in nekatere vrste raka (1,2).

1.1.3 VZROKI ZA OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je lahko posledica znižanega nivoja antioksidantov, ki preprečujejo radikalske poškodbe in/ali povečane tvorbe reaktivnih zvrsti. Nivo antioksidantov v telesu je lahko zmanjšan zaradi mutacije gena, ki kodira encimski antioksidant (SOD – superoksid dismutaza, katalaza - CAT, glutation peroksidaza - GPx, tioredoksin reduktaza), pomanjkanja vitaminov in mineralov v prehrani ali pomanjkanja esencialnih aminokislin (bolezen kwashiorkor). Do povečane tvorbe reaktivnih zvrsti pa lahko pride zaradi izpostavitve višjim vrednostim kisika (višji parcialni tlak – pO_2), zaradi različnih toksinov, ki jih vnesemo s hrano ali zdravili in se pri njihovem metabolizmu tvorijo reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in reaktivne dušikove zvrsti (RNS), lahko pa pride do

prekomerne aktivacije fizioloških sistemov, ki tvorijo reaktivne spojine. To se zgodi v primeru aktivacije celic imunskega sistema in kroničnih vnetnih bolezni (1,3).

Med dejavnike, ki pospešujejo oksidativni stres, pa sodi tudi hiter življenjski slog, onesnaženost okolja, kajenje, toksikomanogene snovi, pesticidi, različne vrste sevanja, kemikalije in intenzivna telesna dejavnost. Glavni viri reaktivnih zvrsti, ki nastajajo v telesu, so celično dihanje, prenos kisika s hemoglobinom, oksidativni izbruh kot del obrambe imunskega sistema in metabolizem telesu lastnih spojin ter ksenobiotikov (1,3).

1.1.4 TARČE REAKTIVNIH ZVRSTI

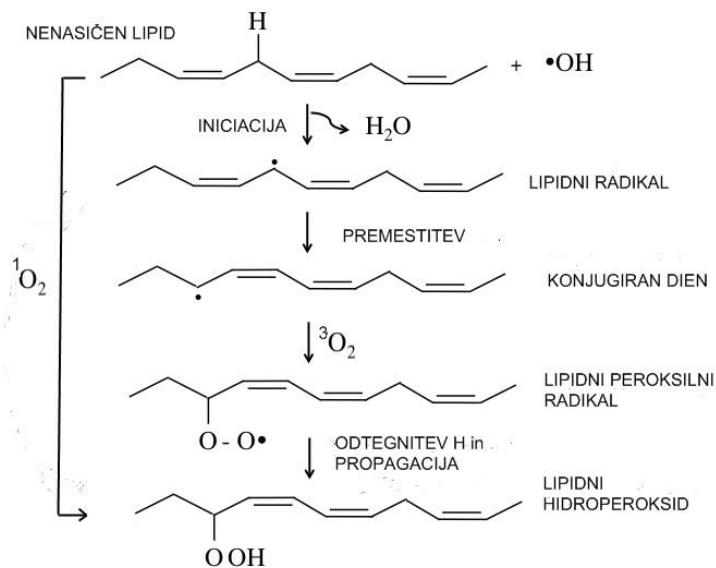
Glavne tarče reaktivnih zvrsti (predvsem hidroksilnega radikala) so proteini, DNA, RNA, sladkorji in lipidi. Pri proteinih obstajajo trije različni načini oksidacijskih sprememb: oksidativna poškodba specifične aminokisline, fragmentacija peptidne verige zaradi nastanka radikala ali navzkrižno povezovanje proteinov s produkti lipidne peroksidacije (4).

Poškodbe na molekuli DNA so lahko tako kemične kot strukturne: eliminacija baz iz molekule DNA, modifikacija baz, mutacije, premik bralnega okvirja, fragmentacija DNA, nastanek aduktov med DNA in proteinom ali lipidom ter kromosomske preureditve. Pomembna reakcija, ki je vpletena v poškodbe DNA molekule, je nastanek hidroksilnega radikala pri Fentonovi reakciji. Hidroksilni radikal namreč lahko reagira z vsemi strukturnimi enotami DNA molekule: purinskimi in pirimidinskimi bazami ter slatkornim ogrodjem (4).

Nastanek kisikovih radikalov med zgodnjo fazo glikacije (ne-encimsko pripenjanje sladkorjev na lipide ali proteine) lahko povzroči oksidativne poškodbe. Med začetnimi fazami glikacije fragmentacija sladkorjev povzroči nastanek kratkih verig (npr. glikoaldehid), ki so prekratke za ciklizacijo in so zato izpostavljene avtooksidaciji, pri čemer nastane superoksidni radikal. Pri verižni reakciji, ki jo sproži ta radikal, lahko nastanejo α - in β -dikarbonili, ki so znani mutageni (4).

Lipidna peroksidacija je oksidativno kvarjenje večkrat nenasičenih lipidov. Primarno mesto napada radikala je metilenska skupina med dvema dvojnima vezema na lipidu. Radikal, ki sproži lipidno peroksidacijo, odtegne vodikov atom iz metilenske skupine, pri čemer nastane ogljikov radikal na lipidu (lipidni radikal). Več kot je dvojnih vezi na

maščobni kislini, bolj je dovzetna za lipidno peroksidacijo, ker je odtegnitev vodikovega atoma lažja. Po odtegnitvi vodikovega atoma poteče pre mestitev in dobimo nov lipidni ogljikov radikal, ki reagira s kisikom do peroksilnega radikala. Peroksilni radikal je dovolj reaktiv, da vstopa v nadaljnjo radikalsko reakcijo s sosednjim lipidom in ponovno odtegne vodik. S tem nastane lipidni hidroperoksid in začne se propagacijska faza lipidne peroksidacije. Glavni radikal, ki sproži oksidacijo lipidov, je hidroksilni radikal, ki nastane v Fentonovi reakciji kot produkt interakcije med vodikovim peroksidom in kovinskimi ioni (Fe^{2+} , Cu^{+}) (4).



Slika 1: Mehanizem lipidne peroksidacije

Drugi način nastanka lipidnih hidroperoksidov je s singletnim kisikom (${}^1\text{O}_2$), ki napade večkrat nenasocene maščobne kisline ali njihove stranske verige. ${}^1\text{O}_2$ nastaja v poznih fazah lipidne peroksidacije, ko se kopijo peroksilni radikali. ${}^1\text{O}_2$ ni iniciator lipidne peroksidacije, jo pa znatno pospeši (3,4).

1.2 REAKTIVNE ZVRSTI

1.2.1 DEFINICIJA RADIKALA

Radikali so atomi, ioni ali molekule, ki imajo v svoji strukturi najmanj en nesparjen elektron. Nesparjen elektron se nahaja v zunanji (valenčni) atomski ali molekulski orbitali. Prisotnost nesparjenega elektrona daje spojini posebne kemične in fizikalne lastnosti. Nesparjen elektron zaradi magnetnega momenta povzroči nastanek lokalnega magnetnega polja, zato je taka snov paramagnetna. Radikali običajno zelo hitro reagirajo s snovmi v

svoji okolici zaradi težnje nesparjenega elektrona po pridobitvi partnerskega elektrona. Izjema so elementi prehodnih kovin (ioni, kompleksi), ki imajo ravno tako enega ali več nesparjenih elektronov, vendar kompleksi iz teh elementov niso radikali, imajo pa paramagnetne lastnosti in lahko sodelujejo v radikalnih reakcijah (3,5).

1.2.2 NASTANEK RADIKALOV

Radikali nastanejo pri enoelektronskih redukcijah, oksidacijah in pri homolitski cepitvi kovalentne vezi pod vplivom svetlobe, topote in sevanja. Pri homolitski cepitvi kovalentne vezi nastane par radikalov, kjer se skupni elektronski par kovalentne vezi razdeli na oba fragmenta. Za homolitsko cepitev je potrebna energija v obliki topote (termoliza) ali UV svetlobe (fotoliza). Rentgenski in gama žarki imajo dovolj veliko energijo, da iz molekule izbijejo elektron iz atomske orbitale in poteče ionizacija molekule, ki ji sledi stabilizacija z razpadom molekule na radikal in proton (3,6).

1.2.3 ZNAČILNOSTI RADIKALOV

Večina radikalov je zelo reaktivnih. Vzrok za visoko kemično reaktivnost je težnja elektrona po pritegnitvi partnerskega elektrona z nasprotno usmerjenim spinom. Posledica njihove kemične reaktivnosti je kratka življenska doba (10^{-3} sekunde), čeprav so nekateri radikali lahko stabilni desetletja. Vstopajo v radikalne reakcije, ki so drugačne od običajnih reakcij. So paramagnetni, ker elektron brez para z vrtenjem okoli svoje osi daje snovi magnetne lastnosti. Vsi radikali so obarvani, kar pomeni, da absorbirajo svetlobo v vidnem delu spektra. Fiziološke koncentracije radikalov so od 10^{-7} do 10^{-11} mol/L, kar je na meji ali izven območja običajnih metod detekcije. Koncentracije so tako nizke, ker radikalne reakcije tako hitro potekajo (6).

1.2.4 RADIKALNE REAKCIJE

Radikalne reakcije se razlikujejo od ostalih kemičnih reakcij. So večinoma zelo hitre in dosegajo hitrosti encimsko kataliziranih reakcij, vendar radikalne reakcije niso nadzorovane. V radikalne reakcije vstopajo samo reaktivni radikali, ki lahko reagirajo praktično z vsako spojino v okolici. So na splošno zelo hitre, razvezjane, stalno prisotne in nanje ne vplivajo okoliški pogoji. Potekajo spontano in dajejo veliko množico produktov. Pogosto gre za verižne reakcije, kjer stalno nastajajo vedno novi radikali, dokler ne nastanejo stabilni radikali ali dokler dva radikala ne reagirata med seboj. Verižna reakcija

je reakcija, ki jo praviloma sprožimo z enim (ali nekaj) radikalom (radikali), nato pa se sama vzdržuje, dokler ne zmanjka reaktantov. Z bližnjimi molekulami reagirajo samo po enem od naslednjih načinov:

- odvzem ali odtegnitev vodikovega atoma,
- adicija radikala na dvojno vez,
- reakcija dveh radikalov.

Pomembne so predvsem reakcije med radikali in neradikali, kjer vedno nastane nov radikal in pride do verižne reakcije. Kadar pa reagirata dva radikala med seboj, dimerizirata in s tem se radikalska reakcija zaključi (6).

1.2.5 KISIK

Ves kisik v atmosferi je biogenega izvora. Neprestano nastaja iz vode kot stranski produkt fotosinteze. Je nujno potreben za življenje vseh aerobnih organizmov kot končni prejemnik elektronov in protonov pri celičnem dihanju, s katerim celica pridobiva energijo. Kljub temu, da je nujno potreben za življenje, pa je hkrati vir vseh ostalih reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so visoko reaktivne in lahko oksidirajo katero koli organsko molekulo v organizmu. Reaktivnost kisika izvira iz elektronske strukture njegove molekule, kjer sta na zunanji molekulski orbitali prisotna dva nesparjena elektrona. Nesparjena elektrona imata enako usmerjenost spina, zato je molekula s takšno razporeditvijo elektronov v osnovnem tripletnem stanju, ki je pri kisiku stanje z najnižjo energijo. Tripletni kisik (${}^3\text{O}_2$) je zato biradikal. Načeloma je slabo reaktivен, saj lahko manjkajoča elektrona pridobi le postopoma. Reakcije pa so hitre le z radikali in ioni prehodnih elementov, ki lahko ponudijo en elektron (1,5).

Singletni kisik (${}^1\text{O}_2$) nastane iz ${}^3\text{O}_2$ z obratom enega od spinov. S tem se bistveno poveča reaktivnost molekule. Je zelo kratkoživ, ker hitro reagira z organskimi snovmi na mestu nastanka, tako da jih oksidira. V atmosferi ga zato najdemo le v sledovih. Nastaja lahko fotokemično in pri nekaterih kemičnih reakcijah, nadalje pa sproža reakcije, kjer nastajajo endoperoksidi (1,5).

Ozon (O_3) je še ena izmed alotropnih modifikacij kisika in je sestavljen iz treh molekul kisika. V naravi nastaja v višjih plasteh atmosfere iz kisika, pri čemer je potrebna energija,

ki jo dobi iz UV svetlobe. Ozon ima deloma radikalno naravo (singletni diradikal), je močan oksidant in reaktivnejši od kisika. V ozračju deluje kot filter UV svetlobe, saj v celoti odstrani UVC žarke, prepušča le 5% UVB in 95% UVA ter vidno svetlobo. Nastaja lahko tudi ob zemeljskem površju kot posledica onesnaženosti okolja. Na površju Zemlje je nevaren, ker lahko poškoduje pljučno tkivo in pospeši staranje kože (3,5).

1.2.6 REAKTIVNE ZVRSTI

Reaktivne zvrsti so radikali in neradikali, ki lahko nenadzorovano oksidirajo gradnike celic. Med reaktivne zvrsti sodijo reaktivne kisikove zvrsti (ROS), reaktivne dušikove zvrsti (RNS), reaktivne žveplove zvrsti (RSS) in reaktivni elektrofili.

ROS: - radikali: superoksid ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), peroksil (ROO^{\cdot}),

alkoksil (RO^{\cdot}), hidroperoksil (HOO^{\cdot}),

- ne-radikali: vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik (1O_2),

peroksinitrit ($ONOO^-$), hipoklorna kislina ($HOCl$).

RNS: - radikali: dušikov oksid (NO^{\cdot}), dušikov dioksid (NO_2^{\cdot}),

- ne-radikali: peroksinitrit ($ONOO^-$), dušikova(III) kislina (HNO_2), didušikov

trioksid (N_2O_3), didušikov tetraoksid (N_2O_4), nitrozil anion (NO^-),

nitrozil kation (NO^+).

RSS: - radikali: sulfhidril (RS^{\cdot}), sulfinil (RSO^{\cdot}), sulfonil (RSO_2^{\cdot}), sulfonil peroksil

(RSO_2OO^{\cdot}),

- ne-radikali: vodikov sulfid (H_2S), sulfenska kislina ($RSOH$), sulfonska kislina

(RSO_3H).

Reaktivni elektrofili: karbokation, nitrenijev ion, epoksid, kinon metid, o-kinon,

α,β - nenasičen keton/aldehid (3,7).

Kljub temu da reaktivne zvrsti smatramo kot škodljive in povzročitelje celičnih poškodb, imajo nepogrešljivo vlogo v mnogih biokemičnih procesih kot je npr. medcelično redoks

signaliziranje. $\cdot\text{NO}$ je zelo pomembna signalna molekula in kot primarni prenašalec deluje vazodilatorno na kardiovaskularni sistem, njegovi učinki so antitrombotični. Na nizke koncentracije reaktivnih zvrsti (npr. H_2O_2) se celice odzovejo z razmnoževanjem. Prav tako regulirajo ekspresijo določenih genov preko aktivacije transkripcijskih dejavnikov. Nekateri proteini so lahko direktno pod redoks kontrolo npr. nekateri ionski kanali, p53 in encim akonitaza. ROS so kot signalni intermediati odgovorni za sintezo nekaterih citokinov (npr. $\text{TNF}\alpha$, IL-1) (5).

Pri vdoru patogenov v telo aktivirani fagociti kot del obrambe imunskega sistema namenoma tvorijo večje količine reaktivnih zvrsti (predvsem $\text{O}_2^{\cdot-}$, HOCl, H_2O_2), da na ta način povzročijo poškodbe na patogenu in jih na ta način uničijo. Oksidativni stres je zato neizogiben spremljevalec vnetnega procesa. Zmerne količine $\text{O}_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 , ki pri tem uhajajo iz mitohondrijev, lahko aktivirajo signalne poti v celici, ki omogočijo preživetje in prilagoditev s povečano odpornostjo v primeru bolezni, ob večjih koncentracijah pa sprožijo apoptozo celic pri znatnih oksidativnih poškodbah (5).

1.3 URAVNAVANJE OKSIDATIVNEGA STRESA, ANTIOKSIDANTI

1.3.1 ANTIOKSIDATIVNI SISTEM

Kljub temu da v našem telesu radikali stalno nastajajo, je naš organizem v omejenem obsegu sposoben preprečiti njihovo škodljivo delovanje. Mehanizmi, ki ščitijo celico pred poškodbami z reaktivnimi zvrstmi (antioksidativna mreža, popravljalni mehanizmi) imajo omejeno kapaciteto in so energetsko zelo potratni, kadar so aktivirani daljši čas. V celicah so stalno prisotni antioksidanti, ki inhibirajo propagacijsko fazo radikalnih reakcij in encimski antioksidanti (SOD, katalaza), ki nastale reaktivne zvrsti odstranjujejo. Ker pa vsi ti sistemi ne morejo odstraniti vseh radikalov, le ti povzročajo poškodbe, za katere obstajajo popravljalni mehanizmi (1,5).

V oksidativni obrambni sistem torej prištevamo vse molekule in spojine, ki imajo možnost nevtraliziranja radikalov, preprečevanja njihovega nastanka ali pa katalitične odstranitve. Antioksidanti so na osnovi redoks potenciala povezani v antioksidativno mrežo, kjer se lahko določen antioksidant regenerira z drugim antioksidantom z nižjim redoks potencialom, pri čemer se troši energija. Prednost antioksidativne mreže je v tem, da če določenega antioksidanta za regeneracijo antioksidanta z višjim redoks potencialom zmanjka, mreža še vedno deluje, ker se ta antioksidant lahko nadomesti z drugimi (1,5).

1.3.2 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule. Antioksidanti delujejo tako, da odstranjujejo reaktivne zvrsti ali pa preprečijo njihov nastanek, samo delovanje pa ni odvisno od njihove koncentracije, lahko so nizke ali pa znatno visoke. So različnega izvora, različnih struktur in velikosti molekul z različnimi fizikalnimi in kemičnimi lastnostmi (7).

Glede na izvor antioksidante delimo na endogene, ki so telesu lastni (encimski sistem SOD, katalaza) in eksogene, ki jih v telo vnašamo s hrano in so telesu nujno potrebni (vitamini C, E, A). Po kemijski strukturi se delijo na encimske in ne-encimske (GSH, tioredoksin), glede na topnost pa na hidrofilne, ki delujejo v vodnem okolju in lipofilne, ki delujejo predvsem v celičnih membranah (1,4).

Encimske antioksidante delimo na primarne in sekundarne. Med primarne encimske antioksidante sodijo superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) in glutation peroksidaza (GPx), ki preprečijo ali nevtralizirajo radikale. Med sekundarne encimske antioksidante pa spada glutation reduktaza in glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, ki ne sodelujeta pri nevtralizaciji radikalov neposredno, ampak nastopata kot pomoč drugim endogenim antioksidantom. Ne-encimske antioksidante lahko razdelimo na vitamine in njihove derivate (vitamin A: retinol, vitamin C: askorbinska kislina, vitamin E: tokoferoli in tokotrienoli, in vitamin K), karotenoide (β -karoten, likopen, lutein), dušikove neproteinske spojine (sečna kislina), encimske kofaktorje (koencim Q10), minerale (cink, selen), flavonoide, peptide (glutation) in fenolne kisline. Antioksidanti so med seboj odvisni in delujejo usklajeno, zato je pomembno, da so prisotni povsod in so vedno na voljo. Določeni antioksidanti imajo možnost regeneracije, drugi pa se trošijo in so neobnovljivi (1,4).

Glede na mehanizem delovanja lahko antioksidante razdelimo v tri skupine. V prvo skupino spada večina antioksidantov in delujejo tako, da se žrtvujejo v radikalski reakciji in reagirajo s primarnim radikalom ter na ta način obvarujejo celične sestavine. Radikal, ki nastane na antioksidantu, je stabilnejši in navadno ne tvori novih radikalov. Oksidiran antioksidant se bodisi regenerira ali pa izloči iz organizma. Med take antioksidante sodijo vitamin C, vitamin E, ubikinol Q₁₀, betakaroten, bilirubin in drugi. V drugo skupino sodijo preventivni antioksidanti, ki preprečijo poškodbe z vezavo ionov prehodnih kovin

(predvsem železo in baker) in na ta način zmanjšajo njihovo razpoložljivost za vstop v reakcijo z vodikovim peroksidom, ki vodi do nastanka hidroksilnega radikala. V to skupino sodijo železo-vezajoči protein transferin in proteini, ki vežejo baker, kot sta ceruloplazmin in albumin. V tretjo skupino pa sodijo encimski antioksidanti (SOD, katalaza, peroksidaza,...), ki katalizirajo pretvorbo radikalov in drugih reaktivnih zvrsti v manj reaktivne produkte. Antioksidanti so torej spojine, ki lahko ponudijo vodikov atom, nudijo dvojno vez za adicijo radikala ali pa kompleksirajo ione prehodnih kovin ter tako preprečijo prenos elektronov (2,7).

Antioksidanti ne ločijo med reaktivnimi zvrstmi, ki so fiziološko koristne in tistimi, ki povzročajo oksidativne poškodbe biomolekul, zato pretirano zaviranje oksidativnega stresa ni zaželeno. Pri pretiranem padcu nivoja reaktivnih zvrsti je zmanjšana učinkovitost imunskega sistema, da se bori proti patogenim mikroorganizmom, ali pa je zavrt vnetni proces, ki je nujen za obrambo in odstranjevanje poškodovanih celic vključno z rakavimi celicami (5).

1.3.3 PRO-OKSIDATIVNI UČINEK ANTIOKSIDANTOV

Pri uživanju antioksidantov v obliki pripravkov ali prehranskih dopolnil se moramo zavedati, da so antioksidanti učinkoviti samo na samem začetku radikalско sproženih procesov, ko pa je do poškodb že prišlo, pa so le ti neučinkoviti. Pretiran vnos antioksidantov s prehranskimi dopolnili ima lahko pro-oksidativni učinek, ki je tako kot oksidativni stres škodljiv za telo. Vnos eksogenih antioksidantov v telo lahko zavre sintezo endogenih antioksidantov. Za uspešno delovanje pa morajo biti stalno na voljo vsi antioksidanti. Povečana koncentracija enega antioksidanta lahko preko kompenzatornih mehanizmov povzroči zmanjšanje koncentracije ostalih antioksidantov. Pri običajnih obremenitvah organizma je zato dovolj, če uživamo raznovrstno in mešano hrano bogato s sadjem in zelenjavo (5,7).

1.4 DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA

Merjenje oksidativnega stresa v organizmu je težko izvesti zaradi kratkoživosti in velike reaktivnosti radikalov. Primarno nastalih radikalov zato pogosto ne moremo določiti, določimo lahko le njihove stabilnejše presnovke. Poleg tega se stanje v človeku stalno spreminja, zato je vsaka določitev oksidativnega stresa le približna ocena trenutnega stanja.

Zaradi raznolikosti in spremenljivosti ROS, ki nastajajo med različnimi oksidacijskimi procesi, merjenje oksidativnega stresa ni enostavno (1).

Na voljo je kar nekaj metod za neposredno določanje posameznih ROS ali za posredno merjenje različnih produktov oksidacije, ki so bolj ali manj specifični za posamezne reaktivne zvrsti. Biomolekule so lahko poškodovane zaradi povečane tvorbe reaktivnih zvrsti, zmanjšanja nivoja antioksidantov in/ali sprememb v popravilu poškodb na biomolekulah. Ker nobeden od označevalcev ne more napovedati razvoja bolezni zaradi oksidativnega stresa, je priporočljivo uporabiti kombinacijo kvalitativnih in kvantitativnih metod, saj ima vsaka svoje prednosti in slabosti (5).

Najbolj uporabljeni metodi za oceno pro-oksidativnega statusa so:

- elektronska paramagnetna resonanca (EPR) za določanje dolgoživih radikalov in uporaba spinskih pasti, ki lovijo zelo reaktivne in kratkožive radikale,
- določanje sekundarnih produktov oksidacije lipidov (malondialdehid in drugi reaktivni elektrofili) s pomočjo tiobarbiturne kislina (test TBAR),
- določanje hidroperoksidov s pomočjo Fentonove reakcije in kromogena (*The Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) test*)
- določanje vsebnosti lipoperoksidov in izoprostanov kot produktov peroksidacije lipidov,
- kemiluminiscenca (z uporabo luminola, luciferina) za spremljanje sproščanja radikalov iz celic (npr. iz nevtrofilcev),
- določanje 8-OH-deoksigvanozina v urinu in drugih telesnih tekočinah kot kazalca oksidacije nukleinskih kislin (5).

Kot že omenjeno, je merjenje oksidativnega statusa precej zahtevno in je mnogo lažje v organizmu določiti antioksidativni status. Določamo predvsem encimske antioksidante, ki skrbijo za zaščito celic: SOD, CAT in od selena odvisna glutation peroksidaza, v plazmi pa so pomembnejši neencimski antioksidanti. Eden od pristopov je določitev posameznih antioksidantov (vitamin C, vitamin E). Vendar samo z meritvijo koncentracij posameznih antioksidantov lahko veliko antioksidantov izpustimo, ker obstaja več 100 različnih spojin z antioksidativnim delovanjem, med katerimi nekateri še sploh niso bili odkriti (5).

Uporabimo lahko tudi drug pristop, kjer se meri celokupno antioksidativno kapaciteto, pri čemer nas ne zanimajo posamezni antioksidanti ampak zmožnost posameznega vzorca, koliko radikalov lahko odstrani. Merimo hitrost oksidacije ali pa čas, ki je potreben za oksidacijo. Tudi tu prihaja do velikih razlik med posamezniki. Poleg tega, da je tak pristop dražji, tehnično zahtevnejši in časovno zamuden, tudi ne upošteva sinergističnega delovanja med antioksidanti, saj se le ti medsebojno dopolnjujejo in obnavljajo (5).

1.5 VREDNOTENJE ANTIOKSIDANTOV

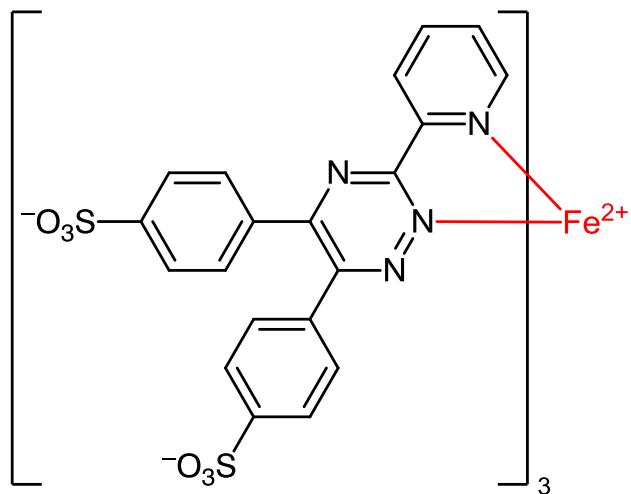
Na voljo je veliko različnih metod za določanje aktivnosti antioksidantov, vsaka od njih ima svojo specifično tarčo znotraj biološkega vzorca in vse imajo svoje prednosti ter slabosti. Antioksidanti so včasih sposobni delovati po več različnih mehanizmih, odvisno od reakcijskega sistema. Različni viri radikalov lahko sprožijo različne odzive enakega antioksidanta. To je tudi razlog, zakaj nobena od metod ne daje nedvoumnih rezultatov in je zato najboljše uporabiti več različnih metod hkrati. Nekateri od teh postopkov uporablajo sintetične antioksidante ali radikale, nekateri so specifični za lipidno peroksidacijo in potrebujejo živalske ali rastlinske celice, nekateri imajo širok obseg določanja, za nekatere je potrebna minimalna priprava in znanje, malo reagentov in hitro podajo rezultate (4).

Najpogostejše metode so test z uporabo 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonske kisline) (ABTS; ob prisotnosti antioksidanta pride do razbarvanja ABTS⁺ radikala), test lovljenja H₂O₂ (antioksidant inhibira reakcijo, ki jo katalizira hrenova peroksidaza), test z glutation peroksidazo, deoksiribozni test s tiobarbiturno kislino (določanje sposobnosti antioksidanta, da zaščiti 2-deoksiribozo pred razgradnjo s hidroksilnim radikalom), test razbarvanja difenilpikrilhidrazila (DPPH; antioksidant povzroči redukcijo vijolično obarvanega DPPH in zmanjšanje absorbance pri 516 nm), ferozinski test (sposobnost kelacije Fe²⁺ ionov), določanje sposobnosti antioksidantov za redukcijo Fe³⁺ (*Ferric Reducing Ability of Plasma – FRAP*), določanje sposobnosti antioksidatov za redukcijo Cu²⁺ (*CUPric Reducing Antioxidant Capacity – CUPRAC*) in mnoge druge (4).

1.5.1 FEROZINSKI TEST: DOLOČANJE SPOSOBNOSTI KELACIJE Fe²⁺

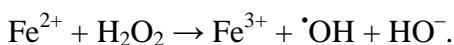
Ferozin lahko kvantitativno tvori kompleks s Fe²⁺, vendar ob prisotnosti spojine, ki je prav tako sposobna vezati železo, nastane manj kompleksa s ferozinom in s tem tudi manjše obarvanje. Sposobnost spojine, da kelira dvovalentno železo, določimo z merjenjem padca

absorbance pri 562 nm. Pri tej valovni dolžini ima vijolično obarvan kompleks med dvovalentnim železom in ferozinom maksimum absorbance. Zmanjšanje obarvanja in padec absorbance nam omogočata določitev sposobnosti kelacije Fe^{2+} testirane spojine pri različnih koncentracijah (8).



Slika 2: Struktura kompleksa med ferozinom in železom

Fe^{2+} je v telesu pomembno, ker zaradi sposobnosti oddaje elektrona lahko vstopa v Fentonovo reakcijo, v kateri se generira hidroksilni radikal. Pri Fentonovi reakciji pride do prenosa elektronov med H_2O_2 in Fe^{2+} , pri čemer se železo z oddajo elektrona oksidira, iz H_2O_2 pa nastaja $\cdot\text{OH}$:

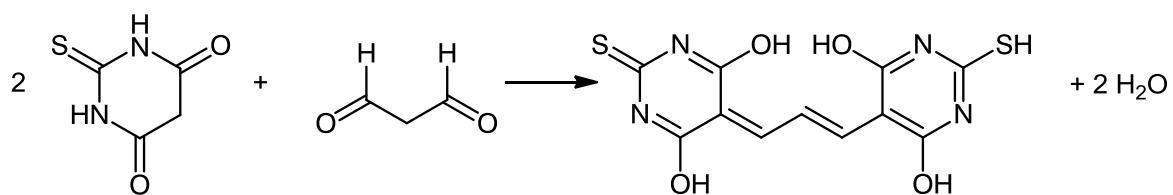


Podobna reakcija poteka tudi s Cu^+ , vendar je bakra v telesu 50-krat manj od železa. Železo in baker sta zaradi možnosti vstopa v Fentonovo reakcijo v telesu zato spravljena v depojih: vezana na proteinih, ki ju skladiščijo (feritin) in prenašajo (ceruloplazmin, transferin) ali v aktivnih mestih encimov ter proteinov (hemoglobin) (3).

Reakcijska mešanica za ferozinski test vsebuje spojino, ki jo želimo testirati, kalij – acetatni pufer s pH 5,5, FeCl_2 in ferozin. Najprej poteče 15 minutna inkubacija mešanice brez ferozina pri sobni temperaturi, da poteče reakcija med Fe^{2+} in testirano spojino. Po dodatku ferozina reakcijsko mešanico inkubiramo 60 min pri 37°C. Pri tej temperaturi reakcija med preostalim nevezanim železom in ferozinom najhitreje poteka (8,9).

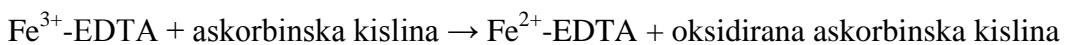
1.5.2 DEOKSIRIBOZNI TEST S TIOBARBITURNO KISLINO (TBA)

Z deoksiriboznim testom določimo sposobnost antioksidanta, da zaščiti 2-deoksiribozo (2-DR) pred razgradnjo s hidroksilnim radikalom. Metoda se pogosto uporablja, ker je poceni in nezahtevna, vendar kljub temu daje primerljive rezultate z elektronsko paramagneto resonanco. $\cdot\text{OH}$ povzroči razgradnjo 2-DR do malondialdehida (MDA) in njemu podobnih produktov, ki po segrevanju tvorijo rožnat kromogen ob prisotnosti tiobarbiturne kisline (TBA). Ti razgradnji produkti so zaradi reakcije s TBA poimenovani tudi TBA-reaktivne substance (TBARS) in jih lahko spektrofotometrično vrednotimo pri 532 nm. Absorbanca je sorazmerna količini nastalega $\cdot\text{OH}$ (10,11).



Slika 3: Nastanek obarvanega produkta v reakciji med TBA in MDA

Reakcijska mešanica vsebuje 2-DR, FeCl_2 , EDTA, H_2O_2 , fosfatni pufer s pH 7,4 in spojino, ki jo vrednotimo. Z dodatkom askorbinske kisline, ki deluje kot reducent, sprožimo potek reakcije nastanka $\cdot\text{OH}$ v Fentonovi reakciji. $\cdot\text{OH}$ napade 2-DR in sproži serijo reakcij, ki pripeljejo do nastanka MDA. Če je v reakcijski mešanici prisotna spojina (potencialni antioksidant), ki je sposobna reagirati s $\cdot\text{OH}$, tekmuje z 2-DR ter na ta način zmanjša razgradnjo 2-DR. Po eno-urni inkubaciji na 37°C sledi dodatek TBA in TCA k reakcijski mešanici in ponovna inkubacija na 90°C za 20 min. Zaradi razgradnje 2-DR in posledičnega nastanka MDA ter podobnih produktov, ki reagirajo s TBA, se razvije rožnato obarvanje. Ob prisotnosti spojine, ki z reakcijo s $\cdot\text{OH}$ zmanjša razgradnjo 2-DR, pride do manjšega obarvanja, ker nastane manj MDA, ki bi reagiral s TBA. Dodatek TCA ustavi reakcijo $\cdot\text{OH}$ z 2-DR.



Za vrednotenje lahko uporabimo le spojine, ki so topne v vodnem mediju. V primeru uporabe organskega topila nastali $\cdot\text{OH}$ hitro reagira z molekulami topila in rezultati takega testa niso uporabni (14).

Problem pri deoksiriboznem testu je, kako ustrezeno pripraviti slepi vzorec. Celotna količina TBA-reaktivnih substanc, ki jih na koncu izmerimo, je sestavljena iz TBARS specifične razgradnje 2-DR s $\cdot\text{OH}$, TBARS, ki so nastale zaradi toplotne razgradnje 2-DR med inkubacijo na 90°C in možne TBARS od razgradnje vrednotene spojine. Ker nas zanimajo le TBARS nastale pri specifični razgradnji 2-DR, smo nespecifično temperaturno razgradnjo 2-DR določili z odštetjem absorbance slepega vzorca SL2 (ne vsebuje 2-DR, antioksidanta, Fe^{3+} in H_2O_2) od absorbance slepega vzorca SL1 (ne vsebuje antioksidanta, Fe^{3+} in H_2O_2). Ker nekatere od merjenih spojin lahko ravno tako razpadajo in pri tem nastanejo TBARS ali pa absorbirajo svetlobo pri izbrani valovni dolžini, smo to določili z merjenjem slepega vzorca SL3 za vsako koncentracijo, ki je vseboval vse reagente in testirano spojino razen 2-DR. Absorbenco specifične razgradnje 2-DR smo določili z naslednjo formulo:

$$A_{vz} = A_{izmerjena} - A_{SL3} - (A_{SL1} - A_{SL2}) \quad (10).$$

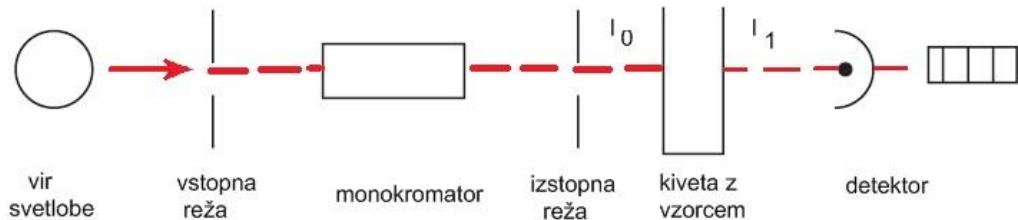
1.6 PRINCIP UV/VIS SPEKTROSKOPIJE

UV/Vis spektroskopija spada med spektralne tehnike, med katere uvrščamo tudi turbidimetrijo, nefelometrijo, atomsko spektroskopijo, plamensko fotometrijo, fluorimetrijo in refraktometrijo. Osnovna lastnost vseh spektralnih tehnik je interakcija svetlobe s snovjo, pri čemer se svetloba lahko absorbira, odbije, razprši ali se ponovno izseva pri drugi valovni dolžini (15).

Fotometrija je definirana kot meritev svetlobe, spektrofotometrija pa kot meritev intenzitete svetlobe določene valovne dolžine. Spektrofotometrične analize so široko uporabljeni metodi za kvantitativno in kvalitativno določanje koncentracij različnih organskih in anorganskih spojin v raztopinah. Izberi metode je odvisna od absorpcijskih lastnosti snovi ali njene derivata, ki ga analiziramo (16).

UV/Vis spektroskopija temelji na absorpciji UV in vidne svetlobe, torej v območju valovnih dolžin med 200 in 750 nm. Pri UV/Vis spektroskopiji svetlobo izbrane valovne dolžine pošljemo pravokotno na kiveto z vzorcem, kjer del svetlobe absorbira kromogena

snov, preostali del pa izstopi na drugi strani kivete in potuje do detektorja. Intenziteta prepuščene svetlobe (I_1), ki jo izmerimo na detektorju, je zato manjša od začetne intenzitete svetlobe (I_0) in je posledica absorpcijske aktivnosti snovi v raztopini. Večja kot je količina kromogene snovi v raztopini, manj svetlobe doseže detektor. S tem, ko snov absorbira energijo fotonov, preide v vzbujeno stanje, ki je nestabilno stanje z višjo energijo. Količina zahtevane energije fotona za nastanek določene spremembe je odvisna od narave vezi in je za vsako vez specifična. Energija vidne ali ultravijolične svetlobe povzroči prehod elektronov v višji energetski nivo. Ker je vzbujeno stanje nestabilno, se vezi poskušajo vrniti v osnovno, nevzbujeno stanje. Pri tem se predhodno absorbirana energija sprosti in lahko povzroči spremembo kinetične energije (gibanje), spremembo vibracijske energije ali oddajanje svetlobe pri fluorimetriji in plamenski fotometriji (15,16).



Slika 4: Shematski prikaz enožarkovnega spektrofotometra (prirejeno po (16))

Na detektorju merimo transmitanco (T) oz. odstotek transmitance ($\%T$), ki se izraža v toku (mA). Ker je odnos med transmitanco in koncentracijo snovi negativen in eksponenten, je smiselna transformacija transmitance v absorbanco (A) z matematično enačbo:

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

Odnos med absorbanco in koncentracijo snovi v raztopini je premosorazmeren. Odnos med koncentracijo kromogena v raztopini in absorbanco opisuje Beer-Lambertov zakon:

$$A = \epsilon \times c \times l$$

kjer je ϵ = molarni absorpcijski koeficient snovi [L/mol cm] in opisuje absorbanco raztopine s koncentracijo snovi 1 M in pri dolžini poti 1 cm ter je specifičen za naravo spojine, valovno dolžino svetlobe, topilo, pH raztopine,..., c = koncentracija snovi in l = dolžina optične poti. Z merjenjem absorbance raztopine z znano koncentracijo, lahko določimo ϵ , ki je za posamezno snov karakterističen in ga uporabljam za dokazovanje

identitete. Z uporabo Beer-Lambertovega zakona lahko iz izmerjene absorbance izračunamo koncentracijo analita v vzorcu (15).

Pri prehodu svetlobe skozi kiveto z vzorcem prihaja poleg absorpcije svetlobe tudi do odboja svetlobe od površine kivete, nekaj svetlobe pa lahko absorbirajo tudi voda, steklo in topilo. Tem vplivom se izognemo z meritvijo slepega vzorca, kjer merjeni analit nadomestimo z vodo. S tem določimo najvišji odstotek transmitance ($\%T = 100\%$). Z meritvijo prepuščene svetlobe pri črni kiveti pa dobimo najnižji odstotek transmitance ($\%T = 0\%$). Na ta način je spektrofotometer umerjen in ima določena oba konca skale. Meritev vzorca je zato neodvisna od spektrofotometra (15,16).

2 NAMEN DELA

Zaradi vse bolj stresnega življenja je na trgu vse večja potreba po novih, sinteznih antioksidantih, ki bi bili uporabni in vivo in/ali kot tehnični antioksidanti. V okviru magistrske naloge bomo ovrednotili antioksidacijske sposobnosti imid dioksimov z uporabo deoksiriboznega in ferozinskega testa.

Pri ferozinskem testu bomo določali sposobnost spojin, da kelirajo dvovalentno železo. Sposobnost kelacije Fe^{2+} je pomembna, zato ker Fe^{2+} lahko vstopa v Fentonovo reakcijo, v kateri reagira z vodikovim peroksidom, pri čemer nastane hidroksilni radikal, ki je najreaktivnejši izmed radikalov in lahko reagira z vsako organsko spojino v svoji okolici ter jo poškoduje. V testu spojina tekmuje s ferozinom za vezavo Fe^{2+} . Kompleks ferozina z železom daje vijolično obarvanje, ki ga spektrofotometrično izmerimo pri 562 nm. Močneje kot je spojina sposobna kelirati železo, manj se ga veže v kompleks s ferozinom in posledično je nižja absorbanca. Iz dobljenih vrednosti absorbanc bomo izdelali grafe in določili EC_{50} , ki je tista koncentracija spojine, ki kelira 50 % Fe^{2+} .

Z deoksiriboznim testom bomo ugotavljali, kako so izbrane spojine sposobne reagirati s hidroksilnim radikalom. Test temelji na določanju malondialdehida, ki nastane pri razgradnji deoksiriboze s hidroksilnim radikalom. Malondialdehid tvori vijolično obarvan produkt s tiobarbiturno kislino, ki ga lahko spektrofotometrično kvantificiramo. Spojinam bomo pri različnih koncentracijah določili, koliko so sposobne reagirati s hidroksilnim radikalom in na ta način preprečiti poškodbe deoksiriboze. Pričakujemo, da bo dodatek naše preiskovane spojine (antioksidanta) reakcijski zmesi zmanjšal poškodbe deoksiriboze, kar bo imelo za posledico manj intenzivno obarvanje. Iz dobljenih rezultatov bomo narisali graf in določili % inhibicije delovanja hidroksilnega radikala.

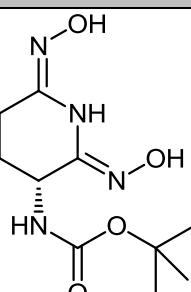
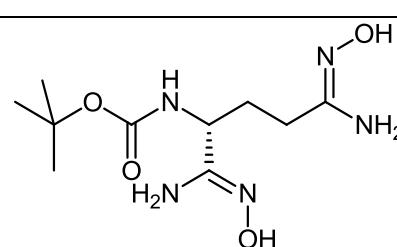
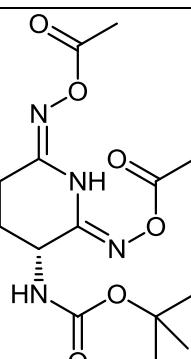
3 MATERIALI IN METODE

3.1 SPOSOBNOST TVORBE KOMPLEKSOV S KOVINSKIMI IONI (FEROZINSKI TEST)

3.1.1 VZORCI ZA FEROZINSKI TEST

Za določanje sposobnosti kelacije železa pri ferozinskem testu smo v magistrsko nalogu vključili 6 spojin, od katerih smo 1 spojino uporabili tudi za deoksiribozni test. Vzorce je sintetiziral doc. Žiga Jakopin na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Spojine so v trdnem agregatnem stanju, v obliki belih ali obarvanih praškastih kristalnih delcev.

Preglednica I: Prikaz spojin za ferozinski test

Oznaka	Struktura	Bruto formula	Mr (g/mol)
ZJ-70		C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₅	258,27
ZJ-70b		C ₁₀ H ₂₁ N ₅ O ₄	275,30
ZJ-72b		C ₁₄ H ₂₂ N ₄ O ₆	342,35

ZJ-76		C ₉ H ₁₆ N ₄ O ₄	244,25
ZJ-84		C ₅ H ₁₁ ClN ₄ O ₂	194,62
ZJ-168		C ₁₃ H ₂₃ N ₅ O ₅	329,35

3.1.2 UPORABLJENE APARATURE, LABORATORIJSKI PRIBOR IN REAGENTI

3.1.2.1 Uporabljene spojine, reagenti:

- FeCl₂, železov(II)-klorid tetrahidrat [FeCl₂×4H₂O], trdno agregatno stanje, MW: 198,81 g/mol, Sigma-Aldrich
- ferozin [3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-natrijeva sol disulfonske kisline], MW: 492,46 g/mol, Sigma-Aldrich
- kalij-acetatni pufer pH 5,5
- prečiščena voda
- MeOH, metanol, MW: 32,04 g/mol, Sigma-Aldrich

3.1.2.2 Uporabljene aparature:

- Analitska tehntica Classic Plus, Mettler Toledo
- Analitska tehntica AG 245, Mettler Toledo
- Čitalec mikrotitrskih plošč Synergy HT, Bioteč
- Ultrazvočna kadička Sonis 3, Iskra PIO

3.1.2.3 Uporabljen laboratorijski pribor:

- Laboratorijska steklovina različnih proizvajalcev
- 10 mL penicilinke s pokrovčki
- Enokanalna avtomatska pipeta 20-200 μL z nastavki, Eppendorf
- Enokanalna avtomatska pipeta 100-1000 μL z nastavki, BRAND Transferpette®
- Enokanalna avtomatska pipeta 0,5-5 mL z nastavki, BRAND Transferpette®
- Spatula
- Mikrotitrskie ploščice (96 vdolbinic), TPP

3.1.3 PRIPRAVA REAGENTOV

3.1.3.1 250 μM FeCl₂

Raztopino FeCl₂ smo dobili tako, da smo najprej pripravili osnovno 6 mM raztopino. 5,96 mg [FeCl₂×4H₂O] smo raztopili v 5 mL prečiščene vode.

Iz 6 mM raztopine FeCl₂ smo nato pripravili delovno raztopino 250 μM FeCl₂, tako da smo v penicilinko odmerili 4,6 mL prečiščene vode in ji dodali 200 μL osnovne 6 mM raztopine FeCl₂. S tem smo redčili v razmerju 24:1.

3.1.3.2 1 mM ferozin

Najprej smo pripravili 5 mL osnovne 5 mM raztopine ferozina. V penicilinko smo natehtali 12,31 mg ferozina in dodali 5 mL 500 mM kalij-acetatnega pufra s pH 5,5 ter vsebino v penicilinki dobro premešali.

Iz 5 mM raztopine ferozina smo nato pripravili 1 mM delovno raztopino, tako da smo v penicilinko odmerili 8 mL 500 mM kalij-acetatnega pufra s pH 5,5 in dodali 2 mL osnovne 5 mM raztopine ferozina. S tem smo raztopino redčili 5:1.

3.1.4 PRIPRAVA RAZTOPIN VZORCEV

Vzorce spojin smo pripravili tako, da smo na podlagi njihove molekulske mase pripravili 1 mM osnovne raztopine. Za topilo smo uporabili mešanico metanola in 500 mM kalij-acetatnega pufra s pH 5,5 v razmerju 1:1.

Iz 1 mM osnovnih raztopin smo nato pripravili naslednje raztopine z uporabo enake mešanice topila:

Preglednica II: Prikaz postopka priprave ustreznih raztopin

Pripravljena konc. vzorca (μM)	V (1 mM raztopine vzorca)	V (topila)	Končna konc. vzorca v reakcijski raztopini (μM)
1000	0,8 mL	0 mL	500
667	0,6 mL	0,3 mL	333,5
500	0,4 mL	0,4 mL	250
250	0,2 mL	0,6 mL	125
125	0,1 mL	0,7 mL	62,5
62,5	0,05 mL	0,75 mL	31,3
31,3	0,025 mL	0,775 mL	15,7

3.1.5 POSTOPEK DELA

Spojine smo analizirali na mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami. Absorbance smo pomerili z mikrotitrskim čitalcem Synergy HT, Bioteč. Za vsak vzorec, ki smo ga testirali, smo na osnovi molekulske mase najprej pripravili 1 mM raztopine, nato pa z redčenjem teh raztopin še šest različnih koncentracij: 667 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM in 31,3 μM kot je opisano v prejšnjem poglavju. Na eni mikrotitrski ploščici smo lahko testirali 3 različne vzorce, ki smo jih nanašali v 3 paralelkah. V vdolbinico smo nanesli po 150 μL ustrezne koncentracije vzorca in dodali 50 μL FeCl_2 ter vse skupaj inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. S tem smo dosegli, da je potekla reakcija med preiskovano spojino in dvovalentnim železom. Po 15 minutni inkubaciji smo dodali 100 μL ferozina ter mikrotitrsko ploščico inkubirali 1 uro na 37°C, da je potekla reakcija med ferozinom in preostalim dvovalentnim železom. V vsaki vdolbinici je bil končni skupni volumen 300 μL . Končne koncentracije vzorcev v reakcijski raztopini so bile zato dvakrat nižje: 500 μM , 333,5 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,3 μM in 15,7 μM .

Za vsako koncentracijo vzorca smo hkrati pomerili tudi slepi vzorec, ki je vseboval 150 μL ustrezne koncentracije vzorca in 50 μL FeCl_2 , ni pa vseboval ferozina. Ferozin smo nadomestili s 100 μL prečiščene vode.

Slepi vzorec reagenta je predstavljal 0 μM paralelko, saj je namesto vzorca vseboval 150 μL mešanice topila. Slepi vzorec reagenta smo ravno tako nanašali v vdolbinice mikrotitrsko ploščice v 3 paralelkah, za vsak vzorec enkrat.

Po končani 60 minutni inkubaciji na 37°C smo vzorcem izmerili absorbance pri 562 nm z mikrotitrskim čitalcem Synergy H4 Hybrid Reader, BioTek. S pomočjo mikrotitrskega čitalca dobimo rezultate absorbanc vseh vdolbinic mikrotitrsko ploščice naenkrat. Program GEN5 ima možnost direktnega prenosa izmerjenih rezultatov v program Microsoft Office Excel, v katerem smo podatke statistično obdelali ter jih prikazali tudi grafično.

	1	2	3 VZOREC 1	4	5	6	7 VZOREC 2	8	9	10	11 VZOREC 3	12
A	SLEPA REAGENTA				SLEPA REAGENTA					SLEPA REAGENTA		
B		15,7 µM				15,7 µM				15,7 µM		
C		31,3 µM				31,3 µM				31,3 µM		
D	VZOREC	62,5 µM			VZOREC	62,5 µM				62,5 µM		
E	VZOREC	125 µM			VZOREC	125 µM				125 µM		
F	SLEP	250 µM			SLEP	250 µM				250 µM		
G		333,5 µM				333,5 µM				333,5 µM		
H		500 µM				500 µM				500 µM		

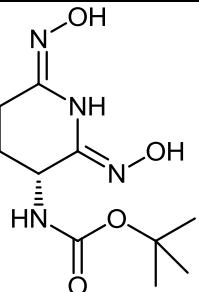
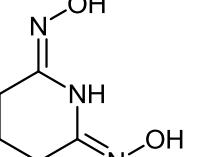
Slika 5: Prikaz nanašanja raztopin vzorcev v triplikatih, slepih vzorcev in slepih vzorcev reagenta na mikrotitrsko ploščico s skupnim končnim volumnom 300 µL

3.2 DEOKSIRIBOZNI TEST

3.2.1 VZORCI ZA DEOKSIRIBOZNI TEST

Za deoksiribozni test smo uporabili 3 spojine: ZJ-70, ZJ-176 in ZJ-167_1, od katerih je bila spojina ZJ-70 uporabljena tudi v ferozinskem testu. Spojine je sintetiziral doc. Žiga Jakopin na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Spojine so v trdnem agregatnem stanju, v obliki belih ali obarvanih praškastih kristalnih delcev.

Preglednica III: Prikaz spojin za deoksiribozni test

Oznaka	Struktura	Bruto formula	Mr (g/mol)
ZJ-70		C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₅	258,27
ZJ-176		C ₅ H ₉ N ₃ O ₂	143,14
ZJ-167_1		C ₄ H ₇ N ₃ O ₂	129,12

3.2.2 UPORABLJENE APARATURE, LABORATORIJSKI PRIBOR IN REAGENTI

3.2.2.1 Uporabljene spojine, reagenti:

- 2-deoksi-D-riboza, MW: 134,13 g/mol, Sigma-Aldrich
- FeCl₃, železov(III) klorid ali feriklorid, MW: 162,2 g/mol, Sigma-Aldrich
- 1 M HCl, pripravljena iz Hydrochloric acid fumig, 37%, Merck
- Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), MW: 372,24 g/mol, Acros Organics
- fosfatni pufer, pH 7,4
- NaOH, natrijev hidroksid, MW: 39,997 g/mol, Merck
- askorbinska kislina, MW: 176,12 g/mol, TCI
- 30 % H₂O₂, vodikov peroksid, MW: 34,01 g/mol, Merck
- Tiobarbiturna kislina (TBA), MW: 144,15 g/mol, Acros Organics
- Trikloroocetna kislina (TCA), MW: 163,40 g/mol, Kemika
- Bidestilirana voda

3.2.2.2 Uporabljene aparature:

- Analitska tehnica Classic Plus, Mettler Toledo
- Analitska tehnica AG 245, Mettler Toledo
- UV/VIS Spektrofotometer Cary 50 Conc, Varian
- Ultrazvočna kadička Sonis 3, Iskra PIO
- Vodna kopel Büchi Heating Bath B-490, Büchi
- Vortex Domel Vibromix 114, Tehnica
- Aparatura za pripravo bidestilirane vode Milli-Q Advantage A10, Millipore

3.2.2.3 Uporabljen laboratorijski pribor:

- Laboratorijska steklovina različnih proizvajalcev
- 1,5 mL plastične mikrocentrifugirke Eppendorf
- 10 mL penicilinke s pokrovčki
- Enokanalna avtomatska pipeta 20-200 µL z nastavki, Eppendorf
- Enokanalna avtomatska pipeta 100-1000 µL z nastavki, BRAND Transferpette®

- Enokanalna avtomatska pipeta 0,5-5 mL z nastavki, BRAND Transferpette®
- Spatula
- Plastične kivete 1,5 mL, semimikro BRAND Transferpette®
- Osebna zaščitna sredstva

3.2.3 PRIPRAVA REAGENTOV

3.2.3.1 33,6 mM raztopina 2-deoksiriboze

33,6 mM raztopino deoksiriboze smo pripravili tako, da smo natehtali 450,7 mg 2-deoksi-D-riboze v 100 mL destilirane vode. Raztopino deoksiriboze lahko pripravimo vnaprej in jo hranimo v hladilniku. Pred uporabo pustimo, da se raztopina segreje na sobno temperaturo.

3.2.3.2 Delovna raztopina 300 µM FeCl₃

Najprej smo pripravili osnovno raztopino 0,1 M FeCl₃/0,1 M HCl, ki je stabilna in jo lahko pripravljamo vnaprej. To smo naredili tako, da smo na analizni tehnici natehtali 1,622 g trdnega FeCl₃ in raztopili v 1 mL 1 M HCl. Pripravljeno raztopino smo nato razredčili v merilni bučki do skupnega volumna 10 mL z bdestilirano vodo ter dobro premešali.

Iz osnovne raztopine smo nato pred vsakim poskusom naredili delovno raztopino tako, da smo 30 µL 0,1 M FeCl₃/0,1 M HCl razredčili z bdestilirano vodo do skupnega volumna 10 mL.

3.2.3.3 1,2 mM EDTA

1,2 mM EDTA smo pripravili tako, da smo na analizni tehnici natehtali 3,51 mg dinatrijeve soli in nato natehtano dinatrijevo sol raztopili v 10 mL vode.

Raztopina je stabilna in smo jo zato pripravili vnaprej v večji količini, da smo jo imeli dovolj za vse poskuse.

3.2.3.4 50 mM NaOH

50 mM NaOH smo pripravili z redčitvijo 1 M NaOH z vodo. 2,5 mL 1 M NaOH smo z vodo dopolnili do skupnega volumna 50 mL. Ker je ta raztopina obstojna le 1 teden, moramo vsak teden pripraviti svežo.

3.2.3.5 1,2 mM raztopina askorbinske kisline

Raztopino askorbinske kisline je potrebno pripraviti vsak dan na novo. Na analitski tehtnici smo natehtali 1 mg askorbinske kisline in jo raztopili v 4,732 mL vode. Pri tehtanju smo morali uporabiti plastično žličko.

3.2.3.6 33,6 mM H₂O₂

33,6 mM H₂O₂ smo pripravili iz 30% H₂O₂, tako da smo 33,5 µL 30% vodikovega peroksida razredčili do skupnega volumna 10 mL v destilirani vodi (dodamo 9,965 mL vode). Raztopino vodikovega peroksida je potrebno pripravljati sproti.

3.2.3.7 Raztopina tiobarbiturne kisline (TBA) in trikloroacetne kisline (TCA)

Potrebna količina TBA in TCA je odvisna od števila mikrocentrifugirk z vzorci. V vsako mikrocentrifugirko je potrebno dodati 480 µL TBA in 480 µL TCA. Za 40 mikrocentrifugirk je potrebno približno 20 mL TBA in 20 mL TCA. TBA in TCA smo morali vsak dan pripraviti sveže.

Za 100 mg TBA je potrebno dodati 10 mL 50 mM NaOH. Približno maso TBA, ki smo jo potrebovali za 40 mikrocentrifugirk, smo izračunali iz sklepnega računa:

100 mg TBA..... 10 mL 50 mM NaOH

x mg TBA.....20 mL 50 mM NaOH

$$m(TBA) = 20 \text{ mL (NaOH)} \times 100 \text{ mg (TBA)} / 10 \text{ mL (NaOH)} = 200 \text{ mg}$$

Natehtali smo približno natančno 200 g TBA za 40 mikrocentrifugirk in nato iz natehtane mase izračunali natančno količino 50 mM NaOH, ki smo ga potrebovali. Da se je TBA raztopila v NaOH, jo je bilo potrebno sonicirati v ultrazvočni kadički.

TCA smo za razliko od TBA raztopili v bidestilirani vodi. Za 10 mL bidestilirane vode je potrebno 280 mg TCA. Za 20 mL je potrebno natehtati 560 mg TCA, kar smo izračunali iz sklepnega računa:

280 mg TCA.....10 mL bidestilirane vode

x mg TCA.....20 mL bidestilirane vode

$$m(TCA) = 20 \text{ mL (bidestilirana voda)} \times 280 \text{ mg (TCA)} / 10 \text{ mL} = 560 \text{ mg}$$

TCA se dobro razaplja v bidestilirani vodi, zato razapljanje s pomočjo ultrazvoka ni bilo potrebno.

3.2.4 PRIPRAVA VZORCEV

Vzorce smo pripravili tako, da smo na podlagi njihove molekulske mase približno natančno natehtali 1 mg vzorca v penicilinko ter jo nato raztopili v ustrezeni količini bidestilirane vode, da smo dobili želeno začetno koncentracijo. Pri ZJ-167 in ZJ-167_1 je bila ta koncentracija 1,25 mM in pri ZJ-70 1,75 mM. Penicilinke smo dobro premešali, da se je celotni vzorec raztoplil. Pomagali smo si tudi z ultrazvočno kadičko. Iz začetnih spojin smo naredili od 6-8 različnih raztopin z dodajanjem vode osnovni raztopini.

Pri spojni ZJ-176 smo si pri razapljanju pomagali z dodatkom 120 µL NaOH, pri spojni ZJ-167_1 smo dodali 80 µL NaOH, pri spojni ZJ-70 pa smo za razapljanje uporabili le bidestilirano vodo. Pri vseh treh spojinah pa smo si pomagali tudi s sonikacijo.

Poleg triplikatov različnih koncentracij vzorca, smo pripravili tudi njihove slepe vzorce (SL3). Ti so vsebovali ustrezeno koncentracijo vzorca in vse reagente razen deoksiriboze, ki smo jo v enakem volumnu nadomestili z vodo. Z merjenjem slepih vzorcev smo dobili absorbanco ozadja, ki smo ga nato odšteli od absorbanc vzorcev. Z vsakim testiranjem smo imeli tudi triplikat kontrolnega vzorca, v katerem je bila koncentracija testirane spojine 0 mM.

V mikrocentrifugirki s slepim vzorcem 1 (SL1) smo raztopine FeCl_3 , H_2O_2 , vzorca in askorbinske kisline nadomestili z enakim volumnom vode. V mikrocentrifugirki s slepim vzorcem 2 (SL2) pa poleg reagentov, ki jih ni v mikrocentrifugirki SL1, tudi ni deoksiriboze. Z odstetjem absorbance SL2 od absorbance SL1 smo dobili absorbanco deoksiriboze, ki predstavlja absorbanco same deoksiriboze in ga skupaj z absorbancami slepih vzorcev odstejemo od posameznih absorbanc vozrca.

Zaradi velikega števila mikrocentrifugirk in manjše možnosti napak smo si pred začetkom poskusa jasno označili vse mikrocentrifugirke z uporabo barvnih flomastrov (slika 4).



Slika 6: Primer priprave serije raztopin spojine ZJ-176 skupaj s slepimi vzorci

3.2.5 POSTOPEK DELA

Za deoksiribozni test smo najprej v penicilinki pripravili osnovno koncentracijo vzorca, ki je bila pri vzorcu ZJ-176 in ZJ-167_1 1,25 mM in pri vzorcu ZJ-70 1,75 mM. Iz teh koncentracij smo nato za vsak vzorec pripravili bolj razredčene raztopine, tako da smo dobili določen razpon koncentracij. Primeren razpon testnih koncentracije je odvisen od aktivnosti spojin, ki jo je potrebno najprej oceniti. Pri nizkih in visokih koncentracijah dobimo plato, zanima pa nas linearni del med obema platojem. Reakcijske mešanice smo pripravljali v 1,5 mL plastičnih mikrocentrifugirkah. Vzorca ZJ-176 in ZJ-167_1 smo hkrati testirali v 3 paralelkah, medtem ko smo za vzorec ZJ-70 naredili le 1 paralelko zaradi majhne količine vzorca. Za vsako spojino smo naredili tudi 0 mM triplikat, kjer smo namesto vzorca v mikrocentrifugirko dodali enak volumen vode.

Poskus smo začeli z dodatkom 40 µL fosfatnega pufra in 40 µL deoksiriboze v mikrocentrifugirke. Deoksiriboze nismo dodali v slepe vzorce SL3 za vsako koncentracijo in v SL2. Raztopino deoksiriboze nadomestimo v slepih vzorcih z enakim volumnom vode. Vsebino v mikrocentrifugirkah smo nato premešali na vorteksu.

V mikrocentrifugirke smo dodali 40 µL H₂O₂ in vsebino ponovno premešali na vorteksu. V mikrocentrifugirkah SL1 in SL2 smo H₂O₂ nadomestili smo z enakim volumnom vode.

Nato smo v vse mikrocentrifugirke dodali 40 µL EDTA in v vse mikrocentrifugirke razen SL1 in SL2 40 µL FeCl₃. V SL1 in SL2 smo namesto FeCl₃ dodali enak volumen vode. Po dodatku EDTA in FeCl₃ smo počakali nekaj minut in nato vsebino ponovno premešali na vorteksu.

V vsako mikrocentrifugirko smo nato dodali 300 µL ustrezne koncentracije vzorca. V tripletu, kjer je koncentracija 0 mM ter v mikrocentrifugirki SL1 in SL2, smo namesto vzorca dodali 300 µL vode. Vsebino v mikrocentrifugirkah smo ponovno premešali na vorteksu, da so se vsi dodani reagenti dobro premešali. Vzorce smo nato inkubirali 1 uro v vodni kopeli Buchi Heating Bath B-490, ki smo jo predhodno ogreli na 37°C.

Po inkubaciji smo mikrocentrifugirke ohladili ter vsebino premešali na vorteksu. V vsako mikrocentrifugirko smo nato dodali 480 µL TBA in 480 µL TCA ter vsebino premešali na vorteksu. Pomembno je, da TBA in TCA dodamo v tem vrstnem redu. Vzorce v mikrocentrifugirkah smo nato inkubirali točno 20 min v vodni kopeli pri 90°C. Pri tem smo pazili, da se mikrocentrifugirke niso odpirale.

Po 20 minutah smo mikrocentrifugirke vzeli iz vodne kopeli ter jih pustili ohlajati približno 20 minut. Vsebino smo ponovno premešali na vorteksu.

Vzorcem smo nato izmerili absorbanco pri 532 nm s pomočjo UV/VIS spektrofotometra: vzorce smo iz mikrocentrifugirk s pomočjo pipete prenesli v kivete.. Najprej smo pomerili absorbanci vzorcev SL1 in SL2, nato pa absorbance ostalih vzorcev od najmanjše proti največji koncentraciji. Da bi dobili čim bolj relevantne rezultate smo za vsako meritev uporabili novo kiveto.

Rezultate meritev smo nato prenesli v tabelo programa Microsoft Excel, kjer smo jih statistično in grafično obdelali.

3.3 METODA DOLOČANJA: UV/VIS SPEKTROSKOPIJA

3.3.1 ČITALEC MIKROTITRSKIH PLOŠČ SYNERGYTM HT, BIOTEK

Synergy HT je čitalec mikrotitrskih plošč (slika 5), ki omogoča merjenje absorbance, fluorescence in luminiscence. Izkorišča 2 neodvisna optična sistema in tako omogoča uporabo filtrov za merjenje fluorescence in monokromatorjev za merjenje absorbance. Upravljanje je računalniško z računalniškim programom Gen5TM za vse operacije vključno z analizo podatkov. Za merjenje absorbance se uporablja ksenonska žarnica kot vir svetlobe in monokromator za izbiro želene valovne dolžine. Uporaba ksenonske žarnice omogoča meritev pri UV in vidni svetlobi. Monokromator omogoča izbiro valovnih dolžin od 200 do 999 nm z 1-nm resolucijo. Čitalec sprejme vse modele plošč od 6 do 384 vdolbinic in omogoča nadzor temperature do 50°C. Notranja plošča omogoča tudi avtomatsko tresenje plošče (17,18).



Slika 7: Čitalec mikrotitrskih plošč SynergyTM HT proizvajalca Biotek s katerim smo izmerili absorbance spojinam pri ferozinskem testu

3.3.2 UV/VIS SPEKTROFOTOMETER CARY 50 CONC, VARIAN

Za merjenje absorbance vzorcev pri deoksiriboznem testu smo uporabili UV/VIS spektrofotometer Cary 50 Conc (slika 6). Spektrofotometer se od tradicionalnih razlikuje po tem, da kot vir sevanja uporablja ksenonsko žarnico, ki sveti le pri pridobivanju podatkov. To zmanjša razgradnjo vzorcev, ki so občutljivi na svetlobo, ker je manjša izpostavitev vzorca celotnemu območju valovnih dolžin. Ksenonska žarnica je neobčutljiva na sobno svetlobo, zato lahko vzorce merimo pri odprtih loputih vendar le z uporabo varnostnih očal. S tem spektrofotometrom lahko merimo v območju od 190 do 1100 nm valovne dolžine. S spektrofotometrom upravljam s pomočjo računalniškega programa WinUV (19,20).



Slika 8: UV/VIS spektrofotometer Cary 50 Conc proizvajalca Varian, s katerim smo izmerili absorbance spojinam pri deoksiriboznem testu

3.4 OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program Microsoft Excel 2007. Obdelane rezultate smo pri ferozinskem in deoksiriboznem testu prikazali tudi grafično.

Pri ferozinskem testu smo iz dobljenih absorbanc triplikatov za posamezno koncentracijo vzorca izračunali povprečne vrednosti (A_{avg}) ter jim nato odšteli vrednost absorbanc slepih vzorcev za pripadajočo koncentracijo (A_{SL}). Dobljene vrednosti absorbanc smo nato prikazali z grafom odvisnosti absorbance od koncentracije. S pomočjo linearne regresije smo za vsako spojino dobili umeritveno premico, koeficient determinacije in standardno napako (SN). Standardno napako smo izračunali s pomočjo statistične funkcije STEYX v programu Excel.

Iz umeritvene premice smo nato za vsako spojino izračunali EC50, ki je koncentracija spojine, ki kelira 50% Fe^{2+} . To je vrednost, ki ustreza koncentraciji spojine pri 50% absorbance slepega vzorca reagenta. Vrednost smo podali skupaj s standardno napako.

Pri deoksiriboznem testu smo posameznim vrednostim absorbanc najprej odšteli absorbanco ozadja ($A_{SL3} + (A_{SL1}-A_{SL2})$) ter nato iz njih izračunali povprečne vrednosti ter standardno deviacijo. Absorbancam smo izračunali njihove recipročne vrednosti in izrisali grafe odvisnosti $1/A$ od koncentracije. Izdelali smo tudi graf % inhibicije v odvisnosti od koncentracije, s katerim smo prikazali, v kolikšni meri spojina zaščiti 2-DR pred razgradnjou s hidroksilnim radikalom.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

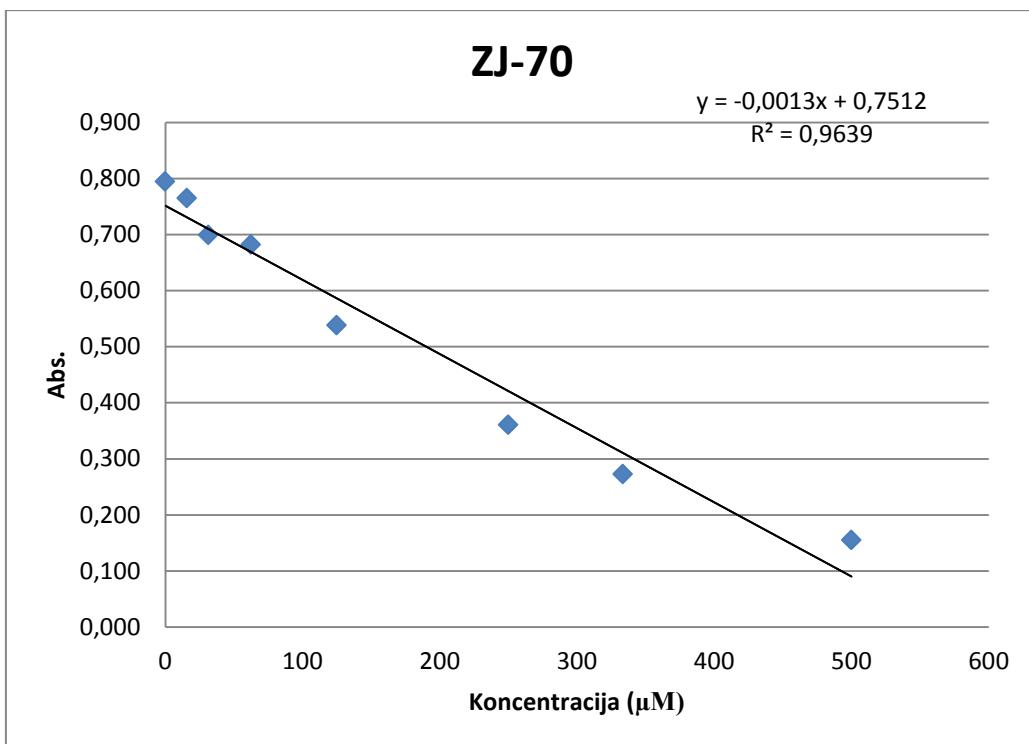
4.1 REZULTATI FEROZINSKEGA TESTA

Sposobnost kelacije dvovalentnega železa smo določali pri 6 spojinah. Za vsako spojino smo opravili meritev pri sedmih koncentracijah, za vsako koncentracijo pa smo izmerili tudi slepi vzorec, ki ni vseboval testirane spojine. Za vsako spojino smo izdelali graf in iz njega umeritveno premico. Spojinam smo s pomočjo vrednosti EC₅₀ določili, kako dobro kelirajo železo. EC₅₀ je tista koncentracija spojine, ki kelira 50 % Fe²⁺. EC₅₀ smo podali skupaj s standardno napako (SN), ki smo jo izračunali s pomočjo statistične funkcije STEYX v programu Excel.

4.1.1 SPOJINA ZJ-70

Preglednica IV: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-70 pri različnih koncentracijah

ZJ-70	konc. (µM)	A _{SL}	A ₁	A ₂	A ₃	A _{avg}	A _{avg} -A _{SL}
slepa reagenta	0	0,045	0,827	0,844	0,047	0,839	0,794
1.	15,7	0,043	0,825	0,764	0,835	0,808	0,765
2.	31,3	0,058	0,801	0,740	0,731	0,757	0,699
3.	62,5	0,055	0,741	0,738	0,732	0,737	0,682
4.	125	0,077	0,614	0,613	0,618	0,615	0,538
5.	250	0,073	0,424	0,425	0,451	0,433	0,360
6.	333,5	0,066	0,356	0,365	0,295	0,339	0,273
7.	500	0,066	0,225	0,213	0,225	0,221	0,155



Slika 9: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-70

Vrednost EC_{50} za spojino ZJ-70 smo izračunali s pomočjo enačbe premice $y = -0,0013x + 0,7512$:

$$y_{50} = \frac{1}{2} A_{SL} = \frac{1}{2} 0,794 = 0,397$$

$$x = \text{EC}_{50} = (y_{50} - 0,7512) / (-0,0013) = 272,33$$

$$\text{SN} = 0,05$$

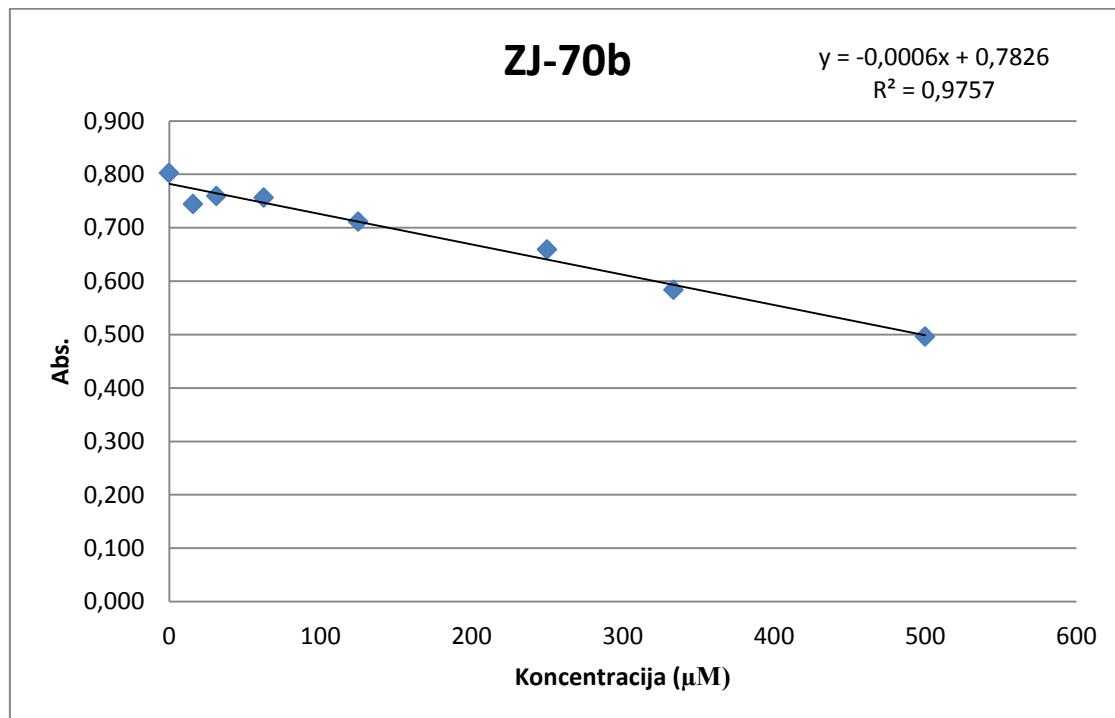
$$\underline{\text{EC}_{50} = 272,33 \pm 0,05 \mu\text{M}}$$

Spojina glede na graf (slika 7) in izračunano vrednost EC_{50} , ki je $272,33 \pm 0,05 \mu\text{M}$, zelo dobro kelira železove ione. Z večanjem koncentracije spojine se delež nekeliranih železovih ionov zmanjšuje, kar vidimo iz strmega padca absorbance na sliki 5. Med vsemi testiranimi spojinami, ZJ-70 kelira železove ione v največji meri. Ker se je spojina izkazala kot zelo dober kelator železovih ionov, smo se na podlagi teh rezultatov odločili, da jo testiramo tudi z deoksiriboznim testom.

4.1.2 SPOJINA ZJ-70b

Preglednica V: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-70b pri različnih koncentracijah

ZJ-70b	konz. (μM)	A_{SL}	A_1	A_2	A_3	A_{avg}	$A_{\text{avg}} - A_{\text{SL}}$
slepa reagenta	0	0,044	0,85	0,856	0,834	0,847	0,803
1.	15,7	0,038	0,746	0,775	0,826	0,782	0,744
2.	31,3	0,045	0,810	0,802	0,800	0,804	0,759
3.	62,5	0,044	0,815	0,796	0,790	0,800	0,756
4.	125	0,054	0,768	0,766	0,761	0,765	0,711
5.	250	0,054	0,715	0,712	0,712	0,713	0,659
6.	333,5	0,058	0,638	0,642	0,644	0,641	0,583
7.	500	0,064	0,558	0,504	0,618	0,560	0,496



Slika 10: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-70b

Vrednost EC₅₀ za spojino ZJ-70b smo izračunali s pomočjo enačbe premice $y = -0,0006x + 0,7826$:

$$y_{50} = \frac{1}{2} A_{SL} = \frac{1}{2} 0,803 = 0,4515$$

$$x = EC_{50} = (y_{50}-0,7826) / (-0,0006) = 635,44$$

$$SN = 0,02$$

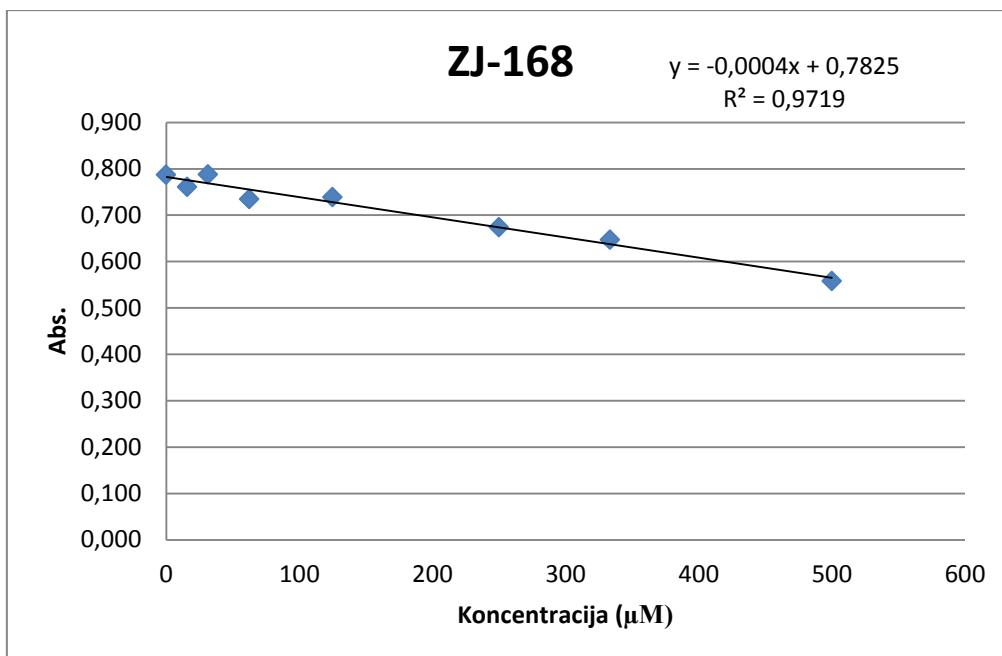
$$\underline{EC_{50} = 635,44 \pm 0,02 \mu M}$$

Spojina glede na graf (slika 8) in izračunano vrednost EC₅₀, ki je $635,44 \pm 0,02 \mu M$, kelira železove ione in je aktivna, vendar slabše od spojine ZJ-70. Iz slike 6 je razvidno, da absorbanca z večanjem koncentracije linearno pada, vendar počasneje kot pri spojini ZJ-70.

4.1.3 SPOJINA ZJ-168

Preglednica VI: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-168 pri različnih koncentracijah

ZJ-168	konz. (μM)	A _{SL}	A ₁	A ₂	A ₃	A _{avg}	A _{avg} -A _{SL}
slepa reagenta	0	0,043	0,844	0,855	0,790	0,830	0,787
1.	15,7	0,041	0,784	0,783	0,839	0,802	0,761
2.	31,3	0,042	0,837	0,813	0,838	0,829	0,787
3.	62,5	0,044	0,843	0,731	0,762	0,779	0,735
4.	125	0,046	0,778	0,794	0,781	0,784	0,738
5.	250	0,057	0,751	0,696	0,745	0,731	0,674
6.	333,5	0,058	0,704	0,739	0,672	0,705	0,647
7.	500	0,056	0,653	0,613	0,576	0,614	0,558



Slika 11: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-168

Vrednost EC_{50} za spojino ZJ-168 smo izračunali s pomočjo enačbe premice $y = -0,0004x + 0,7825$:

$$y_{50} = \frac{1}{2} A_{SL} = \frac{1}{2} 0,787 = 0,3935$$

$$x = \text{EC}_{50} = (y_{50} - 0,7825) / (-0,0004) = 972,92$$

$$\text{SN} = 0,01$$

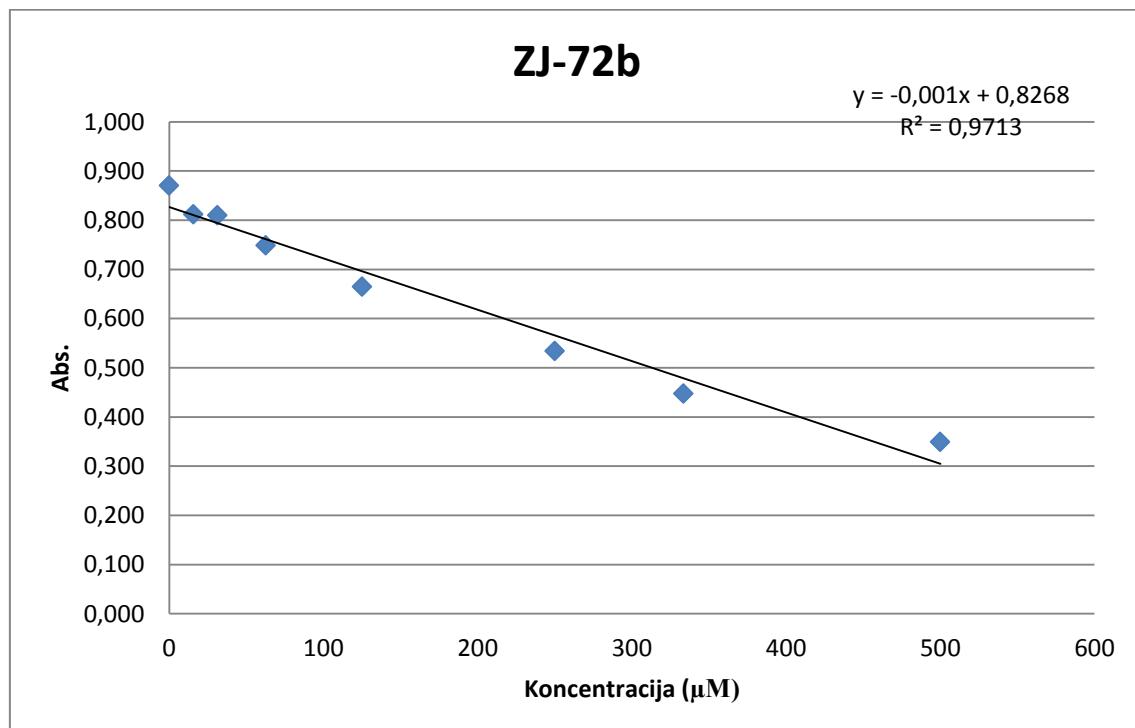
$$\underline{\text{EC}_{50} = 972,92 \pm 0,01 \mu\text{M}}$$

Spojina glede na sliko 9 in izračunano vrednost EC_{50} , ki je $972,92 \pm 0,01 \mu\text{M}$, kelira železove ione in je aktivna, vendar zelo slabo. Ima manjšo aktivnost od spojin ZJ-70 in ZJ-70b.

4.1.4 SPOJINA ZJ-72b

Preglednica VII: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-72b pri različnih koncentracijah

ZJ-72b	konz. (μM)	A_{SL}	A_1	A_2	A_3	A_{avg}	$A_{\text{avg}} - A_{\text{SL}}$
slepa reagenta	0	0,043	0,909	0,913	0,919	0,914	0,871
1.	15,7	0,061	0,871	0,876	0,873	0,873	0,812
2.	31,3	0,060	0,877	0,870	0,864	0,870	0,810
3.	62,5	0,050	0,800	0,804	0,792	0,799	0,749
4.	125	0,057	0,726	0,729	0,711	0,722	0,665
5.	250	0,047	0,585	0,585	0,573	0,581	0,534
6.	333,5	0,038	0,471	0,497	0,489	0,486	0,448
7.	500	0,037	0,279	0,372	0,409	0,387	0,350



Slika 12: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-72b

Vrednost EC₅₀ za spojino ZJ-72b smo izračunali s pomočjo enačbe premice y = -0,001x + 0,8268:

$$y_{50} = \frac{1}{2} A_{SL} = \frac{1}{2} 0,871 = 0,4355$$

$$x = EC_{50} = (y_{50}-0,8268) / (-0,001) = 391,47$$

$$SN = 0,03$$

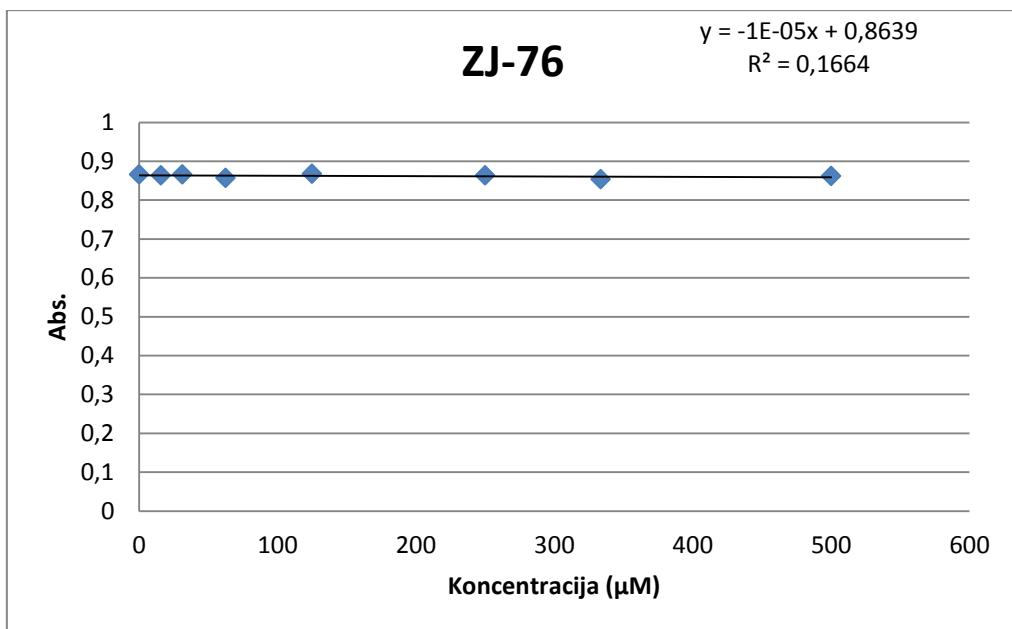
$$\underline{EC_{50} = 391,47 \pm 0,03 \mu M}$$

Spojina glede na sliko 10 in izračunano vrednost EC₅₀, ki je 391,47±0,03 μM, dobro kelira železove ione in je aktivna. Spojina ima slabšo aktivnost od spojine ZJ-70, vendar boljšo od ostalih testiranih spojin. Spojino bi lahko testirali z deoksiriboznim testom, vendar tega nismo mogli narediti zaradi majhne količine vzorca.

4.1.5 SPOJINA ZJ-76

Preglednica VIII: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-76 pri različnih koncentracijah

ZJ-76	konc. (μM)	A _{SL}	A ₁	A ₂	A ₃	A _{avg}	A _{avg} -A _{SL}
slepa reagenta	0	0,043	0,889	0,926	0,911	0,909	0,866
1.	15,7	0,036	0,890	0,909	0,900	0,900	0,864
2.	31,3	0,041	/	0,911	0,902	0,907	0,866
3.	62,5	0,037	/	0,894	0,893	0,894	0,857
4.	125	0,043	0,908	0,913	0,910	0,910	0,867
5.	250	0,037	0,876	0,910	0,916	0,901	0,864
6.	333,5	0,039	0,887	0,891	0,900	0,893	0,854
7.	500	0,038	0,903	0,901	0,894	0,899	0,861



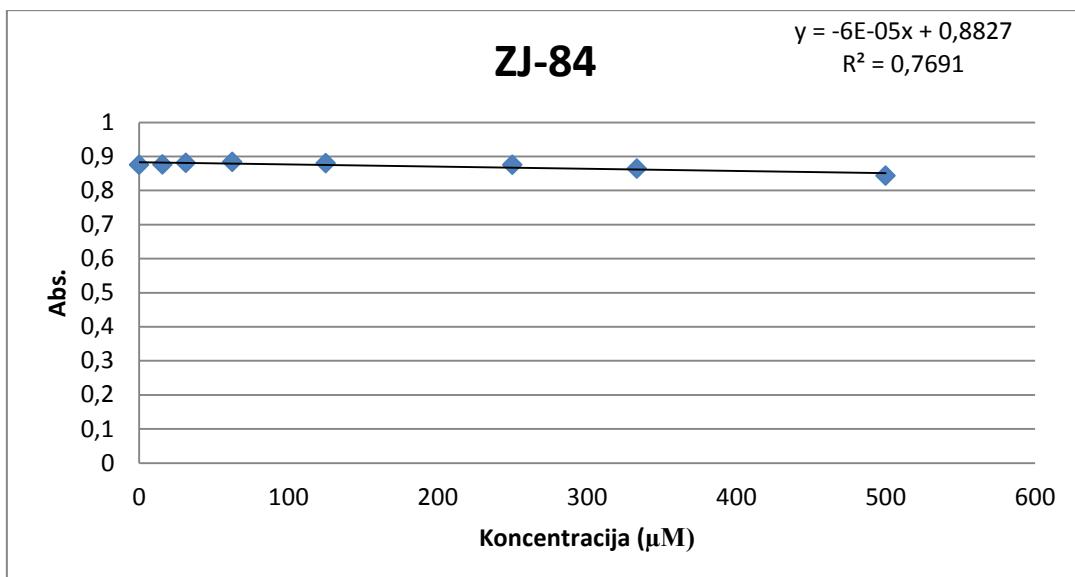
Slika 13: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-76

Iz slike 11 je razvidno, da spojina ZJ-76 ne kelira železovih ionov. Vrednost absorbance se z večanjem koncentracije spojine signifikantno ne spreminja. Ker ta spojina ni aktivna, tudi nismo izračunali vrednosti EC₅₀ ter standardne napake. Za koncentraciji 31,3 μM in 62,5 μM nimamo podatka za absorbanci A₁, ker smo v vdolbinico odmerili dvakratno količino železovega klorida in absorbanci pri izračunu povprečnih vrednosti nismo upoštevali.

4.1.6 SPOJINA ZJ-84

Preglednica IX: Izmerjene absorbance pri 562 nm za spojino ZJ-84 pri različnih koncentracijah

ZJ-84	konz. (μM)	A _{SL}	A ₁	A ₂	A ₃	A _{avg}	A _{avg} -A _{SL}
slepa reagenta	0	0,043	0,910	0,920	0,925	0,918	0,875
1.	15,7	0,039	0,915	0,917	0,912	0,915	0,876
2.	31,3	0,039	0,914	0,919	0,926	0,920	0,881
3.	62,5	0,043	0,933	0,918	0,929	0,927	0,884
4.	125	0,040	0,919	0,920	0,921	0,920	0,880
5.	250	0,047	0,924	0,926	0,917	0,922	0,875
6.	333,5	0,050	0,898	0,917	0,926	0,914	0,864
7.	500	0,046	0,890	0,891	0,887	0,889	0,843



Slika 14: Graf odvisnosti absorbance od koncentracije spojine ZJ-84

Kot pri spojini ZJ-76, je tudi pri spojini ZJ-84 iz slike 12 razvidno, da ni aktivna. Zaradi tega tudi ni bil mogoč izračun vrednosti EC₅₀ ter standardne napake.

4.2 REZULTATI DEOKSIRIBOZNEGA TESTA

Prvotno smo deoksiribozni test uporabili za določanje antioksidativne sposobnosti pri spojini ZJ-167_1 in ZJ-176, nato pa smo se na podlagi rezultatov ferozinskega testa odločili testirati še spojino ZJ-70. Absorbance raztopin smo pri spojinah ZJ-167_1 in ZJ-176 merili v triplikatih, pri spojini ZJ-70 pa smo zaradi omejene količine vzorca naredili le po eno meritev za vsako koncentracijo. Za vsako koncentracijo smo izmerili tudi slepi vzorec A_{SL3} , ki je vseboval vse reagente in merjeno spojino, ni pa vseboval 2-DR. Ker lahko TBARS nastanejo tudi pri toplotni razgradnji 2-DR, smo le te določili z meritvijo slepega vzorca SL1 (ne vsebuje antioksidanta, Fe^{3+} in H_2O_2), od katerega smo nato odšteli absorbanco slepega vzorca SL2 (ne vsebuje 2-DR, antioksidanta, Fe^{3+} in H_2O_2). Na ta način smo dobili absorbanco, ki jo daje sama 2-DR oz. njeni razgradnji produkti. S seštetjem posameznih absorbanc slepih vzorcev SL3 in absorbance 2-DR dobimo ozadje, ki ga odstajemo od povprečnih vrednosti absorbanc vzorcev. Absorbanco specifične razgradnje 2-DR smo tako določili z naslednjo formulo:

$$A_{vz} = A_{izmerjena} - A_{SL3} - (A_{SL1} - A_{SL2}).$$

Poleg povprečnih vrednosti triplikatov, smo s pomočjo programa Excel izračunali tudi standardne deviacije. Pri spojini ZJ-70 zaradi le ene meritve pri posamezni koncentraciji nismo izračunali povprečnih vrednosti in prav tako nismo mogli določiti standardne deviacije.

Zaradi lažje interpretacije rezultatov smo na graf nanašali vrednosti $1/A$. Na ta način smo dobili graf, katerega vrednost $1/A$ se s koncentracijo povečuje.

Izdelali smo tudi graf % inhibicije poškodb 2-DR. Vrednosti, ki smo jih nanašali na y-os, smo dobili po naslednji formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_0 - A_{vzorec}) / A_0) \times 100 ,$$

kjer je A_0 povprečna vrednost absorbance vzorca s koncentracijo 0 (kontrolni vzorec), A_{vzorec} pa je povprečna vrednost absorbance vzorca določene koncentracije.

4.2.1 SPOJINA ZJ-167_1

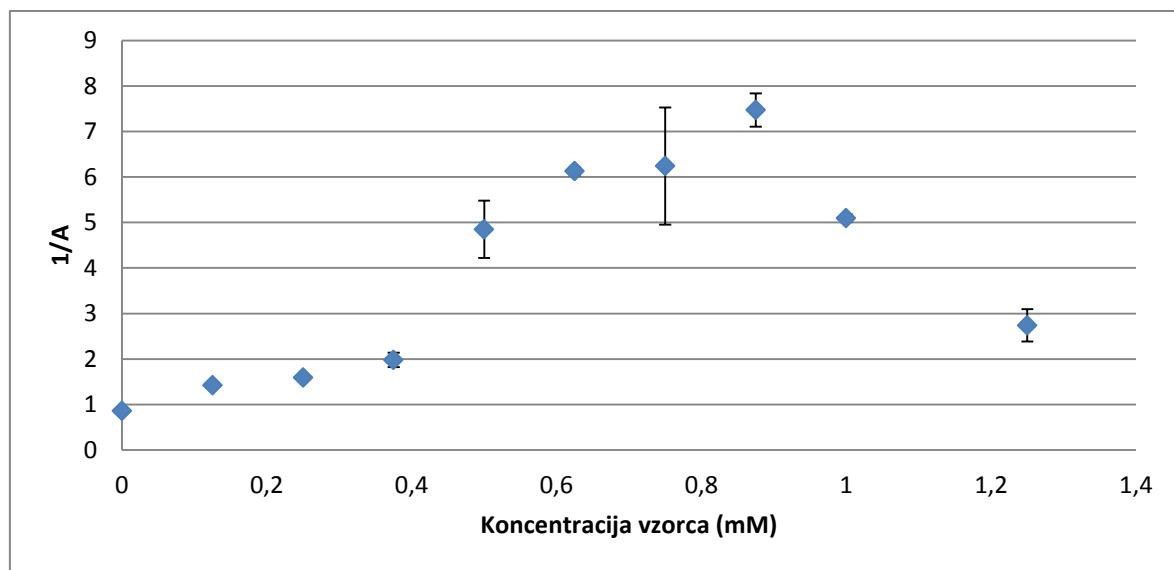
$$A_{SL1} = 0,1436$$

$$A_{SL2} = 0,1238$$

$$A_{SL1}-A_{SL2} = 0,0198$$

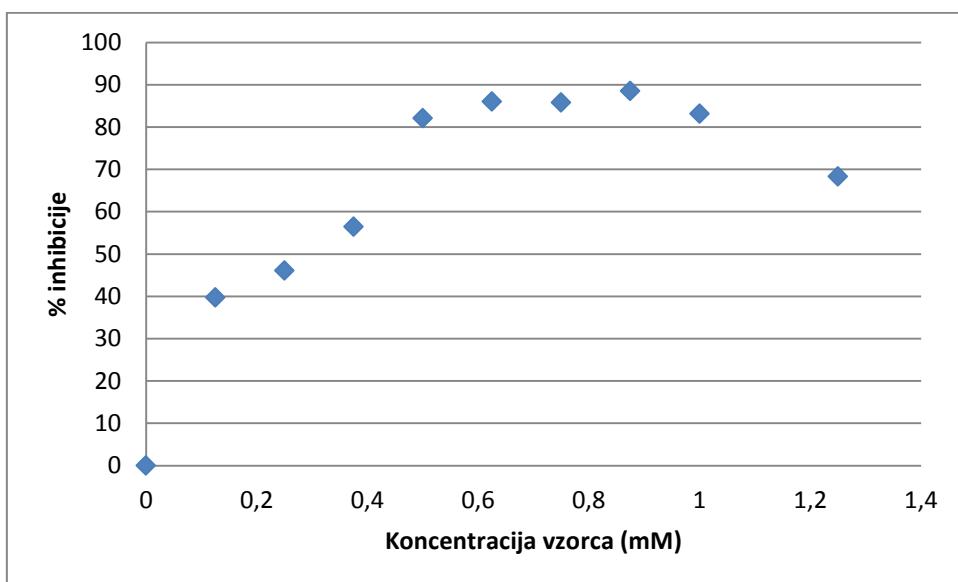
Preglednica X: Izmerjene vrednosti absorbanc za različne koncentracije spojine ZJ-167_1 ter izračuni povprečnih vrednosti, standardne deviacije in % inhibicije

Konc. (mM)	A _{SL3}	A _{SL3+(A_{SL1}- A_{SL2})}	A _{avg}	A _{stdev}	1/A _{avg}	1/A _{stdev}	% inhibicije
0	0,1299	0,1497	1,164733	0,008313	0,858595	0,006124	0
0,125	0,1325	0,1523	0,701733	0,017361	1,425617	0,034792	39,75159
0,25	0,1292	0,149	0,628467	0,014777	1,591764	0,037632	46,04201
0,375	0,1486	0,1684	0,507667	0,042583	1,978732	0,159864	56,41349
0,5	0,143	0,1628	0,208467	0,025545	4,848416	0,63079	82,10177
0,625	0,1325	0,1523	0,1632	0,002406	6,128338	0,090202	85,98821
0,75	0,1491	0,1689	0,165567	0,038565	6,239396	1,285552	85,78502
0,875	0,1432	0,163	0,134033	0,006389	7,472454	0,365776	88,49236
1	0,1281	0,1479	0,196233	0,003301	5,096936	0,085783	83,15208
1,25	0,1284	0,1482	0,3688	0,047146	2,741824	0,356787	68,3361



Slika 15: Graf odvisnosti 1/A od koncentracije vzorca ZJ-167_1

Pri deoksiriboznem testu nas zanima predvsem vmesni del med spodnjim platojem in vrhom krivulje. Iz slike 13 je razvidno, da se s povečevanjem koncentracije spojine ZJ-167_1, do neke točke vrednost $1/A$ povečuje, nato pa vrednost pade. Večanje vrednosti $1/A$ pomeni manjšanje poškodb 2-DR s hidroksilnim radikalom. Pri spojini ZJ-167_1 opazimo, da sega do koncentracije 0,4 mM spodnji plato, nato pa do koncentracije 0,875 mM krivulja s povečevanjem koncentracije narašča, nato pa ponovno upade. Z večanjem koncentracije spojine do 0,875 mM se razgradnja 2-DR zaradi hidroksilnega radikala zmanjšuje. Z nadaljnjam večanjem koncentracije pa opazimo padec krivulje, kar pomeni, da ima lahko spojina v preveliki koncentraciji pro-oksidativni učinek in ne deluje več kot antioksidant z zaščitno vlogo.



Slika 16: Graf % inhibicije poškodb 2-DR v odvisnosti od koncentracije spojine ZJ-167_1

Na sliki 14 opazimo, da se skladno s sliko 11 delež inhibicije poškodb 2-DR z večanjem koncentracije do 0,875 mM povečuje. Pri koncentraciji 0,875 mM spojina ZJ-167_1 uspe obvarovati 2-DR pred hidroksilnim radikalom v 88,5 %. Spojina je dober nevtralizator hidroksilnega radikala in bi lahko bila dober sintetični antioksidant v pravih koncentracijah.

4.2.2 SPOJINA ZJ-176

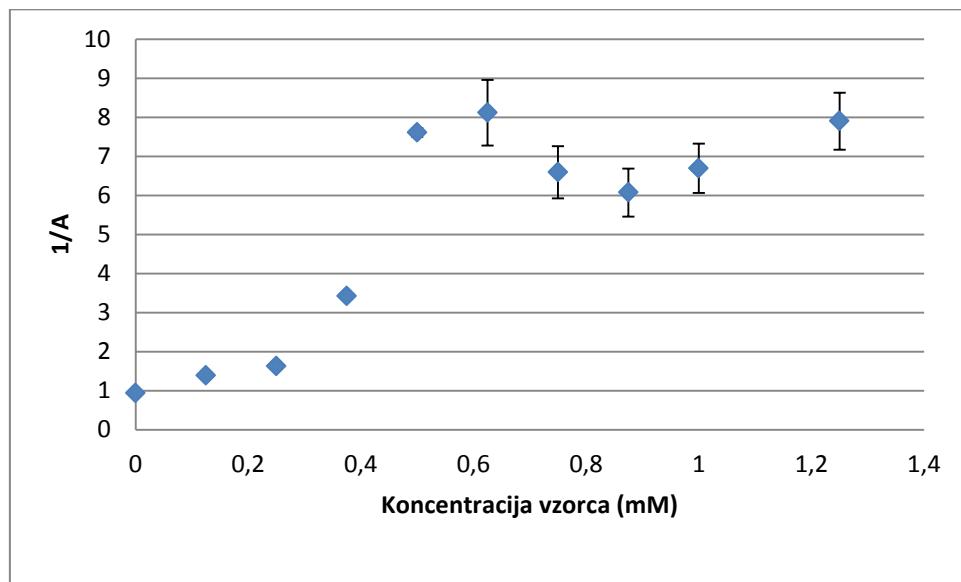
$$A_{SL1} = 0,1471$$

$$A_{SL2} = 0,1259$$

$$A_{SL1}-A_{SL2} = 0,0212$$

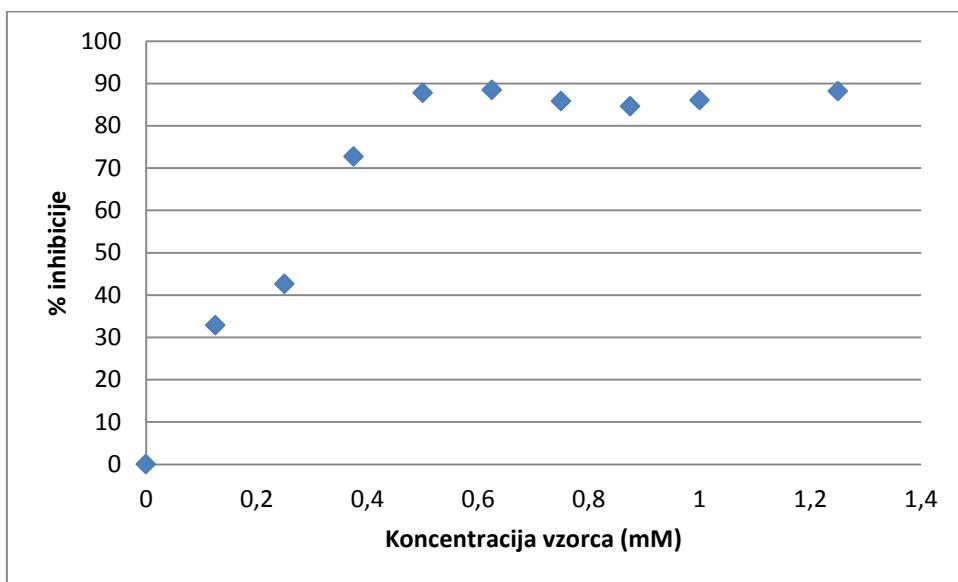
Preglednica XI: Izmerjene vrednosti absorbanc za različne koncentracije spojine ZJ-176 ter izračuni povprečnih vrednosti, standardne deviacije in % inhibicije

Konc. (mM)	A _{SL3}	A _{SL3+(A_{SL1}- A_{SL2})}	A _{avg}	A _{stdev}	1/A _{avg}	1/A _{stdev}	% inhibicije
0	0,1399	0,1611	1,072233	0,016784	0,932786	0,014697	0
0,125	0,1319	0,1531	0,720033	0,017447	1,389364	0,033378	32,84733
0,25	0,1255	0,1467	0,6154	0,008676	1,625176	0,023005	42,60578
0,375	0,1255	0,1467	0,2925	0,00394	3,419219	0,046312	72,72049
0,5	0,1243	0,1455	0,131433	0,002003	7,609597	0,115824	87,7421
0,625	0,1297	0,1509	0,124067	0,012331	8,11601	0,843152	88,42914
0,75	0,1258	0,147	0,152633	0,014689	6,594491	0,667974	85,76491
0,875	0,1245	0,1457	0,165767	0,016386	6,072949	0,613528	84,54006
1	0,125	0,1462	0,150267	0,013647	6,692957	0,630091	85,98564
1,25	0,1233	0,1445	0,1273	0,011701	7,899979	0,727518	88,12758



Slika 17: Graf odvisnosti 1/A od koncentracije vzorca ZJ-176

Pri spojini ZJ-176 opazimo spodnji plato do koncentracije 0,25 mM, nato začne krivulja naraščati (slika 15). Vrh doseže pri koncentraciji 0,625 mM. Spojina ZJ-176 svoj vrh doseže pri nižji koncentraciji kot spojina ZJ-167_1 in tudi hitreje lahko nastopijo prooksidativni učinki, ki pa niso tako izraziti kot pri spojini ZJ-167_1. Ima pa manjši razpon koncentracij, v katerih deluje zaščitno.



Slika 18: Graf % inhibicije poškodb 2-DR v odvisnosti od koncentracije spojine ZJ-176

Na grafu % inhibicije (slika 16) opazimo, da se delež poškodb 2-DR do koncentracije 0,5 mM zmanjšuje. Spojina ZJ-176 je sposobna preprečiti do 88,7% poškodb, ki nastanejo na 2-DR. Prooksidativno delovanje pri višjih koncentracijah ni tako očitno kot pri prejšnji spojini, zato lahko rečemo, da deluje antioksidativno že pri nižjih koncentracijah kot spojina ZJ-167_1.

4.2.3 SPOJINA ZJ-70

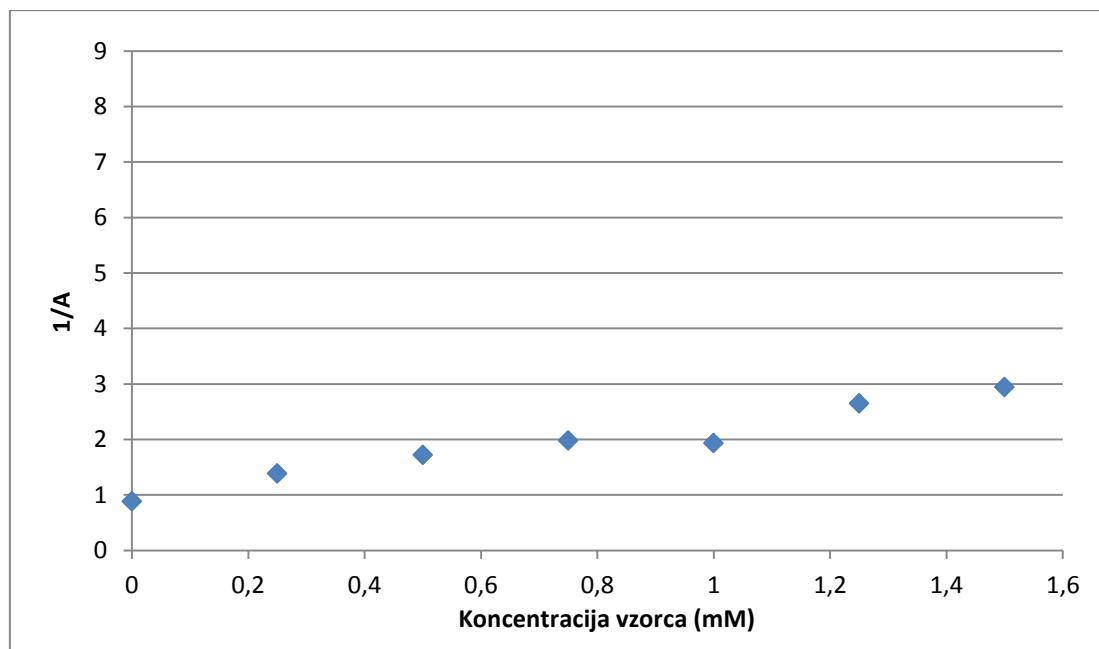
$$A_{SL1} = 0,1540$$

$$A_{SL2} = 0,1366$$

$$A_{SL1}-A_{SL2} = 0,0174$$

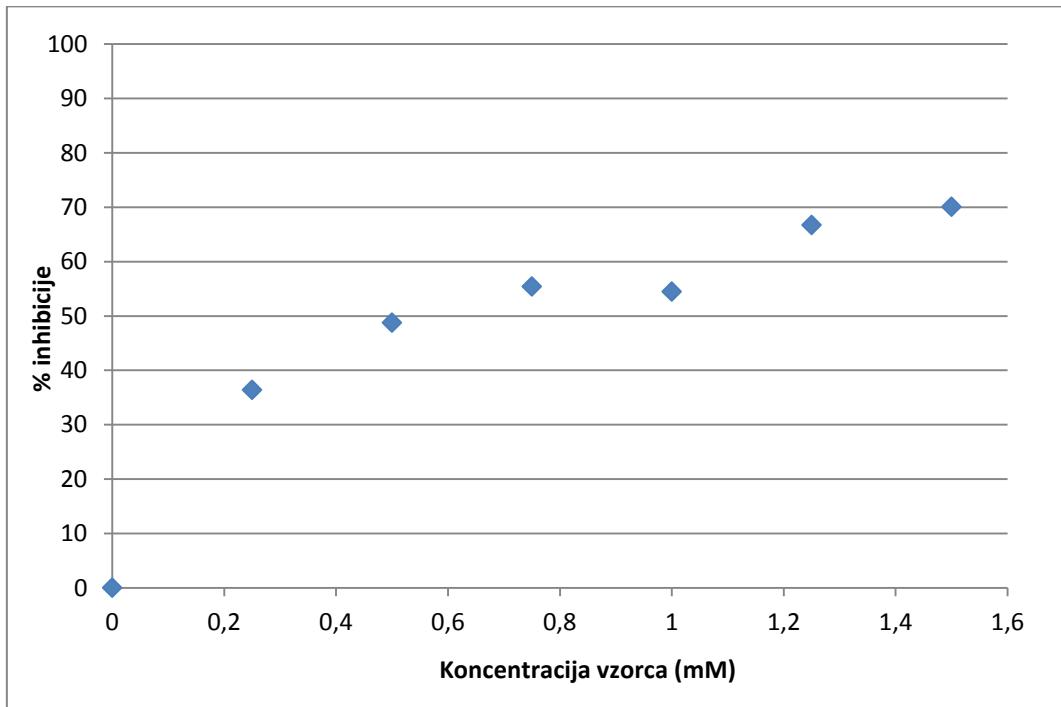
Preglednica XII: Izmerjene vrednosti absorbanc za različne koncentracije spojine ZJ-70 ter izračun % inhibicije

Konc. (mM)	A _{SL3}	A _{SL3+(A_{SL1}-A_{SL2})}	A	1/A	% inhibicije
0	0,1452	0,1626	1,1347	0,88129	0
0,25	0,1409	0,1583	0,7215	1,386001	36,41491143
0,5	0,1337	0,1511	0,5813	1,720282	48,77060016
0,75	0,1332	0,1506	0,5056	1,977848	55,44196704
1	0,1374	0,1548	0,5166	1,935734	54,47254781
1,25	0,1355	0,1529	0,3773	2,650411	66,74892042
1,5	0,1346	0,152	0,3395	2,945508	70,08019741



Slika 19: Graf odvisnosti 1/A od koncentracije vzorca ZJ-70

Pri spojini ZJ-70 (slika 17) nismo uspeli dobiti želene oblike krivulje, ki vsebuje spodnji plato, vmesni linearni del ter zgornji plato. Dobili smo le spodnji plato, kjer z večanjem koncentracije spojine krivulja sicer narašča, vendar ne dovolj, da bi dobili linearni del. Spojina je torej dober kelator dvovalentnih železovih ionov, vendar slab nevtralizator hidroksilnega radikala.



Slika 20: Graf % inhibicije poškodb 2-DR v odvisnosti od koncentracije spojine ZJ-70

Na sliki 18 sicer opazimo, da se z večanjem koncentracije spojine ZJ-70, delež poškodb 2-DR sicer zmanjšuje, vendar v bistveno nižjem odstotku kot pri spojinah ZJ-167_1 in ZJ-176.

4.3 RAZPRAVA

Povečana količina oksidativnega stresa zaradi porušenega razmerja med nastajanjem reaktivnih zvrsti in antioksidativno obrambo vodi do celičnih poškodb in začetek razvoja bolezenskega procesa. Zaščitni mehanizmi (antioksidanti, popravljalni mehanizmi) v našem telesu, ki v določenem obsegu preprečijo škodljivo delovanje radikalov, imajo omejeno kapaciteto in so energetsko potratni, kadar so aktivirani daljši čas. Zaradi tega razloga je na trgu vse večja potreba po sintetičnih antioksidantih, ki bi organizem uspešno branili pred neželenimi posledicami oksidativnega stresa.

V celicah so stalno prisotni antioksidanti, ki zavirajo propagacijsko fazo radikalnih reakcij in različni encimi (SOD, katalaza), ki odstranjujejo reaktivne zvrsti. Večina antioksidantov se žrtvuje v radikalni reakciji, kjer reagirajo s primarnim radikalom, tako da nastane stabilnejši radikal na antioksidantu, ki navadno ne tvori novih radikalov.

Pri uživanju antioksidantov v obliki prehranskih dodatkov ali posebnih pripravkov moramo vedeti, da so učinkoviti le na začetku radikalno sproženih procesov. Prav tako lahko pretiran vnos antioksidantov v telo povzroči antioksidativni stres, ki je ravno tako škodljiv za organizem. Pri sintetičnih antioksidantih je zato pomembno, da določimo območje koncentracij, v katerih delujejo zaščitno in koncentracije, pri katerih je opazen proksidativni učinek.

V okviru naše magistrske naloge smo ovrednotili antioksidacijske sposobnosti imid dioksimov s ferozinskim in deoksiriboznim testom. V magistrsko nalogu smo vključili 8 spojin – derivatov cikličnih pet- ali šestčlenskih imid dioksimov. Spojine so bile v trdnem agregatnem stanju, v obliki belih ali obarvanih praškastih kristalnih delcev. S ferozinskim testom smo testirali 6 spojin (ZJ-72b, ZJ-76, ZJ-84, ZJ-70, ZJ-70b in ZJ-168), z deoksiriboznim pa 3 spojine (ZJ-167_1, ZJ-176 in ZJ-70).

S ferozinskim testom smo določili, kako dobro so spojine sposobne kelirati dvovalentno železo. Za vsako spojino smo opravili meritev pri 7 koncentracijah ter po eno meritev slepega vzorca in slepega vzorca reagenta. Spojinam smo z mikrotitrskim čitalcem določili absorbance pri 562 nm, ki so obratno sorazmerne s sposobnostjo spojine, da kelira železo.

Pri ferozinskem testu so bile spojine ZJ-70, ZJ-70b, ZJ-168 in ZJ-72b aktivne, medtem ko spojini ZJ-76 in ZJ-84 nista kelirali železovih ionov in jima zato tudi nismo mogli določiti EC₅₀. Spojini ZJ-70 smo iz dobljenih rezultatov absorbanc izračunali EC₅₀ 272,33 ± 0,05 µM, spojini ZJ-70b 635,44 ± 0,02 µM, ZJ-168 972,92 ± 0,01 µM ter ZJ-72b 391,47 ± 0,03 µM. Izmed vseh spojin sta spojini ZJ-70 in ZJ-72b najbolje kelirali železove ione, zaradi tega smo se odločili, da spojino ZJ-70 testiramo tudi z deoksiriboznim testom, pri spojini ZJ-72b pa zaradi majhne količine vzorca tega nismo mogli narediti. Spojine imajo namreč lahko več načinov antioksidativnega delovanja.

Z deoksiriboznim testom smo ugotavljali, v kolikšnem obsegu spojine reagirajo s hidroksilnim radikalom in so na ta način sposobne obvarovati deoksiribozo pred razgradnjo. Za spojini ZJ-167_1 in ZJ-176 smo test opravili pri 10 koncentracijah, pri spojini ZJ-70 pa pri 7 različnih koncentracijah. Reakcija je potekala v plastičnih mikrocentrifugirkah, v katere smo odmerili določen volumen raztopin osnovnih spojin in reagentov (2-DR, FeCl₂, EDTA, H₂O₂, fosfatni pufer s pH 7,4 in spojina, ki jo vrednotimo). Z dodatkom askorbinske kisline smo sprožili nastanek ·OH v Fentonovi

reakciji, ki je sprožil serijo reakcij razgradnje 2-DR do nastanka MDA. Če je v reakcijski mešanici testirana spojina sposobna reagirati s ·OH, tekmuje z 2-DR, ter na ta način zmanjša razgradnjo 2-DR. Po eno-urni inkubaciji na 37°C sledi dodatek TBA in TCA k reakcijski mešanici in ponovna inkubacija na 90°C za 20 min. MDA reagira s TBA in nastane rožnato obarvan produkt, ki smo ga vrednotili spektrofotometrično pri 532 nm.

Problem pri deoksiriboznem testu je, da lahko za analizo uporabimo le spojine, ki so topne v vodnem mediju. V primeru uporabe organskega topila, nastali ·OH hitro reagira z molekulami organskega topila in rezultati takega testa niso uporabni. Ker so spojine ZJ-176 in ZJ-167_1 šibo kisle, smo si pri raztavljanju pomagali z dodatkom majhnega volumna NaOH, tako da smo pripravili vodotopne soli. Pri vseh treh spojinah pa smo si pomagali tudi s sonikacijo, da smo pospešili hitrost raztavljanja.

Absorbance smo pomerili v plastičnih kivetah, v katere smo odmerili določen volumen končne reakcijske mešanice. Absorbance vseh vzorcev smo določali na UV/Vis spektrofotometru Cary 50 Conc. Pred samo analizo spojin smo najprej pomerili slepa vzorca SL1 in SL2 ter slepe vzorce za vsako posamezno koncentracijo SL3. Dobljene vrednosti absorbanc smo prenesli v računalniški program Microsoft Excel, kjer smo jih statistično obdelali in izdelali grafe. Absorbance slepih vzorcev smo odsteli od dobljenih absorbanc spojih. Izračunali smo povprečne vrednosti, standardno deviacijo in % inhibicije razgradnje 2-DR. Pri spojni ZJ-70 zaradi majhne količine vzorca meritev nismo mogli narediti v triplikatih, zato tudi nismo računali povprečnih vrednosti ter standardnih deviacij. Iz dobljenih vrednosti smo izdelali 2 grafa: 1/A v odvisnosti od koncentracije spojine ter % inhibicije v odvisnosti od koncentracije.

Spojini ZJ-167_1 in ZJ-176 sta se izkazali kot dobra lovilca hidroksilnega radikala, vendar smo pri obeh spojinah opazili tudi pro-oksidativni učinek pri višjih koncentracijah. Spojina ZJ-167_1 pri koncentraciji 0,875 mM uspe inhibirati 88,5% poškodb 2-DR s hidroksilnim radikalom. Pri spojni ZJ-176 pa je koncentracija, kjer opazimo vrh, nižja in sicer pri 0,625 mM je % inhibicije poškodb 2-DR 88,7 %. Obe spojini sta torej sposobni preprečiti približno enako količino poškodb, vendar je pri spojni ZJ-167_1 za to potrebna višja koncentracija. Pri spojni ZJ-167_1 smo pri višjih koncentracijah opazili, da se z nadaljnjam večanjem koncentracije pojavi pro-oksidativni učinek, kar pomeni, da ne deluje več zaščitno, ampak priomore k nastanku poškodb. Pri spojni ZJ-176 pro-oksidativno delovanje pri višjih koncentracijah ni bilo tako očitno.

Pri spojni ZJ-70 nismo uspeli dobiti želenih rezultatov in želene oblike krivulje grafa 1/A v odvisnosti od koncentracije, kjer nas zanima vmesni del med spodnjim platojem in vrhom krivulje. Z večanjem koncentracije sicer krivulja narašča, vendar ne dovolj, da bi dobili vrh ter vmesni del. Iz tega smo zaključili, da je spojina sicer dober kelator železovih ionov, vendar je pri preprečevanju poškodb 2-DR s hidroksilnim radikalom neuspešna.

5 SKLEPI

Pri 4 spojinah od 6 derivatov imid dioksimov smo pri ferozinskem testu z merjenjem absorbance pri 562 nm in izračunom EC₅₀ določili, da so sposobne kelacije dvovalentnih železovih ionov.

Izmed vseh spojin, ki smo jih testirali s ferozinskim testom, sta bili spojini ZJ-70 in ZJ-72b najbolj aktivni, dobro aktivnost smo ugotovili tudi pri spojni ZJ-70b, najslabšo aktivnost pa je imela spojina ZJ-168.

Spojini ZJ-76 in ZJ-84 sta bili neaktivni pri ferozinskem testu, nista uspeli kelirati železovih ionov, zato jima tudi nismo mogli določili vrednosti EC₅₀.

Spojino ZJ-70 smo zaradi velike aktivnosti pri ferozinskem testu testirali tudi z deoksiriboznim testom, vendar pri tem testu nismo dobili želenih rezultatov in ustrezne oblike krivulje. S tem smo zaključili, da je spojina dober kelator dvovalentnih železovih ionov, vendar slab nevtralizator hidroksilnega radikala.

Spojini ZJ-167_1 in ZJ-176, ki smo ju tudi testirali z deoksiriboznim testom, pa sta se izkazali kot dobra potencialna antioksidanta, saj sta uspeli preprečiti približno 90% vseh poškodb 2-DR s hidroksilnim radikalom.

Spojina ZJ-176 prepreči več poškodb 2-DR pri manjših koncentracijah kot spojina ZJ-167_1.

Pri spojni ZJ-167_1 je bil pri višjih koncentracijah opazen pro-oksidativni učinek, kar pomeni, da ima zaščitno vlogo le v omejenem intervalu koncentracij. Pri spojni ZJ-176 prooksidativno delovanje pri višjih koncentracijah ni tako očitno in deluje antioksidativno pri nižjih koncentracijah kot spojina ZJ-167_1.

6 LITERATURA

1. Osredkar J: Oksidativni stres. Pregledni članek. Zdravstveni vestnik 2012; 81: 393-406.
2. Pečar S, Perdih A: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. Pregledni članek. Farmacevtski vestnik 2006; 57: 24-29.
3. Halliwell B, Gutteridge J M C: Free Radicals in Biology and Medicine, 3. izdaja, Oxford University Press, New York, 1999.
4. Carocho M, Ferreira I C F R: A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. A review. Food and Chemical Toxicology 2013; 51: 15-25.
5. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. Pregledni tematski znanstveni članek. Farmacevtski vestnik 2015; 66: 127-132.
6. Pečar S: Radikali v našem okolju. Strokovni članek – kemija. Kemija v šoli 2006; 18/2: 26-30.
7. Pečar S: Radikali v našem življenju. Strokovni članek – kemija. Kemija v šoli 2006; 18/3: 13-19.
8. Ebrahimzadeh M A, Pourmorad F, Bekhradnia A R: Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. African Journal of Biotechnology 2008; 7/18: 3188-3192.
9. Jeitner T M: Optimized ferrozine-based assay for dissolved iron. Analytical Biochemistry 2014; 454: 36-37.
10. Genaro-Mattos T C, Dalvi L T, Oliveira R G, Ginani J S, Hermes-Lima M: Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. Biochimica et Biophysica Acta 2009; 1790/12: 1636-1642.

11. Halliwell B, Gutteridge J M C, Aruoma O I: The Deoxyribose Method: A Simple 'Test-Tube' Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Analytical Biochemistry* 1987; 165: 215-219.
12. Aruoma O I: Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods in Enzymology* 1994; 233: 57-66.
13. Li X, Mai W, Wang L, Han W: A hydroxyl-scavenging assay based on DNA damage in vitro. *Analytical Biochemistry* 2013; 438: 29-31.
14. Li X: Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging. *Food Chemistry* 2013; 141: 2083-2088.
15. Černe D, Ostank B: Biomedicinska analitika I, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 7-17.
16. Burtis C A, Ashwood E R, Bruns D E: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 5. Izdaja, Elsevier, Missouri, 2012: 233-242.
17. UV/Vis Spetrofotometer Synergy HT
<http://wwwffa.uni-lj.si/o-fakulteti/katedre/katedra-za-farmacevtsko-kemijo/oprema-in-storitve/> (avgust 2015).
18. Held P, Buehrer L: The SynergyTM HT - A Unique Multi-Detection Microplate Reader for HTS and Drug Discovery. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 2003; 8/2: 44-49.
19. UV/Vis Spektrofotometer Cary
www.chem.agilent.com/Library/brochures/Cary%2050%20UV-Vis-brochure.pdf (maj 2015).
20. www.wlu.ca/documents/25790/Cary_UVVis.pdf (maj 2015).