

Biološka aktivnost odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata

Marasović, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:299800>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Marasović

**BIOLOŠKA AKTIVNOST ODABRANIH
BORONIČNIH KISELINA I NJIHOVIH
DERIVATA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Marasović

**BIOLOŠKA AKTIVNOST ODABRANIH
BORONIČNIH KISELINA I NJIHOVIH
DERIVATA**

DOKTORSKI RAD

Mentor(i):

prof. dr. sc. Mladen Miloš
prof. dr. sc. Karmela Barišić

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Maja Marasović

BIOACTIVITY OF SELECTED BORONIC ACIDS AND THEIR DERIVATIVES

DOCTORAL THESIS

Supervisor(s):

Prof. Mladen Miloš, PhD

Prof. Karmela Barišić, PhD

Zagreb, 2019.

Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u području biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za biokemiju Kemijsko tehnološkog fakulteta u Splitu i na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, u okviru poslijediplomskog sveučilišnog studija „Farmaceutske-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Istraživanje bioaktivnih spojeva iz dalmatinskog bilja: njihov antioksidacijski karakter i utjecaj na enzimsku inhibiciju i zdravlje“ (šifra 6897, BioActCom).

ZAHVALA

Zahvaljujem se svim dobrim ljudima koji su na ovom putu bili uz mene, a nije ih bilo puno.

Najprije se zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Karmeli Barišić i prof. dr. sc. Mladenu Milošu koji su cijelo vrijeme bili uz mene i pomogli mi da preskočim sve prepreke i uspješno stignem do cilja.

Zahvaljujem se dr. sc. Ranku Stojkoviću i dr. sc. Siniši Ivankoviću sa Zavoda za molekularnu medicinu, Pogon laboratorijskih životinja, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, jer su mi svojim iskustvom i znanjem omogućili da postignem stvari koje nisam mogla sama.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, majci, ocu i sestri jer su mi davali snagu za dalje kad je sama nisam imala.

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Borivoju Galiću i prof. dr. sc. Milki Maksimović, jer su imali samo riječi pohvale i podrške za mene, i jer su vjerovali u moj uspjeh.

Za kraj zahvaljujem se liječnici dr. med. spec. Sonji Tanfari iz KBC-a Split što se zauzela za mene kada mi je bilo najpotrebnije. Još uvijek vjerujem u njezine riječi da ću jednog dana opet plesati.

SAŽETAK

Boronične kiseline su spojevi u kojima je trovalentni borov atom povezan s jednom alkilnom ili arilnom skupinom te dvije hidroksilne skupine. Zanimljive su za istraživanje zbog malih molekulskih masa, termičke stabilnosti, niske toksičnosti, blage kiselosti te inertnosti u doticaju s vodom i kisikom. Djeluju kao izvrsni reaktanti, ali pokazuju i jaku bioaktivnost, što im je posljednjih godina priskrbilo podosta pozornosti. Boronične kiseline stvaraju nekoliko derivata, čija su svojstva, unatoč povećanom interesu, do danas još razmjerno neistražena.

U okviru ove doktorske disertacije provedeno je prvo opsežno usporedno istraživanje bioloških učinaka odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata – fenilboronične kiseline, 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline, trimetil boroksina, trimetoksi boroksina i dikalijevog-trioksohidroksitetrafluortriborata – te validacija njihovog inhibitornog djelovanja na izdvojene enzime: butirilkolinesterazu, tirozinazu, heksokinazu, laktat-dehidrogenazu i piruvat-kinazu. Citotoksični i antitumorski učinci ispitani su na tumorskim staničnim kulturama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, B16F10 mišjeg melanoma i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože. Svi ispitivani spojevi, s izuzetkom 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline, uzrokovali su značajno smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica u *in vitro* testovima, dok su u *in vivo* uvjetima znatno usporili njihov rast. U istraživanjima inhibitornog djelovanja, bolje učinke polučili su derivati s boroksinskim prstenom, posebice dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat i trimetoksi boroksin, u odnosu na ispitivane boronične kiseline. Antioksidacijska aktivnost ispitana je primjenom tri različite spektrofotometrijske metode, pri čemu su svi ispitivani spojevi pokazali zanemarivu djelotvornost.

Ostvareni rezultati upućuju na zaključak kako kod ispitivanih boroničnih kiselina i njihovih derivata postoji izvjesni biomedicinski potencijal te predstavljaju temelj za daljnja istraživanja.

Ključne riječi: boronične kiseline, boroksini, citotoksičnost, antitumorski učinci, enzimska inhibicija, antioksidacijska aktivnost

SUMMARY

Background: Boronic acids are compounds in which trivalent boron atom is connected with one alkyl or aryl and two hydroxyl groups. They are interesting due to their low molecular masses, their thermal stability, low toxicity, mild acidity and inertness to water and oxygen. The fact that they act as excellent reactants and exhibit strong bioactivity brought them a great deal of attention in recent years. Boronic acids form several derivatives which, despite growing interest, still remain relatively unexplored. Boroxines are boronic acid anhydrides, consisting of 6-membered, heterocyclic compounds composed of alternating oxygen and singly hydrogenated boron atoms. Due to their unique electron configurations, boroxines react readily with Lewis bases and are potentially selective enzyme inhibitors. They have the ability to bind to the active sites of enzymes and thus, prevent the catalytic reactions.

Over the past 40 years, boronic acids were studied primarily for their role in the Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). BNCT has been evaluated clinically as an alternative to conventional radiation therapy in patients with high grade malignant brain tumors (gliomas), recurrent tumors of the head and neck region and a much smaller number with cutaneous and extracutaneous melanomas. In 2003, the dipeptide boronic acid bortezomib became the first clinically approved proteasome inhibitor for treating relapsed multiple myeloma and mantle cell lymphoma. Bortezomib introduction has sparked a renewed interest in boronic acids as potential pharmaceutical agents for a wide range of diseases. Nowadays, boronic acids and their derivatives are investigated related to the development of boron-glucose sensors – that could enable continuous, non-invasive blood sugar level monitoring in diabetes mellitus patients – and self-regulated insulin delivery systems, tracking changes in dopamine concentrations in the diagnosis and treatment of Parkinson's diseases and schizophrenia, etc. The research carried out on diazaborine has shown that boronic acid derivatives exhibit broad-spectrum antimicrobial and antifungal properties. The boron-containing antibiotic, boromycin was found as an antiviral agent against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strain in *in vitro* conditions. Also, boronic acid antiviral activity against hepatitis C virus (HCV) has been indicated previously.

Aim: This doctoral thesis represents the first comprehensive comparative study carried out to elucidate the biological effects of selected boronic acids and their derivatives – phenylboronic acid, 2,4,6-trifluorophenyl boronic acid, trimethylboroxine, trimethoxyboroxine and dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate – and to assess their inhibitory activity on

isolated enzymes: butyrylcholinesterase, tyrosinase, hexokinase, lactate dehydrogenase and pyruvate kinase. Based on previously published results and own preliminary studies, it is hypothesized that selected boronic acids and their derivatives, such as dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate, posses strong biomedical activity and could be considered as a promising novel therapeutics for various diseases, particularly malignant.

Methods: The cytotoxic activities of selected compounds at various concentrations were evaluated on 4T1 mouse mammary adenocarcinoma, B16F10 mouse melanoma, SCCVII squamous cell carcinoma and L929 mouse dermal fibroblast cell lines. Crystal violet staining assays were utilized to determine cell growth inhibition rates. Antitumour activity *in vivo* was assessed using three different mouse strains: BALB/c syngeneic with 4T1 cells, C57BL/6 syngeneic with B16F10 cells and C3H/H syngeneic with SCCVII cells. All animals, employed in the experiments, were treated according to the Animal Welfare Regulations. Each experimental group encompassed seven animals. Mouse tumor models of 4T1 mammary adenocarcinoma, B16F10 melanoma and SCCVII squamous cell carcinoma were established by injecting 5×10^5 of tumor cells subcutaneously into the right thigh of syngeneic mice. Depending on the tumor model, four different application routes were studied: intra-peritoneal, intra-tumoral, per-oral and topical.

Enzyme inhibitory effects of selected compounds were investigated spectrophotometrically, following standardized protocols and procedures, reported in literature. Michaelis-Menten kinetic parameters K_m and V_{max} values were calculated using Lineweaver-Burk double reciprocal plot, whilst inhibitory constant K_i values were estimated through use of Dixon reciprocal plot.

Finally, the antioxidant properties were examined utilizing three well-known assay systems: ferric-reducing antioxidant power (FRAP), DPPH radical scavenging and Fe^{2+} metal chelating.

Results: All selected compounds have significantly reduced cell viability in all tested cell lines at the highest applied concentrations. The only expcetion was 2,4,6-trifluorophenyl-boronic acid that did not demonstrate any cytotoxic effects on L929 mouse dermal fibroblast cell line, regardless of the concentration. The differences in the cell sensitivity were more pronounced at lower concentrations. Strong growth inhibition of B16F10 mouse melanoma, SCCVII squamous cell carcinoma and L929 mouse fibroblast cells was caused by low

concentrations of dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate (cell survival rate 20 – 52 %) and trimethoxy boroxin (cell survival rate 35 – 59 %), whilst at the same concentrations, mild cytotoxicity against 4T1 cells was observed only in samples treated with trimethoxy boroxin (cell survival rate 77 %) and trimethyl boroxin (cell survival rate 80 %).

Antitumor activity *in vivo* was assessed on the same tumor models as *in vitro*. Phenylboronic acid administered intra-peritoneally exhibited good to extremely good antitumor activity on all tested cell lines (34 – 57 %), and similar performance (33 %) was observed on SCCVII cells when phenylboronic acid was applied perorally. Dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate significantly (30 – 42 %) reduced cell growth in all four administration modes. On the other hand, the only antitumoral activity by 2,4,6-trifluorophenylboronic acid was detected when it was administered intra-tumorally to experimental animals inoculated with 4T1 tumor cells.

When it comes to enzyme inhibition, generally boroxine ring-containing compounds demonstrated better inhibitory effects in comparison with boronic acids. In all assays, dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate and trimethoxyboroxine were the most effective in disrupting enzyme activity. With inhibition rate in between 41 and 60 %, at the highest tested inhibitor concentration, butyrylcholinesterase proved the most susceptible to action of selected boronic acids and their derivatives. On the contrary, lactate-dehydrogenase was deemed most resilient, showing very mild activity decrease (inhibition rate 24 %), solely in contact with trimethoxy boroxine. The assays confirmed that all studied compounds display non-competitive inhibition patterns, which is not surprising knowing that they have no structural similarities with the used substrates.

Antioxidant properties of the selected boronic acids and their derivatives were evaluated using three different spectrophotometric methods, in comparison with reference antioxidants. At tested concentrations (0.1 – 10 mM), all studied compounds exhibited negligible antioxidant capacity, DPPH free radical scavenging activity and iron chelating ability. No distinctive differences were observed between boronic acids and boroxine ring-containing compounds. Among the studied compounds, dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate showed the most prominent effects, yielding a ferrous sulfate equivalent antioxidant capacity (FEAC) value of 464 mM. Other selected compounds demonstrated several times lower antioxidant capacities, ranging between 864 – 3442 mM FEAC. Withal dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate displayed the strongest ability to scavenge free radicals

($IC_{50} = 21.23$ mM), but at the same time it turned out to be the worst chelator of Fe^{2+} ions ($IC_{50} = 414.57$ mM), in comparison with other studied compounds. Radical scavenging activity of 2,4,6-trifluorophenylboronic acid was roughly comparable to that of dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate ($IC_{50} = 28.79$ mM), while the effectiveness of other three studied compounds was significantly lower ($IC_{50} = 57.08 - 65.61$ mM). The experiments further revealed that phenylboronic acid exerted the most powerful inhibitory effect on ferozin complex formation, with a IC_{50} value of 72.51 mM at the highest tested concentration.

Conclusion: In the light of all the studies carried out in this thesis, it can be concluded that nearly all selected compounds demonstrated good or very good cytotoxic and antitumor effects. They exhibited good inhibition of the investigated enzymes to some extent; however, all five of them showed extremely weak antioxidant power. Although antioxidant capacity assays did not confirm radical scavenging potential through electron transfer mechanism, they did reveal a certain activity towards free DPPH radical. This fact calls for further research into possible alternative antioxidant action mechanisms. In addition, to understand exactly how the boronic acids and their derivatives affect the metabolism and tumor cell growth, it might be interesting and beneficiary to expand the research onto the specific subtypes of enzymes used in this study.

Keywords: boronic acids, boroxines, citotoxicity, antitumor effects, enzyme inhibition, antioxidant activity

KRATICE

AAPH	2,2-azobis 2-amidopropan dihidroklorid
ABTS	3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina
ADP	adenozin-difosfat
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije (engl. <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
AMP	adenozin-monofosfat
ANOVA	jednosmjerna analiza varijance (engl. <i>Analysis Of Variance</i>)
ATP	adenozin-trifosfat
ATRP	konvencionalna radikalna polimerizacija atoma (engl. <i>Atom Transfer Radical Polymerisation</i>)
BNCT	bor-neutron hvatajuća terapija (engl. <i>Boron Neutron Capture Therapy</i>)
BUAV	Britansko udruženje za aboliciju vivisekcije (engl. <i>British Union for the Abolition of Vivisection</i>)
CD	stanični diferencijacijski antigeni (engl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
CTP	citidin-trifosfat
CUPRAC	antioksidacijska metoda (engl. <i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i>)
DMA	N-dimetilakrilamid
DMApAA	3-dimetilamino propil akrilamid
DMPD	N-dimetil-p-fenilendiamin
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPPH	antioksidacijska metoda (engl. <i>1,1'-Diphenyl-β-picrylhydrazyl</i>)
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ET	antioksidacijske metode koje se zasnivaju na transferu elektrona (engl. <i>Electron Transfer</i>)
FC	antioksidacijska metoda (ukupna fenolna aktivnost po Folin-Ciocalteu)
FDA	Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FRAP	antioksidacijska metode (engl. <i>Ferric Ion Reduction Potential(Power)</i>)
GTP	guanozin-trifosfat
IGF-1	faktor rasta sličan inzulinu 1 (engl. <i>Insulin-like growth factor 1</i>)
IUBMB	Međunarodna unija za biokemiju i molekularnu biologiju (engl. <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)
HAT	antioksidacijske metode koje se zasnivaju na reakcijama sa vodikom (engl. <i>Hydrogen Atom Transfer</i>)
HIF-1	hipoksijom inducirani faktor 1 (engl. <i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>)

HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HK-I	izoforma heksokinaze I
HK-II	izoforma heksokinaze II
HK-III	izoforma heksokinaze III
HK-IV	izoforma heksokinaze IV (glukokinaza)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
KA	kelirajuća aktivnost
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin
LDH-1	izoforma laktat-dehidrogenaze 1
LDH-2	izoforma laktat-dehidrogenaze 2
LDH-3	izoforma laktat-dehidrogenaze 3
LDH-4	izoforma laktat-dehidrogenaze 4
LDH-5	izoforma laktat-dehidrogenaze 5
LDHA	strukturna podjedinica laktat-dehidrogenaze A
LDHB	strukturna podjedinica laktat-dehidrogenaze B
LDL	kolesterol niske gustoće (engl. <i>Low-Density Lipoprotein</i>)
L PK	jetrena izoforma piruvat kinaze L
MalDH	malat dehidrogenaza
MAPBA	3-metakrilamidofenilboronična kiselina
M1 PK	mišićna izoforma piruvat kinaze M1
M2 PK	izoforma piruvat kinaze M2
MTT	metoda redukcije tetrazolijeve soli
NAD ⁺	oksidirana forma nikotinamid-adenin-dinukleotida
NADH	reducirana forma nikotinamid-adenin-dinukleotida
NADPH	reducirana forma nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata
ORAC	antioksidacijska metoda (engl. <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
PABA	p-amino benzojeva kiselina
PCET	protonom praćen prijenos elektrona (engl. <i>Proton-Coupled Electron Transfer</i>)
PDK1	piruvat-dehidrogenaza-kinaza 1
PEP	fosfoenol-piruvat
PET	pozitron-emisijska tomografija (engl. <i>Positron-Emission Tomography</i>)
R PK	izoforma piruvat kinaze R
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	reaktivne čestice kisika (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
TEAC	antioksidacijska metoda (engl. <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
TNF	stimulirajuće djelovanje inflamatornog citokina (engl. <i>Tumor necrosis factor alpha</i>)

TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin
TRAP	antioksidacijska metod (engl. <i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>)
UTP	uridin-trifosfat
UV	ultraljubičasto (engl. <i>UltraViolet</i>)

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Kemija borovih spojeva	2
1.1.1.	Bor	2
1.1.2.	Boronične kiseline i njihovi derivati.....	5
1.1.2.1	Potencijalne terapijske mogućnosti boroničnih kiselina.....	6
1.1.2.2	Primjene boroničnih kiselina u dijagnostici.....	7
1.1.2.3	Derivati boroničnih kiselina	9
1.1.2.4	Antitumorsko djelovanje boroničnih kiselina i njihovih derivata.....	9
1.1.2.5	Pregled boroničnih kiselina i njihovih derivata istraživanih u ovom radu	10
1.2.	Metabolizam tumora	12
1.2.1.	Warburgov efekt	13
1.2.2.	Moderno razumijevanje raka kao bolesti.....	15
1.2.3.	Strategije liječenja tumora	16
1.3.	Ispitivanje biološke aktivnosti spojeva	17
1.3.1.	Ispitivanje citotoksičnosti <i>in vitro</i>	17
1.3.2.	Ispitivanje antitumorske aktivnosti <i>in vivo</i>	19
1.4.	Biokemija enzima.....	21
1.4.1.	Enzimi i kataliza	21
1.4.2.	Enzimska kinetika i metode mjerenja.....	23
1.4.2.1	Vidljiva i ultraljubičasta spektrofotometrija	25
1.4.2.2	Analiza utjecaja okoline na mjerenja.....	26
1.4.2.2.1	Temperatura.....	26
1.4.2.2.2	pH i pufer.....	26
1.4.2.2.3	Aktivatori i inhibitori.....	27
1.4.3.	Enzimska kinetika - matematičko modeliranje.....	27
1.4.4.	Michaelis-Menteničina jednadžba	28
1.4.4.1	Ostali grafički prikazi enzimske kinetike	29
1.4.5.	Inhibicija enzimske aktivnosti	30
1.4.5.1	Kompeticijska inhibicija.....	31
1.4.5.2	Nekompeticijska inhibicija	32
1.4.5.3	Akompeticijska inhibicija.....	34
1.4.5.4	Određivanje tipa inhibicije i konstante inhibicije K_i	35
1.4.6.	Enzimi značajni za ciljeve istraživanja u ovom radu.....	35
1.4.6.1	Butirilkolinesteraza (EC 3.1.1.8)	35
1.4.6.2	Tirozinaza (EC 1.14.18.1)	38

1.4.6.3	Piruvat kinaza (EC 2.7.1.40.).....	41
1.4.6.4	Laktat-dehidrogenaza (EC 1.1.1.27.).....	43
1.4.6.5	Heksokinaza (EC 2.7.1.1.).....	46
1.5.	Antioksidacijska aktivnost u živim organizmima.....	49
1.5.1.	Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti.....	53
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	56
2.1.	Cilj i hipoteze doktorskog rada	56
2.2.	Očekivani znanstveni doprinos.....	56
3.	MATERIJALI I METODE	57
3.1.	Priprema otopina uzoraka odabranih derivata boroničnih kiselina	57
3.2.	Ispitivanje biološke aktivnosti	58
3.2.1.	Određivanje citotoksične aktivnosti <i>in vitro</i>	58
3.2.2.	Procjena antitumorske aktivnosti <i>in vivo</i>	59
3.3.	Ispitivanje enzimске kinetike.....	62
3.3.1.	Ispitivanje inhibicije enzima butirilkolinesteraze	62
3.3.2.	Ispitivanje inhibicije enzima tirozinaze	63
3.3.3.	Ispitivanje inhibicije enzima heksokinaze	64
3.3.4.	Ispitivanje inhibicije enzima laktat-dehidrogenaze	65
3.3.5.	Ispitivanje inhibicije enzima piruvat-kinaze	66
3.4.	Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	67
3.4.1.	FRAP metoda.....	67
3.4.2.	DPPH metoda	68
3.4.3.	Kelirajuća aktivnost	70
3.5.	Statistička obrada rezultata.....	72
4.	REZULTATI I RASPRAVA	73
4.1.	Ispitivanje antitumorske aktivnosti	73
4.1.1.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti <i>in vitro</i>	73
4.1.2.	Ispitivanje antitumorske aktivnosti <i>in vivo</i>	79
4.2.	Ispitivanje enzimске kinetike.....	86
4.2.1.	Ispitivanje inhibicije enzima butirilkolinesteraze	86
4.2.2.	Ispitivanje inhibicije enzima tirozinaze	92
4.2.3.	Ispitivanje inhibicije enzima heksokinaze	98
4.2.4.	Ispitivanje inhibicije enzima laktat-dehidrogenaze	103
4.2.5.	Ispitivanje inhibicije enzima piruvat-kinaze	108
4.3.	Ispitivanje antioksidacijskog potencijala.....	114

4.3.1.	FRAP metoda.....	114
4.3.2.	DPPH metoda	117
4.3.3.	Kelirajuća aktivnost	121
5.	ZAKLJUČAK	126
6.	LITERATURA	130
7.	ŽIVOTOPIS.....	149
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	152
9.	PRILOG	155

1. UVOD

Posljednjih 20-tak godina raste zanimanje za spojeve bora. Bor ima praznu p-orbitalu što ga čini reaktivnim prema nukleofilima budući da može postići stabilnu oktetnu konfiguraciju (Ramachandran, 2013; Scorei, 2011; Scorei i Popa, 2010; Bakirdere i sur., 2010; Baker i sur., 2009). S posebnom pažnjom istražuju se boronične kiseline i njihovi derivati boroksini (produkti dehidratacije boroničnih kiselina), zbog moguće terapijske primjene vezane uz njihovu zanimljivu biološku aktivnost. Prvi lijek kao derivat boronične kiseline generičkog imena *bortezomib* (Paramore i Frantz, 2003), pojavio se na tržištu 2003. godine a služi u terapiji multiploga mijeloma. Duže vrijeme su boronične kiseline istraživane u sklopu bor-neutron hvatajuće terapije (engl. *Boron Neutron Capture Therapy*, BNCT). Danas se ova metoda klinički koristi kao neinvazivna alternativno-konvencionalna terapija zračenjem za liječenje zloćudnih tumora mozga (glioma), a u novije vrijeme i recidiva lokalno uznapredovalih tumora glave i vrata.

Istraživanja primjene boroničnih kiselina i njihovih derivata danas su fokusirana na razvoj senzora bor-glukoza važnih za kontrolu razine krvnog šećera kod šećerne bolesti (lat. diabetes mellitus) (Egawa i sur., 2014) i transport inzulina u ljudskom tijelu te na praćenje promjena koncentracija dopamina kod dijagnosticiranja i liječenja Parkinsonove bolesti i shizofrenije (Hong i sur., 2016). Istraživanja provedena na diazoborinima pokazala su da derivati boroničnih kiselina imaju antimikrobna i antifugalna svojstva širokoga spektra (Trippier i McGuigana, 2010).

Radeći na sintezi dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) po modificiranom postupku (Ryss i Slutskaya, 1951), Galić (Galić, 2012; Galić, 2013) je slučajno otkrio da taj spoj djeluje na hiperkeratoze na koži, to jest da tamno obojene izrasline izložene djelovanju malih koncentracija dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) gube boju i nepovratno otpadaju s površine kože. Daljnjim istraživanjima utvrđeno je da dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) pokazuje sporu degradaciju, da je stabilan i dobro topljiv u vodi što ga čini primjenjivim u različitim medicinskim i dermatološko-kozmetičkim formulacijama.

Haverić i sur. (Haverić i sur., 2011) istražili su antiproliferacijski, citotoksični i genotoksični potencijal dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) pomoću testa *alarBlue* na bazalnim stanicama karcinoma i limfocitnih kultura mijenjajući citokinetički blok - mikrojezgreni postupak. Islamović i suradnici (Islamović i sur., 2014) te Vullo i suradnici (Vullo i sur., 2014) istraživali su kinetičke parametre i mehanizam inhibicije enzima katalaze i humanih karbonanhidraza u prisutnosti dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). Ivanković i suradnici (Ivanković i sur., 2014) pokazali su jaku antitumorsku aktivnost dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) koja je usporediva s dobro poznatim antitumorskim lijekom 5-fluorouracilom. Antitumorska aktivnost ispitivana je *in vitro* na tumorskim staničnim linijama: 4T1 mišji adenokarcinom dojke, B16F10 mišji melanom te SCCVII mišji karcinom pločastih stanica kože koje imaju sposobnost stvaranja solidnih tumora i *in vivo* na singeničnim miševima s istim tumorskim staničnim linijama. Premda je studija pokazala veliku osjetljivost stanica raka na ovaj spoj, mehanizam djelovanja nije rasvijetljen.

U ovom radu istražuje se biološka aktivnost: antitumorsko, citotoksično i antioksidacijsko djelovanje te inhibitorno djelovanje odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata i to fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) na sljedeće enzime: tirozinazu, heksokinazu, piruvat kinazu, laktat-dehidrogenazu i butirilkolinesterazu, koji su izabrani u skladu s osobinama istraživanih tumorskih stanica i teorijom Warburgovog efekta. Glavni motiv istraživanja predstavljenog u ovom doktorskom radu bio je utvrditi postoje li biološki učinci odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata, poput dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), koji bi predstavljali temelje za propitivanje njihovoga terapijskoga potencijala, posebice za maligne bolesti.

1.1. Kemija borovih spojeva

1.1.1. Bor

Profesor Artem Oganov sa Sveučilišta u Stony Brooku izjavio je 2007. godine u New York Times-u: „Bor je stvarno jedan shizofreni element. To je element kompletne frustracije. Taj element doista ne zna što želi od sebe“. Svojom neobičnom izjavom profesor Oganov je vrlo

dobro objasnio svu kompliciranost, ali i nevjerojatnu zanimljivost bora kao elementa, kao i kemije njegovih spojeva. Iako prilično poznat drevnim civilizacijama, za moderan se svijet nekako još uvijek skriva u sjenama neznanja, i čeka da bude otkriven. Prvi dokazi o korištenju borovih soli postoje iz doba Babilona, gdje su ih Babilonci koristili za topljenje artefakata. Egipćani su ih koristili za mumificiranje, a Rimljani za pranje krvavih podova arena. Naziv **bor** (engl. *boron*) dolazi od arapske riječi „burag“ što znači bijelo, a odnosi se na boraks - mineral u kojem je tadašnjoj civilizaciji bor bio dostupan. Arapi su borove soli koristili za različite primjene, uključujući i izradu lijekova. Bor se danas najviše koristi u proizvodnji stakla, deterdženata i vatrogasnih aparata.

Od početka 20. stoljeća kemija borovih spojeva sve se više izučava. Nestabilnost bora na zraku glavni je uzrok što je bor prvi put u čistom obliku proizveden tek 1909. godine. Bor je vrlo zanimljiv element. Prvo što ga čini jako zanimljivim jest njegov položaj u periodnom sustavu elemenata. S jedne strane okružen je metalima kao što su berilij, aluminij i galij, koji su čisti metali i lako daju svoje vanjske elektrone i stvaraju ionsku vezu. S druge strane nalaze se nemetali ugljik i dušik koji preferiraju podjelu elektrona i stvaranje kovalentne veze. Bor je polumetal i pokazuje čudno miješanje karakteristika metala i nemetala. Ima tri valentna elektrona tako da bi trebao biti sposoban formirati trostruku kovalentnu vezu. Uspješno je potvrđeno međusobno povezivanje borovih atoma u lance, a upravo je takva sposobnost ugljika osnova cijele organske kemije, i bez nje ne bi bilo molekula deoksiribonukleinske kiseline (engl. *Deoxyribonucleic Acid*, DNA), proteina, ugljikohidrata i drugih za život neizmjerljivo važnih molekula.

Bor, za razliku od ostalih metala, ima snažan afinitet za elektronima zahvaljujući praznoj p-orbitali. To čini bor i njegove spojeve siromašnima (deficijentnima) s obzirom na elektrone, što vodi do nastanka neobičnih struktura.

Ugljik ima četiri valentna (vanjska) elektrona, lako stupa u interakciju i stvara veze s drugim atomima ugljika ili atomima nekog drugog elementa. Ugljikovi spojevi u sebi sadrže kovalentne veze nastale podjelom parova elektrona čime se formiraju relativno strogi prstenovi i lančane strukture. Štoviše, ugljik se može vezati na druge atome i dvostrukim i trostrukim vezama (Pine, 1994).

Borovi spojevi više naginju stvaranju struktura poput „rešetki“ (engl. *cage*) i „grozdova“ (engl. *cluster*) s mnogostrukim geometrijskim varijacijama. Takvi spojevi imaju unikatnu

raspodjelu naboja koja im omogućava formiranje nekovalentnih veza s aminokiselinama bočnih lanaca enzima, vrlo važnih za normalno oblikovanje aktivnih mjesta katalize. Bor se ponaša poput metala kad stvara okside poput bor (III) oksida (B_2O_3), i soli poput borovog sulfata ($B_2(SO_4)_3$). Ali potpuno suprotno od metala, bor formira kiseline poput borne kiseline (H_3BO_3). On čak formira i veoma kompleksnu seriju hidrida kao što to čini i ugljik.

Bor je esencijalan za biljke i vrlo je važan u antibiotskoj tvari boromicinu kojeg proizvode streptomicete (Baker i sur., 2009). Novija istraživanja (Bakirdere i sur., 2010) pokazuju da je iznimno važan za meristemsko tkivo koje je bogato matičnim stanicama, sposobnim da se diferenciraju u bilo koju vrstu stanica potrebnih za rast i život jedne biljke.

Prema istraživanju njemačkog onkologa dr. Paula Gerharda Seegera rak počinje slabljenjem stanične membrane (Seeger i Wolz, 1990). Budući da je bor važan za integritet stanične stijenke, moguće je da je on potencijalni inhibitor tumorskog rasta. Bor kao element bitan je kod reguliranja rada paratiroidne žlijezde, te je iznimno potreban za regulaciju metabolizma kalcija, magnezija i fosfora. Vjeruje se da bor može utjecati na faktore zgrušavanja krvi, te utjecati na poboljšanje stanja kod srčanih bolesnika.

Bor u tijelo unosimo putem hrane. Prirodni izvori bogati borom su: jabuke, naranče, avokado, grožđe, kruške, šljive, kivi i orašasti plodovi.

Velike farmaceutske tvrtke danas ulažu znatna sredstva za razvoj lijekova baziranih na borovim spojevima. Razvoj se temelji na spoznajama iz narodne medicine. Narodna medicina primjerice, savjetuje uzimanje boraksa (borove soli) za liječenje svih oblika kandidaze, te korištenje koprive (zbog bogatstva borom) za liječenje reume i artritisa. Do sada je na tržištu uspješno plasirano samo nekoliko preparata čija je aktivnost vezana uz bor. Tako je primjerice američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 2014. godine odobrila antifungalni lijek generičkog naziva *tavaborol* s borovim spojem kao aktivnom tvari.

Od 2003. godine dostupan je lijek generičkog naziva *bortezomib* koji sadrži borov spoj i djeluje na proteasom. Borov se atom veže na katalitičko mjesto proteasoma 26S i blokira njegovu aktivnost. Proteasomi su proteinski kompleksi koji se nalaze u jezgri i citosolu svih eukariotskih stanica, a kojima stanice reguliraju koncentraciju pojedinih proteina i razgrađuju nefunkcionalne ili nepravilno nabrane proteine. U procesu degradacije proteina nastaju peptidi

sa 7-8 aminokiselina, koji se zatim razrađuju do aminokiselina, a one se mogu ponovno koristiti u sintezi novih proteina. Inhibicijom proteasoma 26S pokušava se spriječiti razgradnja pro-apoptičkih proteina koji kod pojačane ekspresije nefunkcionalnih ili nepravilno nabranih proteina aktiviraju mehanizam programirane stanične smrti, odnosno apoptozu. Pojačana ekspresija nefunkcionalnih ili nepravilno nabranih proteina obilježje je stanica raka, posebice multiplog mijeloma (Paramore i Frantz, 2003).

Bor ima svojstvo da formira male molekulske spojeve prikladne za ciljanje ključnih vezujućih mjesta na proteinima. Njegova prazna p-orbitala lako se interkonvertira iz neutralne sp² u hibridiziranu atomsku sp³ orbitalu što stvara čvrstu i postojanu interakciju između bora i proteinskog katalitičkog mjesta (Renaud i sur., 2007). Što se tiče liječenja tumora, osim bortezomiba, sve više se istražuje i BNCT terapija (Miyatake i sur., 2016; Miyatake i sur., 2018). Rad na ovome započeo je prije 30-tak godina, no tek je nedavno dostigao fazu kliničkog ispitivanja. BNCT koristi nuklearnu reakciju koja se zbiva kada borov izotop 10, inače stabilan, biva ozračen nisko energetske neutronima. Hvatanjem neutrona prelazi u helij-4 α čestice i litij-7 jezgru, obje bogate kinetičkom energijom. Nuklearna reakcija zbiva se samo unutar stanica u kojima su akumulirani borovi spojevi, što je očigledno prednost jer se ne oštećuje okolno tkivo. Otpuštanjem γ -zraka dolazi do stvaranja citotoksičnog efekta kod tumorskih stanica, koje zbog nekog razloga baš preferiraju nakupljanje borovih spojeva. Terapija za sada ima mnogo uspjeha kod tumora vrata, glave i mozga, a što je posebno važno, uspješna je i kod recidiva.

1.1.2. Boronične kiseline i njihovi derivati

Boronične kiseline jesu klasa borovih spojeva koji sadrže trovalentni borov atom povezan na alkilnu ili arilnu skupinu i dvije hidroksilne grupe. Zanimljive su za istraživanje zbog malih molekulskih masa, termičke stabilnosti, niskog toksičnog profila, blage kiselosti te inertnosti na vodu i kisik. Djeluju kao izvrstan reaktant, a osim toga pokazuju i jaku bioaktivnost.

Prve boronične kiseline spominju se u literaturi od 1860. godine. Prazna borova p-orbitala utječe na to da boronične kiseline lako stupaju u interakcije s Lewisovim bazama preko interkonverzije sp² u sp³ hibridizaciju. U vodenom mediju ova se interkonverzija zbiva pomoću reakcije s vodom gdje neutralan i trigonalan bor prelazi u tetraedarski anion. Dodatak različitih substituenata na fenilni prsten omogućava podešavanje pKa vrijednosti, tako da

polimerne boronične kiseline mogu biti korištene u fiziološki relevantnom pH području. Jedna od najvažnijih kemijskih karakteristika je njihova sposobnost da formiraju povratne kovalentne komplekse s 1,2 ili 1,3-diolima. U prisutnosti 1,2 ili 1,3-diola formiraju se ciklički boronatni esteri. Reakcije neutralnih boroničnih kiselina s diolima generalno se smatraju hidrolitički nestabilnima, dok s druge strane reakcija tetraedalnog boronatnog aniona s diolima vodi do nastanka stabilnih boronatnih estera. Kod polimernih boroničnih kiselina ova tranzicija neutralnog i često hidrofobnog polimera u hidrofilni polianion omogućuje prepoznavanje diola.

Korištenje polimera boroničnih kiselina u biotehnologiji ima nekoliko očitih doprinosa:

- moguće je povećanje aktivnosti lijekova kao posljedica multivalencija;
- moguće je usporeno i kontrolirano otpuštanje lijekova sa ciljanom biodistribucijom;
- moguća je priprava makromolekularnih lijekova.

Boronične kiseline s jedinstvenom reaktivnošću imaju ogroman potencijal kao samozacjeljujući materijali, terapijski agensi, samoregulirani dostavni sustavi za lijekove, inhibitori enzima, adsorbansi i senzori za šećere i glikoproteine i antitijela koja oponašaju polisaharide na staničnoj površini (Yang i sur., 2003).

1.1.2.1 Potencijalne terapijske mogućnosti boroničnih kiselina

Debljina je u današnjem svijetu najrašireniji zdravstveni problem. Lipaze su enzimi odgovorni za hidrolizu netopljivih hidrofobnih lipida. Lipaze hidroliziraju lipide kako bi omogućili njihovu apsorpciju preko probavnog trakta. Fenilboronične kiseline pokazale su se kao inhibitori enzima hidrolaza (uključujući lipaze) i proteaza. Inhibitorsko djelovanje posljedica je prelaska trigonalne boronične kiseline u negativno nabijen tetraedalni kompleks sa serin hidroksilnim grupama u aktivnom mjestu lipaza. Afinitet enzima prema boroničnim kiselinama puno je veći nego za tipične lipidne substrate. Lipazni inhibitori mogu se koristiti da preveniraju hidrolizu lipida i reduciraju apsorpciju masti. Neprobavljeni trigliceridi i digliceridi tada se lako izbacuju iz tijela bez gomilanja u njemu (Trippier i McGuigana, 2010).

Samo u 2009. godini dijagnosticirano je novih 2,6 milijuna ljudi zaraženih virusom humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*, HIV) (Cohen i sur., 2011). Poznata su dva tipa HIV virusa: tip 1 virusa (HIV-1) koji je najčešći u Europi i SAD-u, i tip 2 virusa (HIV-2). Neliječene HIV-infekcije uzrokuju bolest sindrom stečene

imunodefijencije (engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, AIDS). Opsežna istraživanja (Guan i Zhang, 2013) pokazala su da boronične kiseline mogu stvarati hidrogel ukriženo povezan reverzibilnom kovalentnom interakcijom sa salicilnom hidroksamičnom kiselinom unutar fiziološki važnog pH područja. Visoko ukrižana povezana mreža zaustavlja HIV-1 virione tako da hidrogelovi služe kao pH-osjetljivi mikrobicidi. Hidrogelovi sprječavaju napad HIV-1 vezujući se na gp120 proteine u njegovoj vanjskoj ovojnici, koji su neophodni za virusnu infekciju jer olakšavaju ulazak HIV-a u stanicu domaćina. Benzoboroksoli su sposobni kompleksirati s manoznim ostacima na gp120 proteinima HIV-1 virusa čime ga deaktiviraju prije nego stigne do CD4⁺ T-limfocita. Molekula CD4 (CD je kratica od engl. *Cluster of Differentiation* odnosno „stanični diferencijacijski antigeni“) se nalazi na membrani T-limfocita i monocita. Važna je za funkcioniranje našeg imunskog sustava jer sudjeluje u procesu tzv. antigenskog prepoznavanja, tijekom kojeg naš imunski sustav prepoznaje komponente mikroorganizma (npr. bakterije ili viruse) kojima smo zaraženi i pokušava ih eliminirati (Trippier i McGuigana, 2010).

1.1.2.2 Primjene boroničnih kiselina u dijagnostici

Opisano je nekoliko primjena senzora i receptora utemeljenih na boroničnim kiselinama (Cambre i Sumerlin, 2011). Uz pomoć boroničnih kiselina razvija se nekoliko metoda glukoznog prepoznavanja. Nastali boronatni esteri stupaju u reakciju s katoničnim cijanin bojama pomičući apsorpcijske valne duljine prema manjim vrijednostima. Kod optičkih saharidnih senzora promjene u apsorpcijskom spektru povezane su ili sa steričkim efektima nastalim umetanjem saharida između boroničnih kiselina i Lewis bazičnog dušikovog atoma ili s gubitkom unutarnje vodikove veze nastale stvaranjem boronatnih estera (Cambre i Sumerlin, 2011). Postoji određeni broj senzora baziranih na fluorescenciji. Wang i njegov tim unaprijedili su konvencionalnu radikalnu polimerizaciju atoma (engl. *Atom Transfer Radical Polymerisation*, ATRP) kako bi pripremili fluorescentne polimere koji sadržavaju boronične dijelove (Yang i sur., 2003). Nastali polimeri pokazali su porast fluorescentnog intenziteta pri dodatku d-fruktoze. Ova metoda pripremanja senzora proširena je i na druge ugljikohidrate te kateholamine. Budući da se cijeli sustav bazira na potpuno reverzibilnoj elektrostatičkoj interakciji, sustavi su se pokazali sposobnima kontinuirano detektirati glukozu. Ove osjetljive komponente imobilizirane su u tanki film poli(2-hidroksietilmetakrilat) hidrogel (Cambre i Sumerlin, 2011). Konformacijska promjena kopolimera inducirana saharidima može se pratiti pomoću fluorescentne spektroskopije.

Appleton i Gibson (Cambre i Sumerlin, 2011) sintetizirali su boronične kiseline obogaćene fotoinduciranim elektron-prijenosnim materijalima. Polimeri s amino, fluoroformnim i boroničnim dijelovima u svakom mjerenju pokazuju porast fluorescencije u prisutnosti saharida. Vjeruje se da povezivanje saharida na boronični dio povećava kiselo-baznu interakciju između boroničnog dijela i amino skupine, a smanjuje interakciju nesparenog para dušikovih elektrona s fluoroformom, što dovodi do smanjenja fotoinduciranog prijenosa elektrona, dok se povećava fluorescentna emisija. Ostali senzori saharida oslanjaju se na promjenu vodljivosti koja se također zbiva tijekom interakcije boroničnih kiselina i saharida.

Okanova skupina (Cambre i Sumerlin, 2011) pripremila je ko-polimere od N,N-dimetilakrilamida (DMA), 3-metakrilamidofenilboronične kiseline (MAPBA), 3-dimetil amino propil akrilamida (DMPAA) i n-butil metakrilata koji kompleksira s poli (vinil) alkoholom. Kada se platinska elektroda obloži ovim spojem, nastaje promjena u interakciji sa saharidima koja dovodi do porasta ionske difuzije. Takva elektroda pretvara se u receptor, osjetljiv posebno na prisutnost glukoze.

Ispituje se mogućnost dostave inzulina pomoću polimera boroničnih kiselina (Cambre i Sumerlin, 2011). Predmet istraživanja je sposobnost boroničnih kiselina da mijenjaju hidrofilnost zbog već spominjane konverzije iz neutralne boronične kiseline u anionski boronatni ester. Većina polimera boroničnih kiselina za dostavu inzulina su hidrogelovi koji ili „natiču“ i nadimaju se ili kolabiraju kao odgovor na porast hidrofilnosti u prisutnosti glukoze. Efekt „naticanja“ potenciranog promjenom u ravnoteži naboja pokušava se iskoristiti za otpuštanje inzulina (Vancoillie i Hoogenboom, 2016).

Dopamin je kateholni neurotransmitter vrlo važan za stvaranje osjećaja zadovoljstva ali istovremeno igra važnu ulogu u regulaciji voljnih pokreta, te se njegove nenormalne razine povezuju s nastankom neuroloških poremećaja, kao što su shizofrenija, Huntingtonova i Parkinsonova bolest (Cambre i Sumerlin, 2011; Hong i sur., 2016). Razina dopamina mjeri se tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (*engl. High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), ionskom kromatografijom i spektrofotometrijom, ali se može koristiti i elektrokemijska metoda jer je dopamin elektrokemijski aktivni spoj. Prednost elektrokemijske metode u odnosu na druge metode je što se elektrode koje se kod nje koriste mogu prilagoditi za mjerenje u živom organizmu. Detekcija razine dopamina konvencionalnom elektrokemijskom metodom oslanja se na jednostavnu oksidaciju dopamina

u dopamin-o-kvione na elektrodama. Preciznost mjerenja smanjuje prisutnost drugih lako oksidirajućih komponenti, npr. prisutnost askorbinske kiseline u moždanim fluidima. Pokušava se iskoristiti boronične kiseline i njihovu osjetljivost na reakciju s diolima kako bi se povećala selektivnost mjernih elektroda na dopaminske koncentracije. Za sintezu elektroda za poboljšanu detekciju dopamina pokušava se koristiti p-amino benzojeva kiselina (PABA). Kod ovakvih elektroda dopamin se vezuje na boronične kiseline na polianilinu, reducirajući električnu provodljivost što omogućava njegovu precizniju kvantifikaciju (Ali i sur., 2007).

1.1.2.3 Derivati boroničnih kiselina

Diazoborini su prvi derivati boroničnih kiselina koji su se ispitivali kao terapeutici i koji su ukazali na potencijal izoelektronske veze bor-dušik (B-N). Istraživanja provedena na njima (Baker i sur., 2009) pokazala su da derivati boroničnih kiselina imaju antimikrobna svojstva protiv širokog spektra Gram-negativnih bakterija.

Boroksini su također derivati boroničnih kiselina, koji nastaju njihovom dehidratacijom. To su šesteročlani heterociklički spojevi koji zahvaljujući jedinstvenoj elektronskoj konfiguraciji mogu reagirati s Lewisovim bazama, i potencijalni su selektivni inhibitori enzima, budući da mogu reagirati s aktivnim mjestima na enzimima. U teorijskim studijama došlo se do zaključka (Hall, 2005) da bi zamjena vodikovih atoma na boru elektronegativnijim supstituentima (npr. fluorom) privukla više elektrona i time pojačala aromatski karakter molekule.

1.1.2.4 Antitumorsko djelovanje boroničnih kiselina i njihovih derivata

Haverić i sur. (Haverić i sur., 2011) istražili su antiproliferacijski, citotoksični i genotoksični potencijal dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) pomoću *alarBlue* testa na bazalnim stanicama karcinoma i limfocitnih kultura primjenjujući citokinetički blok - mikrojezgreni postupak.

Ivanković i suradnici u ranijim istraživanjima (Ivanković i sur., 2014) pokazali su jaku antitumorsku aktivnost dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) koja je usporediva s antitumorskim učinkom 5-fluorouracila. Premda je studija pokazala veliku osjetljivost stanica raka na dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), mehanizam djelovanja nije rasvijetljen. Prema Warburgovom efektu, stanice raka trebaju

dosta glukoze i metaboliziraju je putem anaerobne glikolize. Opetovana aktivacija anaerobne glikolize uzrokuje gomilanje mliječne kiseline, koja nastaje kao produkt redukcije piruvata u laktat. Time se stvara kiselo tumorsko mikrookruženje. Posljedica svega toga je aktivacija hipoksijom inducirano faktora (*engl. Hypoxia-Inducible Factor-1*, HIF-1) (Stubbs i Griffiths, 2010). Inhibicija glikolitičkih enzima jedna je od strategija za zaustavljanje ili usporavanje anaerobne glikolize u tumorskim stanicama (López-Lázaro, 2008).

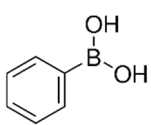
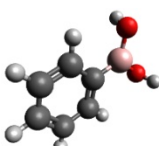
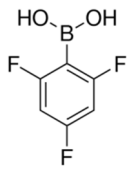
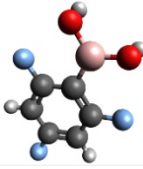
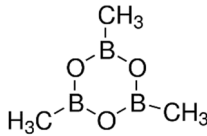
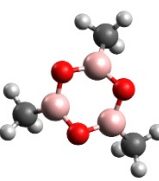
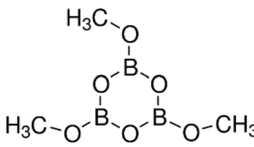
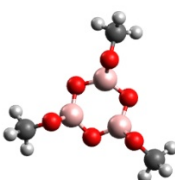
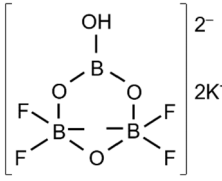
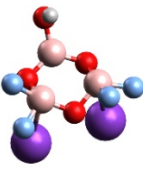
Islamović i suradnici (Islamović i sur., 2014) istraživali su kinetičke parametre i mehanizam inhibicije enzima katalaze u prisutnosti dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). Pokazali su da enzim katalaza slijedi Michaelis-Menteničinu kinetiku u odsutnosti i prisutnosti inhibitora. Prisutnost inhibitora reducirala je maksimalnu brzinu a ostavila Michaelis-Menteničinu konstantu nepromijenjenom, što dovodi do zaključka da se inhibitor podjednako veže za slobodni oblik enzima, kao i na enzim- H_2O_2 kompleks. Pokazano je da mM koncentracije inhibitora umanjuju aktivnost katalaze.

Vullo i suradnici (Vullo i sur., 2014) istraživali su inhibicije humanih karbonanhidraza u prisutnosti dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). Inhibicija raznih izoformi humanih karbonanhidraza povezuje se s tumorogenezom i metastaziranjem tumora. Gotovo sve izoforme enzima bile su učinkovito inhibirane. Izoforma hCa VII povezana s oksidacijskim stresom najučinkovitije je inhibirana. Pretpostavljeno je da je djelovanje dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) povezano s njegovim vezivanjem na cinkov ion u aktivnom mjestu enzima. Pored toga, preliminarna istraživanja inhibicijskog djelovanja na karbonanhidraze iz bakterija i gljivica upućuju na mogućnost njegovog antimikrobnoga i antimikotičkoga djelovanja.

1.1.2.5 Pregled boroničnih kiselina i njihovih derivata istraživanih u ovom radu

U ovom radu istraživane su biološke aktivnosti: citotoksično, antitumorsko, i antioksidacijsko djelovanje te inhibitorno djelovanje na enzime (tirozinazu, heksokinazu, piruvat kinazu, laktat-dehidrogenazu i butirilkolinesterazu), odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata: fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). U Tablici 1 prikazane su formule, strukturne formule, 3D modeli i osnovne obilježja istraživanih spojeva.

Tablica 1. Formule, strukturne formule, 3D modeli i osnovna obilježja spojeva koji se istražuju u ovom radu. Strukturna formula i osnovna obilježja dikalijevogtrioksihidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) preuzeti su iz патената US8278289 i EP1996514 (Galić, 2012; Galić, 2013), a strukturne formule i osnovna obilježja ostalih spojeva preuzete su sa internetskih stranica dobavljača Sigma-Aldricha. 3D modeli molekula nacrtani su u programu Avogadro.

Naziv	Formula	3D model	Osnovna obilježja
FENILBORONIČNA KISELINA	 $C_6H_7BO_2$		Na sobnoj temperaturi bijeli prah, topljiv u vodi i etanolu Molekularna masa: 121,93 g/mol Gustoća: 1,14 g/cm³ Talište: 215°C
2,4,6-TRIFLUOROFENIL BORONIČNA KISELINA	 $C_6H_4BF_3O_2$		Na sobnoj temperaturi bijeli prah, topljiv u vodi i etanolu Molekularna masa: 175,90 g/mol Gustoća: 1,44 g/cm³ Talište: 228-235°C
TRIMETIL BOROKSIN	 $C_3H_9B_3O_3$		Na sobnoj temperaturi prozirna tekućina, topljiva u vodi i etanolu Molekularna masa: 125,53 g/mol Gustoća: 0,898 g/cm³ Talište: -38°C
TRIMETOKSI BOROKSIN	 $C_3H_9B_3O_6$		Na sobnoj temperaturi prozirna tekućina, topljiva u vodi i etanolu Molekularna masa: 173,53 g/mol Gustoća: 1,24 g/cm³ Talište: 10°C
DIKALIJEVTRIOKSO- HIDROKSI- TETRAFLUOR- TRIBORAT	 $K_2[B_3O_3F_4OH]$		Na sobnoj temperaturi bijeli prah, topljiv u vodi Molekularna masa: 251,50 g/mol (Spoj nije komercijalno dostupan, pa nema dodatnih podataka iz literature)

Na temelju literaturnih podataka i vlastitih rezultata može se pretpostaviti da bi odabrane boronične kiseline i njihovi derivati, poput dikalijevogtrioksihidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), mogli imati različite i vrlo zanimljive biološke aktivnosti te bi mogli biti razmatrani kao potencijalni lijekovi za razne bolesti.

1.2. Metabolizam tumora

Tumor je naziv za abnormalnu nakupinu stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast (Pecorino, 2012). Prema karakteru i osobinama koje ispoljavaju, tumori se dijele u dvije osnovne skupine:

- benigni (dobroćudni) i
- maligni (zloćudni).

Zloćudnost ili malignost nekog tumora odnosi se na njegovo svojstvo da invadira i razara okolno tkivo, te da stvara udaljene metastaze u organizmu (Pecorino, 2012). Metastaziranje je proces tijekom kojeg se maligne stanice odvajaju od primarnog tumora, te se putem krvi i limfe raznose u udaljena tkiva i organe gdje se od njih formiraju novi, sekundarni tumori. Maligni tumori metastaziraju šireći se u okolinu i infiltrirajući se u druga tkiva. Benigni tumori ne metastaziraju na druge organe, ne infiltriraju se u okolno zdravo tkivo, već ga samo potiskuju. Termin rak (engl. cancer), koji se često upotrebljava, odnosi se na maligne tumore.

Iako postoji više od 100 različitih vrsta tumora, svi oni se prema vrsti tkiva od kojeg su nastali mogu podijeliti u četiri osnovne skupine (Pecorino, 2012):

- karcinomi – tumori koji nastaju od epitelnih stanica (stanice koje pokrivaju tijelo, oblažu tjelesne šupljine i unutrašnje organe i formiraju žlijezde);
- sarkomi – tumori koji nastaju od mezenhimnih stanica (stanice koštanog, hrskavičnog, mišićnog, masnog, kao i nekog drugog vezivnog ili potpornog tkiva);
- limfomi i leukemije – tumori koji nastaju od stanica krvi;
- neuromi – tumori koji nastaju od stanica nervnog tkiva.

Liječenje raka jedna je od najkompleksnijih vrsta terapija u medicini. Tri su glavna načina liječenja raka: kirurško liječenje, lijekovi (kemoterapija, ciljana terapija, imunoterapija, hormonska terapija) i radioterapija (Pecorino, 2012). Najčešće se zbog kompleksnosti bolesti, ali i zbog nedostataka i ograničenja samo jednog terapijskog protokola, kombinira istovremeno više vrsta liječenja.

Danas korišteni načini liječenja raka pokazuju veće ili manje nedostatke i ograničenja, u vidu učinkovitosti, neugodnih nuspojava kod pacijenata (mučnina, gubitak kose, ekstremna nelagoda, slabljenje imunostnog sustava) ili su cjenovno nedostupni za širu populaciju.

Zato danas još uvijek traje potraga za novim sigurnijim i učinkovitijim lijekovima. Da bi se rak moglo uspješno liječiti važno je shvatiti način na koji funkcioniraju stanice raka.

1.2.1. Warburgov efekt

Njemački biokemičar Otto Heinrich Warburg smatra se jednim od vodećih staničnih biokemičara koji je prvi uočio korelaciju između stanica raka i promjene pH ljudskog organizma. U svojem djelu „Metabolizam tumora u tijelu“ (Warburg i sur., 1927), Warburg je pokazao da svi kancerogeni oblici ispunjavaju dva temeljna uvjeta: krvnu kiselost i hipoksiju (pomanjkanje kisika). Stoga prema njemu, karcinom nije ništa drugo nego obrambeni mehanizam kojeg naše stanice koriste da bi preživjele u kiseloj sredini bez prisutnosti kisika.

Warburg kaže: „Kancerogena tkiva su kisela dok su zdrava tkiva blago lužnata. Pomanjkanje kisika i kiselost su dvije strane iste medalje, ako netko ima jedno, ima i drugo. Oduzmete li zdravoj stanici 35 % njezinog kisika, možete je pretvoriti u stanicu raka za samo dva dana. Sve normalne stanice imaju apsolutnu potrebu za kisikom, ali jedino tumorske stanice mogu živjeti bez njega. To je pravilo bez iznimke”.

Po Warburgu rak je rezultat nepravilnog načina prehrane (pretežno hranom koja zakiseljuje) i fizičke neaktivnosti tijela, čime se u tijelu stvara kisela sredina slabo opskrbljena kisikom. Hrana koja se uzima kako bi se stanice opskrбил energijom razgrađuje se do glukoze koja dalje prolazi metaboličke reakcije sve do formiranja adenozin-trifosfata (ATP). Proces ide kroz dva koraka: prvi je anaerobni metabolizam u citoplazmi-glikoliza, a drugi je Krebsov ciklus u mitohondrijima praćen oksidacijskom fosforilacijom (Kadenbach, 2012). Glikoliza proizvodi ATP brzo, ali za potrebe stanica u zanemarivim količinama, dok aerobni mehanizam zahtjeva više vremena, ali predstavlja efikasniji način proizvodnje ATP-a (Nelson i Cox, 2005).

U onkološkom smislu Warburgov efekt (Warburg i sur., 1927; Warburg, 1956) odnosi se na razliku u načinu korištenja energetske izvora kod normalnih zdravih stanica i tumorskih stanica.

Svaka zdrava stanica može preći na rezervni mehanizam dobivanja energije iz ketonskih tijela u slučaju nedostatka glukoze, odnosno na anaerobnu glikolizu ukoliko nedostaje kisik, ali s mogućnošću povratka na normalni metabolizam čim se uvjeti normaliziraju. Tumorska

stanica ima oštećene mitohondrije (ili im namjerno gasi funkciju kako bi se zaštitila od apoptoze), te na taj način svodi izvore dobivanja energije samo na anaerobnu glikolizu, čiji je krajnji produkt laktat (Vander Heiden i sur, 2009). Iz nekog još uvijek nepoznatog razloga tumorske se stanice ne vraćaju na normalni način funkcioniranja. Zato njihovo „nasilno širenje“, sklonost metastaziranju i sama malignost ovise o njihovoj, neutaživoj gladi prema glukozu i o angiogenezi (ili stvaranju novih krvnih žila) kako bi uspješno otele što više unesene glukoze. Maligne, brzo rastuće stanice trebaju od 8 pa do 200 puta više energije od normalnih zdravih stanica.

Dugogodišnjim istraživanjem metabolizma kancerogenih stanica (tumorski metabolom) (Pecorino, 2012; DeBerardinis, 2008), uočene su sljedeće metaboličke promjene kod gotovo svih oblika tumorskih stanica:

1. visoka aktivnost glikolitičkih enzima (heksokinaze, laktat-dehidrogenaze, piruvat kinaze);
2. povećano iskorištavanje energije iz glukoze za procese sinteze građivnih materijala potrebnih za rast stanica (nukleinskih kiselina, aminokiselina i fosfolipida);
3. visoka stopa ponovne (*de novo*) proizvodnje pirimidina i purina;
4. niska stopa pretvorbe ATP i guanozin-trifosfata (GTP) u citidin-trifosfat (CTP), te uridin-trifosfat (UTP);
5. niske razine adenozin-monofosfata;
6. visoka koncentracija glutamine;
7. otpuštanje imunosupresorskih tvari.

Prema Warburgovoj teoriji, u tumorskoj stanici narušena je funkcija mitohondrija, odnosno pretpostavlja se da je normalna stanica pretrpjela oštećenje uslijed kojeg se pretvorila u tumorsku stanicu, i da prelazi na anaerobnu glikolizu jer je to za nju mehanizam opstanka u nepovoljnim uvjetima (Monteith i sur., 2012; Weinberg i Chandel, 2015; Scott i sur., 2011). Tumorska stanica prolazi kroz niz promjena koje je čine otpornom na prirodan proces samouništenja ili apoptoze (Fox i MacFarlane, 2016; Bortner i sur., 2016). Dolazi do kočenja proizvodnje celularnih obrambenih enzima kao što je glioksalaza 1, što za sobom neminovno vuče promjene djelovanja transkripcijskog faktora HIF-1 (Stubbs i Griffiths, 2010). U uvjetima niske opskrbe kisikom (hipoksije) to promovira sintetiziranje ATP-sintaze, što za posljedicu konačno ima povećanu ekspresiju piruvat-dehidrogenaza-kinaze 1 (PDK1) i mišićne izoforme piruvat kinaze (M2 PK), koja inače kontrolira korak pretvorbe fosfoenol-

piruvata (PEP) u piruvat. Jedan od pokazatelja povećanog korištenja glikolitičkog puta definitivno je porast laktat-dehidrogenaze u krvi oboljelih pacijenata. Laktat-dehidrogenaza konvertira piruvat u konačni proizvod glikolize - laktat ukoliko nije dostupan kisik. Budući da prevelike koncentracije laktata negativno reguliraju laktat-dehidrogenazu, znanstvenici u tome vide mogućnost utjecaja na nastale tumorske stanice (Doherty i sur., 2013).

1.2.2. Moderno razumijevanje raka kao bolesti

Od početka 20-tog stoljeća brojna znanstvena istraživanja tumora, njihovog nastajanja, razvoja i metabolizma dokazala su da tumorske stanice rastu ubrzano, i da za taj razvoj koriste glukozu kao izvor energije. Naravno, ako im je ona dostupna, a ako nije te stanice jednostavno umiru. Na činjenici da rak gotovo isključivo koristi glukozu kao izvor energije razvila se metoda fluorescentnog označavanja glukoze i mjerenje njenog nakupljanja u tumorskim stanicama pomoću pozitron-emisijske tomografije (*engl. Positron-Emission Tomography*, PET) što je znatno pridonijelo ranijem dijagnosticiranju nastanka malignih oboljenja (Young i sur., 1999).

Moderno razumijevanje raka kao bolesti, uzima u obzir da je za pojavu istoga potrebna genska predispozicija, te štetni utjecaji iz okoliša poput zračenja, toksina, te sve većeg ekološkog onečišćenja. Ipak, današnja istraživanja ne pobijaju činjenicu da je aktivacijom onkogeni ili mutacijom gena tipa p53 moguće doći do Warburgovih metaboličkih prilagodbi (Zhang i sur., 2013). Štoviše, istraživanja upućuju da se alternacija u mehanizmu razgradnje glukoze pojavljuje na početku karcinogeneze, te da bi sprječavanje širenja procesa u toj točki uvelike moglo značiti zaustavljanje malignog procesa.

Sve je više zagovornika ideje da se „izgladnjivanjem“ stanica raka može slikovito rečeno pogoditi Ahilova peta tumora, budući da njima za rast i progres neophodno treba energija (Cheong i sur., 2012).

Hipoteza o umiješanosti inzulina u nastanak raka pojavila se 1980-tih godina i predstavlja također zanimljiv pristup koji se neminovno nadovezuje na cijelu Warburgovu tezu. Inzulin je hormon gušterače koji, između ostaloga, potiče ulazak glukoze u određene stanice. Istraživanja povezuju inzulin i faktor rasta sličan inzulinu IGF-1 (*engl. Insulin-like growth factor 1*) s aktivacijom proteinskog metabolizma povezanog s tumorskim stanicama (Iqbal i sur., 2013; Burns i Manda, 2017). Kod brojnih pacijenata oboljelih od najgorih oblika tumora

kao što su rak gušterače, pluća i debelog crijeva zabilježene su izrazito povišene razine inzulina u tijelu, dok je kod animalnih modela koji su držani na skromnoj dijeti s minimumom ugljikohidrata uočena otpornost na razvoj tumorskih oboljenja. Po toj teoriji, rak bi se mogao prevenirati i liječiti promjenom načina prehrane i jačanjem vlastitog imunosnog odgovora na razine na kojima on ima snage označiti i uništiti nefunkcionalne stanice.

Otkriće Otta Warburga označilo je početak značajnog pomaka u detekciji i terapiji tumora, premda je od dvadesetih godina prošlog stoljeća trebalo proći puno vremena da bi njegove teze moderna znanost ponovno stavila u fokus. Razlog za to bio je u razvoju postupaka za dobivanje tumorskih modela *in vitro*, te u načinu dobivanja eksperimentalnog hipotoksičnog okružja. Veliki broj znanstvenika danas ima podijeljene stavove o Warburg-ovom poimanju primarnog uzroka raka: ili ta neminovna metabolička promjena nastaje kao posljedica genske mutacije ili je alternacija staničnog signaliziranja. Ipak svi se slažu da je energetska promjena vidljiva već u početnim fazama razvoja tumora, te da bi zbog toga djelovanje na nju moglo značiti napredak u liječenju i zaustavljanju razvoja bolesti.

1.2.3. Strategije liječenja tumora

U pretkliničkim istraživanjima lijek 6-amino-nikotinamid koji uspješno inhibira glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu pokazuje izrazito antitumorsko djelovanje na različite tipove leukemije, glioblastoma te raka pluća.

Ako privremeno zaustavljanje glikolize dovodi do smrti tumorskih stanica, i tek privremenog i povratnog prelaska normalnih stanica na rezervni mehanizam funkcioniranja, definitivno je važno tražiti inhibitore glikolitičkih enzima, posebice onih koji kontroliraju nepovratne reakcijske korake, kako bi se inhibicija glikolize iskoristila za razvoj novih kemoterapeutika (Jang i sur., 2013; Lu i sur., 2013; Muñoz-Pinedo i sur., 2012; Zhao i sur., 2013; Hsu i sur., 2008; Liu i sur., 2010). Pretpostavlja se da bi redukcija glikolitičkog kapaciteta tumorskih stanica onemogućila njihovu proliferaciju i invaziju u okolna tkiva (Pelicano i sur., 2006). Stoga se razvoj novih lijekova usmjerava i prema inhibiciji glikolitičkog metabolizma u stanicama raka korištenjem inzulina, ali i inhibiciji glikolitičkih enzima (heksokinaze, piruvat kinaze, laktat-dehidrogenaze) koji kataliziraju ireverzibilne reakcije glikolize i predstavljaju važna mjesta za njenu kontrolu. Također, glikolitički kapacitet stanice može se smanjiti korištenjem antioksidansa poput enzima katalaze (Oberley i Oberley, 1997).

Stoga je ovom radu uz istraživanje citotoksičnosti i antitumorskog djelovanja odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata, provedeno istraživanje njihovog inhibitornog djelovanja na glikolitičke enzime (heksokinazu, piruvat kinazu, laktat-dehidrogenazu), kao i istraživanje njihovih antioksidacijskih svojstava.

1.3. Ispitivanje biološke aktivnosti spojeva

Za određivanje biološke aktivnosti spojeva provodi se niz istraživanja na kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) i na različitim živim organizmima (*in vivo*). Na temelju rezultata tih istraživanja pokušava se procijeniti učinak tih spojeva na ljude.

1.3.1. Ispitivanje citotoksičnosti *in vitro*

In vitro istraživanja citotoksičnosti razvijena su kao alternativa klasičnim *in vivo* istraživanjima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. (Kniewald i sur., 2005).

Razvoj *in vitro* istraživanja potaknut je znanstvenim, ekonomskim i etičkim razlozima. Russel i Burch su 1959. godine u svojoj knjizi „Principi humanih eksperimentalnih tehnika“ (engl. „The principles of humane experimental technique“), uveli koncept 3R, koji je postao osnova humanog korištenja životinja danas. 3R predstavljaju:

- **Reduction** - smanjenje broja životinja u eksperimentima koliko je to god moguće;
- **Refine** - poboljšanje uvjeta držanja životinja i svođenje bilo kojeg oblika stresa, boli i patnje laboratorijskih životinja na najmanju moguću mjeru i
- **Replace** - zamijenu *in vivo* istraživanja alternativnim metodama, npr. *in vitro* metodama, gdje god je to moguće.

In vitro istraživanja ne mogu u potpunosti zamijeniti *in vivo* istraživanja na laboratorijskim životinjama, budući da ne mogu u potpunosti odgovoriti na pitanja tkivno specifične toksičnosti, adaptivnog odgovora organizma te metaboličkih promjena koje se zbivaju u živom organizmu. Ipak, pokazuje se da su *in vitro* istraživanja opravdana, jer je dokazana podudarnost za oko 80% rezultata istraživanja toksičnosti provedenih primjenom različitih *in vitro* i *in vivo* istraživanja (Fent, 2001).

Kulturu životinjskih stanica definira se kao pojedinačne stanice koje su izdvojene iz tkiva (tumora), a koje je moguće održavati u umjetnom okolišu, odnosno u *in vitro* uvjetima. Prvi korak je uspostavljanje primarne kulture stanica na način da se izoliraju stanice iz željenog tkiva (tumora), nakon čega slijedi naciepljivanje i uzgoj stanica u hranjivom mediju u optimalnim *in vitro* uvjetima. Budući da ove stanice zadržavaju većinu specifičnih funkcija i svojstva tkiva (tumora) iz kojeg su potekle – što znači da im je broj generacija ograničen jer s vremenom umiru – primarna kultura stanica najbolje odražava *in vivo* uvjete i stoga je najprikladnija za ispitivanja (Benford, 1992).

Pasažiranjem ili subkultiviranjem primarne kulture stanica razvijaju se stanične linije. Stanične linije podrazumijevaju kulturu koja se sastoji od stanica originalno prisutnih u primarnoj kulturi. Obzirom na životni vijek razlikuju se konačne (netransformirane) i kontinuirane (transformirane) stanične linije (Nema i Khare, 2012). Konačne stanične linije karakterizirane su ograničenim brojem generacija (obično 20-80 generacija), a karakteristike kontinuirane stanične linije su uspješna proliferacija, brži rast i promijenjena morfologija stanica (Freshney, 2000). U znanstveno-istraživačkom radu češće se koriste kontinuirane stanične linije animalnog podrijetla.

Prilikom provođenja *in vitro* istraživanja citotoksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost. Bazalna citotoksičnost definira se kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivanog spoja i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu (Ekwall, 1995).

Prednosti *in vitro* istraživanja citotoksičnosti su niža cijena u odnosu na odgovarajuća *in vivo* istraživanja, visok stupanj standardizacije, reproducibilnost i brzina izvođenja, nastajanje manje količine toksičnog otpada te svakako dobrobit laboratorijskih životinja. Također, primjenom staničnih kultura u kratkom se vremenu može analizirati veliki broj spojeva, u širokom rasponu koncentracija, što je svakako dobra preliminarna smjernica za planiranje nastavka istraživanja.

Nedostaci primjene *in vitro* istraživanja su nepotpuna ili u potpunosti odsutna metabolička aktivacija ispitivanog spoja u staničnim sustavima, budući da te stanice ipak imaju izmijenjena svojstva u odnosu na odgovarajuće stanice tkiva (tumora) u živom organizmu, te mogućnost da ispitivani spoj reagira sa sastojcima medija za uzgoj stanica.

Za *in vitro* istraživanja primjenom kultura stanica koriste se različite metode (Radojčić Redovniković i sur., 2016): Crystal Violet metoda, metoda redukcije tetrazolijeve soli (MTT), Kenacid Blue metoda, Trypan Blue metoda, Neutral Red metoda, metoda otpuštanja laktat dehidrogenaze, metoda testiranja proliferacije stanica i smanjenje razine ATP-a (Atterwill, 1995; Fent, 2001).

Crystal Violet metoda, korištena u ovom radu, u osnovi je kolorimetrijska metoda koja se temelji na promjeni boje uzrokovane strukturnim razlikama ili metaboličkim oštećenjima između živih i mrtvih stanica. Primjenom ove metode utvrđuje se broj preživjelih stanica za različite koncentracije ispitivanog spoja, pri čemu je vrijeme izlaganja stanica spoju na različitim koncentracijama jednako.

Primjenom više različitih *in vitro* metoda može se, osim informacije o bazalnoj citotoksičnosti ispitivanog spoja, dobiti ideja o mogućem mehanizmu toksičnosti, budući se metode temelje na različitim principima, dok korištenjem različitih staničnih linija možemo saznati na koju vrstu stanica spoj djeluje.

In vitro istraživanja primjenom kultura stanica imaju široku upotrebu, jer osim inhibitornog djelovanja mogu pokazati i stimulativno djelovanje, odnosno, pozitivan učinak na rast stanica u kulturi. Cilj korištenja *in vitro* istraživanja je ustanoviti relativni stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnost za svaku ispitivanu staničnu liniju, da bi se na temelju rezultata odabrali spojevi koji imaju potencijal kao antitumorski lijekovi za daljnja *in vivo* istraživanja.

1.3.2. Ispitivanje antitumorske aktivnosti *in vivo*

Da bi se dobila cjelokupna slika o djelovanju nekog spoja u organizmu, saznanja dobivena u sklopu *in vitro* istraživanja biološke aktivnosti i saznanja dobivena kroz istraživanja mehanizma funkcioniranja raznim biokemijskim metodama (kao što su ispitivanje: enzimске inhibicije, antioksidacijske aktivnosti, antimikrobne i antifugalne aktivnosti i dr.) provjeravaju se eksperimentima na laboratorijskim životinjama *in vivo*. Obzirom da organizam nije samo zbroj tkiva i organa, *in vivo* istraživanja i danas predstavljaju osnovu biomedicinskih istraživanja.

Laboratorijske životinje koristile su se u prošlosti, a koriste se i danas unatoč nastojanjima da se njihovo korištenje smanji na minimum. Prema principu 3R jedan od ključnih pristupa za

postizanje smanjenja broja životinja je minimizirati raznolikost korištenih životinja tako da se koriste životinje koje su međusobno što sličnije, što se postiže korištenjem visoko srodnih sojeva (Galov, 2012). Isto tako vrlo je važno osigurati zdravlje i visoke standarde brige za životinje, jer bolesne životinje i one pod stresom (koji je uzrokovan boli i patnjom) povećavaju varijaciju eksperimentalnih rezultata.

U biomedicinskim istraživanjima najčešće se kao laboratorijske životinje koriste miševi, jer kao animalni modeli, posjeduju brojne dobre zajedničke karakteristike: kratko gestacijsko vrijeme, rano dostizanje spolne zrelosti, veliki broj potomaka te dostupnost velikog broja normalnih, mutantnih i singeničnih sojeva (Hranilović, 2012). Prema procjeni Britanskog udruženja za aboliciju vivisekcije (engl. *British Union for the Abolition of Vivisection*, BUAV) danas se godišnje vrše pokusi na oko 100 milijuna kralježnjaka, od čega 90% otpada na laboratorijske štakore i miševe (Erhardt, 2012).

Laboratorijske životinje najčešće predstavljaju standardizirane sojeve (Oršolić, 2012) i to: čiste sojeve životinja, životinje s posebnim genskim obilježjima te imunodeficijentne životinje. Čisti sojevi uključuju visokosrođene životinje, koje se dobivaju sparivanjem braće i sestara iz istog legla kroz najmanje 20 generacija, a dijele se na:

- **Singenične životinje** (pojam singeničan dolazi od grčke riječi sungeneia koja znači srodnik) - jedinke koje su genetski identične, ili dovoljno genetski srodne i imunološki kompatibilne kako bi se omogućilo transplantaciju tumora pod približno istim uvjetima;
- **Kongenične životinje** - jedinke koje se razlikuju samo u jednom kromosomskom lokusu ili regiji, pa predstavljaju dragocjen model za proučavanje upravo tog gena.

U ovom radu korišteni su singenični sojevi miševa: BALB/c, C57BL/ 6 i C3H/H.

U cilju što boljeg shvaćanja rasta i metastaziranja tumora te pronalaska odgovarajuće terapije koriste se različiti animalni modeli. S obzirom na nastanak, tumori kod laboratorijskih miševa mogu biti (Oršolić, 2012) spontani ili transplantabilni.

Transplantabilni tumori razlikuju se po svojim metastatskim značajkama. Neki modeli su „spontano“ metastatski i formiraju primarne tumore na mjestu transplatacije, a šire se i na udaljena tkiva u organizmu. Drugi transplantabilni tumori rastu samo na mjestu početne transplatacije tumorskih stanica i ne daju spontane metastaze. Za istraživanja u ovom radu

korištene su tumorske stanične linije koje stvaraju solidne tumore na mjestu početne transplatacije i koje ne stvaraju spontane metastaze.

Terapija ispitivanim spojevima počinje nekoliko dana nakon što se tumorske stanice transplatiraju u laboratorijskog miša te nakon što transplatirani tumor dosegne određenu veličinu. Ispitivani spojevi mogu se aplicirati u vidu otopina: oralno, intratumoralno, intradermalno, supkutano, intramuskularno, intravenski i intraperitonealno, ili pak topikalno primjenom kreme koja sadrži ispitivani spoj. Kod miševa istraživanje se prekida kada volumen tumora prijeđe veličinu od 2000 mm³, ili kada promjer tumora u bilo kojem smjeru postane veći od 1,5 cm, kako je preporučeno u smjernicama za dobrobit i uporabu životinja u istraživanju raka iz 2010. godine (Workman i sur., 2010).

Istraživanja i rad sa životinjama moraju se provesti u skladu s važećim etičkim principima u Republici Hrvatskoj (Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne Novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine br. 135/06) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) # 86–23 1985). Prema članku 32. Zakona o zaštiti životinja pokuse na životinjama, postupke pri proizvodnji bioloških pripravaka i kirurške zahvate na životinjama mogu obavljati samo veterinari, liječnici, farmaceuti, medicinski biokemičari, stomatolozi, agronomi stočari ili biolozi, ako imaju položen ispit za rad sa životinjama.

1.4. Biokemija enzima

1.4.1. Enzimi i kataliza

Jedno od važnih područja interesa i istraživanja u polju kemije su enzimski katalizirane reakcije. Enzimi su biološki polimeri koji kataliziraju kemijske reakcije koje čine život mogućim (Stryer, 1991). U ljudskim stanicama postoji oko 40 000 različitih enzima (LaBerge, 2008), koji kao katalizatori sudjeluju u jednoj ili više različitih kemijskih reakcija. Analizirajući biomedicinsko značenje enzima, važno je naglasiti njihovu nužnost za život, budući da bi bez njih mnoge reakcije koje se odvijaju u stanicama bile prespore ili bi vodile do drugačijih produkata u organizmu. Enzimi su učinkoviti i visoko specifični katalizatori velike molekulske mase, koji zbog svoje velike katalitičke moći, ubrzavaju kemijske reakcije

od 100 do 10000 puta. Uz izuzetak male skupine molekula katalitičkih ribonukleinskih kiselina (engl. *Ribonucleic Acid*, RNA), enzimi su po prirodi prosti ili složeni proteini. Budući da ubrzavaju kemijske reakcije kod bioloških sustava nazivaju se i biokatalizatorima. Poput svih katalizatora, ne troše se sudjelovanjem u reakciji, niti se trajno mijenjaju, a svoju aktivnost gube u uvjetima ekstremnih temperatura, pH, ionske aktivnosti ili u prisutnosti različitih inhibitora. Kataliza se objašnjava na način da se između katalizatora i tvari koje reagiraju stvaraju nestabilni međuproizvodi koji nastavljaju reagirati u procesu, s time da se katalizator oslobađa neizmijenjen.

Enzime kao katalizatore obilježava specifičnost prema supstratu, što je iznimno važna činjenica za funkcioniranje živih bića.

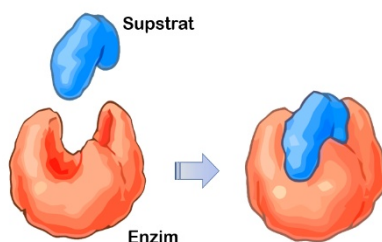
Katalitičke pojave se definiraju ili kroz promjenu brzine kemijske reakcije, ili kroz pokretanje kemijske reakcije općenito, ili kroz usmjeravanje određenim putem kada djeluju samo na određenu reakciju (Štraus i sur., 1997). Obično se o katalizi govori kad se proces ubrzava (pozitivna kataliza), ali postoje i negativne katalize (inhibicije) kada se koriste negativni katalizatori u svrhu usporenja ili zaustavljanja kemijske reakcije.

Kataliza se općenito, pa tako i enzimska kataliza, odvija u tri koraka:

1. enzimi vezuju supstrat i dovode molekule supstrata u najpovoljniji položaj za daljnju reakciju;
2. enzimi sudjeluju kod formiranja i raskidanja veza neophodnih za nastanak produkta;
3. produkt koji je nastao se oslobađa, a enzim se vraća u svoje početno stanje.

Enzimi se često za potpunu funkcionalnost vezuju za određene kofaktore (metalne ione, prostetične grupe ili koenzime) (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997). Većina kofaktora se s enzimima ne povezuju kovalentno. Postoje kofaktori koji mogu biti povezani s enzimom kovalentnim vezama, i takvi se kofaktori nazivaju prostetične grupe. Enzim najčešće sadrži jedno ili više aktivnih mjesta gdje se odvija reakcija sa supstratima. U katalizi enzima sudjeluju funkcionalne skupine aktivnog mjesta enzima, a njega čine aminokiselinski ostaci polipeptidnog lanca i/ili kofaktora. Aktivno mjesto može obuhvaćati samo nekoliko aminokiselinskih ostataka, dok ostatak proteina služi za održavanje potrebne trodimenzionalne strukture. Mnogi enzimi pokazuju izrazitu stereospecifičnost prema kojoj kataliziraju reakcije jednog konformera, ali ne i drugog.

1890. godine Hermann Emil Fischer (1852.-1919.) je predložio tzv. model ključ-brava (Slika 1.) kojim je pokušao objasniti visoku specifičnost kojom enzim prepoznaje svoj supstrat prilikom stvaranja enzim-supstrat (ES) kompleksa. Aktivno mjesto enzima zbog svoje čvrste strukture usporedio je s bravom, dok supstratna molekula funkcionira poput ključa (Koshland, 1995). Ova teorija doživjela je tokom godina sitne modifikacije. Novija saznanja dokazala su da vezivanje supstrata na enzim uzrokuje prelazak supstrata u konformaciju prijelaznog stanja, dok sam enzim prolazi kroz sitne izmjene oblika kako bi se prilagodio supstratu.



Slika 1. Model ključ-brava

U sljedećoj relaciji prikazana je jednostavna enzimska reakcija u kojoj jedan supstrat S uz prisutnost enzima E prelazi u produkt P, stvarajući u međukoraku kompleks enzim-supstrat ES:



Kada se supstrat veže na aktivno mjesto enzima, nastaje aktiviran enzim ili enzim-supstrat kompleks ES, koji ima puno manju energiju aktivacije ili Gibbsovu energiju, čime se ubrzava prijelaz supstrata u produkt. Brzina enzimске reakcije definira enzimsku kinetiku.

1.4.2. Enzimska kinetika i metode mjerenja

Enzimska kinetika je područje biokemije koje se bavi proučavanjem brzine enzimski kataliziranih reakcija, kao i kvantitativnim mjerenjem tih brzina (Stryer, 1991; Leskovac, 2003; Marangoni, 2003; Štraus, 1997). Ona daje informaciju o brzini enzimski katalizirane reakcije, mjeri afinitet enzima prema supstratu ili inhibitoru, te pruža uvid u reakcijski mehanizam kako bi se mogao odrediti red reakcije. Pritom je za određivanje reda reakcije najznačajnija koncentracija supstrata $[S]$, s time da prilikom prelaska u produkt dolazi do promjene koncentracije supstrata.

Reakcija može biti nultog reda u određenim uvjetima i tada brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji reaktanta (supstrata). Reakcije kod kojih je brzina izravno proporcionalna koncentraciji reaktanta nazivaju se reakcijama prvog reda, dok se biokemijske reakcije koje uključuju dva reaktanta, nazivaju reakcijama drugog reda (De Cock i sur., 2004).

Metode određivanja enzimске kinetike standardizirani su laboratorijski postupci za mjerenje brzine kojom dodani enzim katalizira pretvorbu supstrata u produkt. Metodama se mjeri koncentracija produkta ili supstrata u odabranom trenutku nakon početka reakcije. Za različite enzime primjenjuju se različite metode koje ovise i o tipu katalizirane reakcije, o prirodi supstrata, produkta ili koenzima (Štraus, 1997; Štraus i sur., 2009), i to:

- **spektrofotometrijske metode mjerenja:**
 - ❖ **vidljiva i ultraljubičasta spektrofotometrija;**
 - ❖ **fluorescentna spektrofotometrija** - Pojedine molekule nakon što se osvijetle vidljivom ili ultraljubičastom svjetlosti emitiraju zračenja većih valnih duljina što se naziva fluorescencija. Intenzitet ovog zračenja ovisi o količini molekula koje emitiraju zračenja. Ako se supstrat i produkt razlikuju po valnim duljinama emitirane svjetlosti, može se primijeniti fluorimetrija za određivanje brzine reakcije. Nedostaci metode su da ne postoji izravna veza između očitane fluorescencije i koncentracije, te da je fluorescencija jako osjetljiva na promjene temperature i raspršivanje svjetlosti po uzorku.
- **metoda uzorkovanja** - U realnom vremenu izdvajaju se uzorci enzimске reakcije (supstrata ili produkta) i nastavlja se procjena tih uzoraka odgovarajućim drugim kemijskim metodama.
- **elektrodna metoda** - Koristi se za praćenje reakcija kod kojih kao produkti nastaju kiseline. Upotrebljava se staklena ili platinasta elektroda. Kod ove metode koriste se pH uređaji za mjerenje promjene koncentracije H^+ iona za vrijeme enzimске reakcije, odnosno mjeri se promjena pH kako reakcija napreduje.
- **manometarska metoda** - Kao mjerni uređaj koristi se manometar. Ova metoda je prikladna i precizna za reakcije u kojima je jedna od komponenti plin. Koristi se za proučavanja oksidacija (reakcije sa kisikom) ili redukcija pri kojima se izdvađa CO_2 .
- **polarimetrijska metoda** - Kao mjerni uređaj koristi se polarimetar. Ova metoda se koristi kod izomernih reakcija, pri čemu se jedan izomer pretvara u drugi, iz optički

aktivnog u neaktivni ili obratno. Metoda se može koristiti kod enzimskih reakcija, ako su i supstrat i produkt optički aktivni, ali drugačijih specifičnih rotacija.

- **radiometrijska metoda** - Kao mjerni uređaj koristi se radiometrijski pH metar, a tijekom mjerenja iznos pH se održava konstantnim dodavanjem kiselina ili lužina. Uređaji su automatizirani i krivulja napredovanja kemijske reakcije dobiva se automatski.

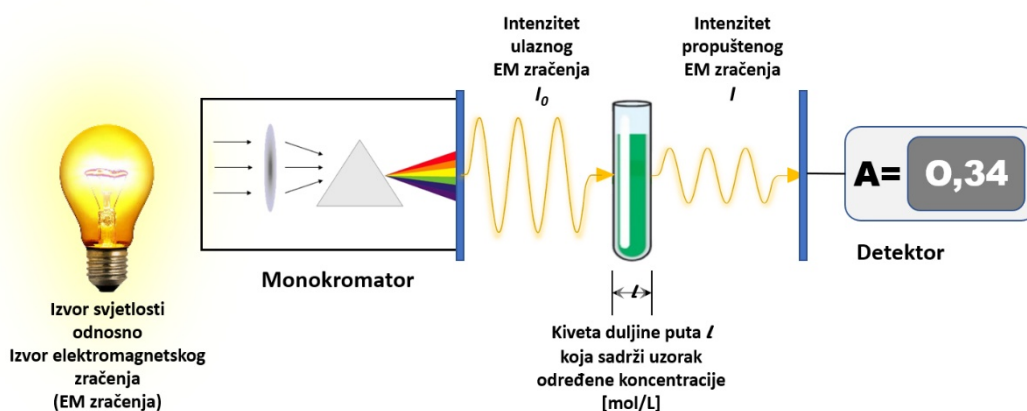
U većini slučajeva aktivna molarna koncentracija enzima nije poznata. Količina enzima se mjeri pomoću njegove aktivnosti i izražava se „enzimskim jedinicama“ i označava sa U (engl. *Unit of rate*) (Štraus, 2009).

1.4.2.1 Vidljiva i ultraljubičasta spektrofotometrija

Zbog niza prednosti, u ovom doktorskom radu je korištena vidljiva i ultraljubičasta spektrofotometrijska metoda za ispitivanje enzimске aktivnosti i/ili inhibicije.

Mnogi supstrati i produkti enzimskih reakcija apsorbiraju svjetlost u vidljivom dijelu ili u ultraljubičastom dijelu spektra. Uglavnom supstrati i produkti ne apsorbiraju pri istim valnim duljinama. Za vrijeme pretvorbe supstrata u produkt događa se značajna promjena apsorpcije svjetlosti određene valne duljine, te se mjerenjem te promjene može proces reakcije pratiti kvantitativno. Na Slici 2. prikazano je shematski kako radi spektrofotometar.

Enzim nesmetano reagira sa supstratom, a njegovo djelovanje ne utječe na spektrofotometrijsko praćenje opadanja koncentracije supstrata i porast koncentracije produkta.



Slika 2. Shematski prikaz rada spektrofotometra

Prednosti vidljive i ultraljubičaste spektrofotometrijske metode su:

- lako je provediva;
- mjerenje je jednostavno;
- osjetljiva je na male promjene koncentracije supstrata/produkta;
- dovoljni su mali uzorci;
- promjene unutar reakcije mogu se kvantitativno izraziti.

1.4.2.2 Analiza utjecaja okoline na mjerenja

1.4.2.2.1 Temperatura

Enzimske su reakcije osjetljive na promjene temperature. Brzina enzimske reakcije se povećava povišenjem temperature. Promjena temperature od 10⁰ C može uzrokovati promjenu katalitičke aktivnosti enzima i do 10% (Štraus i sur., 1997).

Povišenjem temperature brzina enzimske reakcije se povećava do određenog maksimuma, a dalje se pri višim temperaturama smanjuje zbog inhibicije uzrokovane denaturacijom enzimskog proteina (Štraus i sur., 1997; Štraus, 2009). Temperaturna inaktivacija enzima ovisi o trajanju povišene temperature, o koncentraciji supstrata, o pH i o vrsti pufera.

Stoga je iznimno važno mjerenja enzimske aktivnosti vršiti pri konstantnoj temperaturi, ali i točno znati koja je to temperatura.

Međunarodna unija za biokemiju i molekularnu biologiju (engl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB) je 1961. godine preporučila da se mjerenja enzimske aktivnosti vrše pri 25⁰ C, te je ta temperatura općeprihvaćena standardna temperatura u kemiji. Pokazalo se da je ovu temperaturu teško održavati u usko propisanim granicama. Stoga je unija 1964. godine predložila kao radnu temperaturu 30⁰ C, što je temperatura koja je u Hrvatskoj prihvaćena kao standard za mjerenja enzimskih reakcija (Štraus i sur., 1997).

1.4.2.2.2 pH i pufer

Katalitička aktivnost enzima ovisi o pH sredine u kojoj se zbiva reakcija (Marangoni, 2003; Štraus i sur., 1997; Štraus, 2009). Svaki enzim ima svoj pH optimum kod kojeg je aktivnost najveća. Optimalni pH ovisi o vrsti i ionskoj aktivnosti pufera, o temperaturi, a često i o

koncentraciji supstrata. Obično su pH optimumi raznih enzima između 4 i 8, ali ima enzima s ekstremno niskim pH (1,5) ili ekstremno visokim pH (10).

1.4.2.2.3 Aktivatori i inhibitori

Aktivatori i inhibitori utječu na enzimsku aktivnost (Štraus i sur., 1997; Štraus, 2009). Najčešći aktivatori su razni ioni, pa je tako npr. za punu katalitičku aktivnost amilaze potreban kao aktivator ion Cl^- , a za alkalnu fosfatazu ioni Mg^{2+} i Zn^{2+} , a za arginazu Co^{2+} i sl.

Za mjerenje pune katalitičke aktivnosti enzima potrebno je da reakcijska smjesa sadrži potrebne aktivatore, ali je potrebno i spriječiti djelovanje eventualnih inhibitora.

1.4.3. Enzimska kinetika - matematičko modeliranje

Svrha matematičkog modeliranja općenito jest da se stvarna događanja pokušaju opisati matematičkim relacijama čiji se parametri određuju pomoću odgovarajućih mjerenja, a na temelju matematičkih modela trebali bi se prognozirati neki budući događaji (Wong i sur., 2015). U slučaju enzimskih reakcija, matematički modeli i mjerenja *in vitro* trebaju omogućiti pripremu za ciljana mjerenja *in vivo*. Kako se radi o procjenama budućih stanja ljudskog organizma, matematički modeli koji se koriste kod istraživanja enzima su od iznimne važnosti.

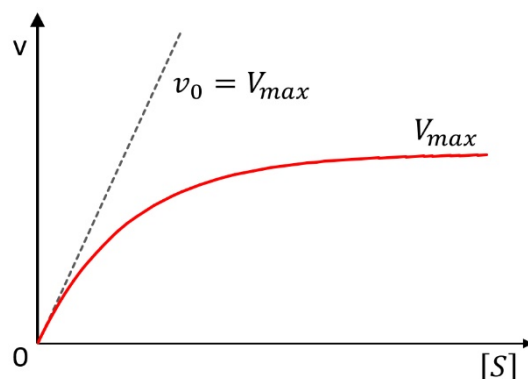
Brzina enzimske reakcije ili enzimska kinetika izražava se pomoću opadanja koncentracije supstrata $[S]$ u jedinici vremena, a može se iskazati i promatranjem promjene koncentracije nastalog produkta $[P]$ u jedinici vremena, ili općenito

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} \quad (2)$$

U praksi se brzina enzimske reakcije mjeri nakon početnog miješanja enzima i supstrata (početna brzina reakcije v_0) kako bi se minimizirale reverzibilne reakcije, te kod ustaljenog stanja ili nakon dostizanja stalne koncentracije ES kompleksa.

Promjena koncentracije supstrata odvija se sve dok ne dođe do zasićenja gdje su sve molekule enzima povezane na supstrat (odnosno sve molekule enzima povezane su u ES kompleks) i brzina postaje konstantna, maksimalna brzina reakcije V_{max} (Štraus i sur., 1997; Štraus, 2009).

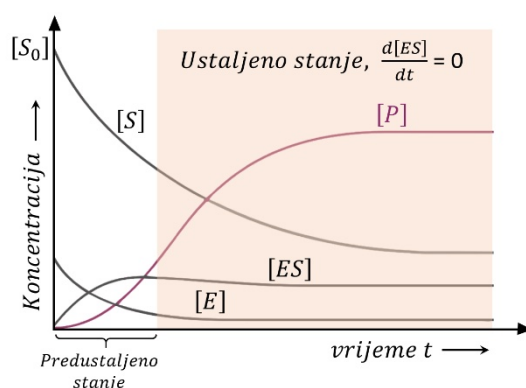
Veza između brzine i koncentracije supstrata uz uvedene pretpostavke ima izgled krivulje na Slici 3.



Slika 3. Grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata $[S]$

Općenito, enzimski reakcija se odvija u tri faze do uspostavljanja ravnoteže (Štraus i sur., 1997; Štraus, 2009; Marangoni, 2003) (Slika 4.):

1. Predustaljeno stanje (gdje raste koncentracija ES kompleksa)
2. Ustaljeno stanje (gdje je konstantna koncentracija ES kompleksa)
3. Postustaljeno stanje (gdje opada koncentracija ES kompleksa)



Slika 4. Vremenski tijek enzimske katalizirane reakcije

U svrhu određivanja kinetičkih parametara enzima praktično je brzinu enzimski reakcije mjeriti upravo u ustaljenom ili stacionarnom stanju, kojeg karakterizira nepromjenjivost koncentracije enzim-supstrat ES kompleksa.

1.4.4. Michaelis-Menteničina jednadžba

Brzina enzimski katalizirane reakcije ovisi o koncentraciji supstrata, te se matematički najčešće predstavlja Michaelis-Menteničinom jednadžbom (Michaelis i Menten, 1913; Stryer,

1991). Prema Michaelis-Menteničinoj teoriji pretpostavljen je matematički model za brzinu enzimske reakcije, i taj je model određen odnosom između početne brzine v_0 i koncentracije supstrata prema slijedećem izrazu,

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

gdje V_{max} predstavlja maksimalnu brzinu reakcije i K_m predstavlja Michaelis-Menteničinu konstantu. Michaelis-Menteničin matematički model vrijedi samo za enzimske reakcije s jednim supstratom.

1.4.4.1 Ostali grafički prikazi enzimske kinetike

Michaelis-Menteničin model nije prikladan za precizno određivanje V_{max} i K_m , te su Lineweaver i Burk predložili prikaz dvostrukog recipročnog oblika Michaelis-Menteničine jednadžbe (Štraus i sur., 1997; Štraus, 2009), poznat kao Lineweaver-Burkov grafički prikaz (Slika 5.), ili

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

gdje je prikazana veza:

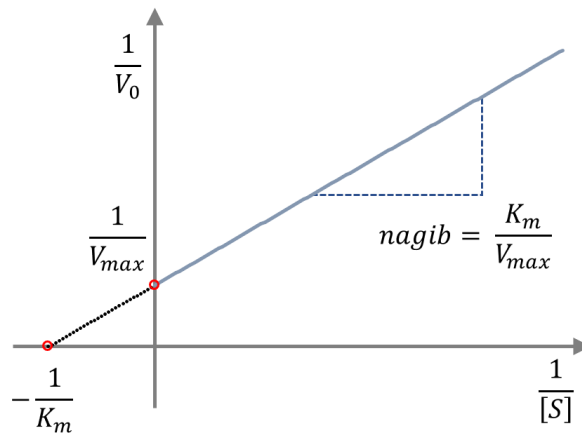
$$\frac{1}{v_0} = \alpha \frac{1}{[S]} + \beta \quad (5)$$

a gdje su:

$$\alpha = \frac{K_m}{V_{max}} \quad (6)$$

$$\beta = \frac{1}{V_{max}} \quad (7)$$

Vrijednosti za V_{max} i K_m očitavaju se iz nagiba pravca i odsjeka apscisa i ordinata grafičkog prikaza (Štraus i sur., 1997; Štraus, 2009). Premda se učestalo koristi Lineweaver-Burkov grafički prikaz (Slika 5.), on ima nedostatak jer su mjerenja neprecizna za povećane koncentracije supstrata što komprimira izmjerene podatke za više koncentracije supstrata u malo područje, istaknuvši niže koncentracije, na kojima su mjerenja najčešće manje precizna.



Slika 5. Lineweaver-Burkov grafički prikaz

Stoga se koriste i drugi oblici grafičkog prikaza izvedeni iz Lineweaver-Burkovog (Yang i sur., 2012) i to:

- **Edie-Hofstee prikaz** - izveden množenjem Lineweaver-Burk jednadžbe s produktom ($v_0 \cdot V_{max}$) ili

$$v_0 = -K_m \frac{v_0}{[S]} + V_{max} \quad (8)$$

Na apscisu se nanose vrijednosti $\frac{v_0}{[S]}$, a na ordinatu v_0 .

- **Hanes-Voolf prikaz** - izveden množenjem Lineweaver-Burk jednadžbe s $[S]$ ili

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} [S] \quad (9)$$

Na apscisu se nanose vrijednosti $[S]$, a na ordinatu $\frac{[S]}{v_0}$.

1.4.5. Inhibicija enzimske aktivnosti

Inhibitori su tvari (obično male molekule) koje se vezuju za enzim ili enzim-supstrat kompleks i smanjuju brzinu enzimski katalizirane reakcije. Pojedini su inhibitori nespecifični tj. djeluju inhibitorno na razne enzime, dok su drugi specifični i inhibiraju samo neke, ili čak samo jedan enzim. Mehanizam inhibicije može biti različit, ali se u pravilu inhibitor veže s enzimom. Učinkovitost inhibitora mjeri se konstantom brzine reakcije inhibitora s enzimom (Sharma, 2012).

Aktivnost pojedinih enzima regulirana je povratnim mehanizmom po kojem završni produkt inhibira enzimsku aktivnost. Glikoliza je dobar primjer takvog povratnog mehanizma. Djelovanje inhibitora na enzim može se opisati kao reverzibilno ili ireverzibilno.

Kod reverzibilne inhibicije uspostavlja se ravnoteža između inhibitora I i enzima E:



Inhibitor formira nekovalentne veze s enzimom ili enzim-supstrat kompleksom kao što je vodikova veza i elektrostatska privlačnost (Štraus i sur., 1997). Jačina vezivanja između enzima i/ili ES kompleksa i reverzibilnog inhibitora definirana je *konstantom inhibicije* K_i . Što je ova konstanta manja, jača je interakcija između enzima, ES kompleksa i inhibitora tj. inhibicija je veća. K_i predstavlja vrlo važan parametar za procjenu potentnosti inhibitora i često se opisuje kao koncentracija inhibitora potrebna da se postigne polovina maksimalne inhibicije.

U slučaju reverzibilne inhibicije razlikuju se tri glavna tipa inhibicije (Štraus i sur., 1997; Štraus, 2009):

- kompeticijska inhibicija,
- nekompeticijska inhibicija,
- akompeticijska inhibicija.

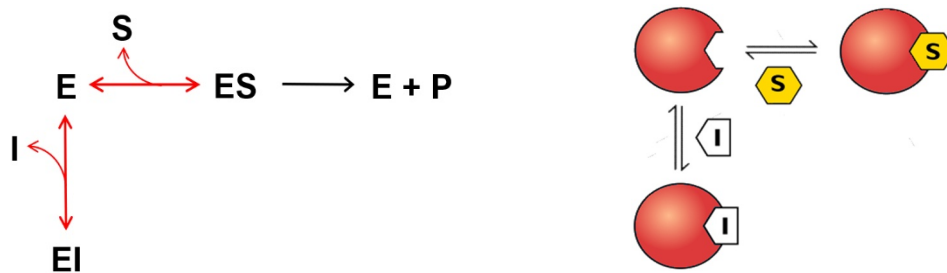
1.4.5.1 Kompeticijska inhibicija

Ovaj tip inhibicije je posljedica djelovanja inhibitora koji ima sličnu kemijsku strukturu kao supstrat, pa se takav inhibitor veže za aktivno mjesto enzima (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997) (Slika 6.). Zbog toga se ne stvara kompleks enzim-supstrat, pa se ne stvara ni produkt.

Kod kompeticijske inhibicije i supstrat S i inhibitor I se natječu za isto aktivno mjesto.

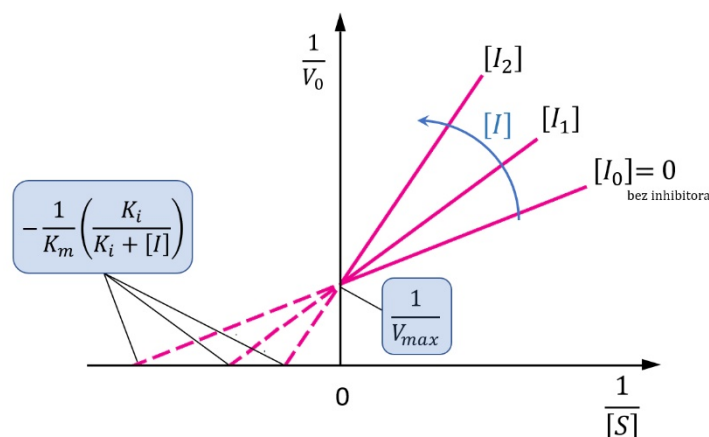
U slučaju kompeticijske inhibicije Michaelis-Menteničina jednadžba ima oblik (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997):

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (11)$$



Slika 6. Kod kompeticijske inhibicije inhibitor i supstrat se natječu za isto aktivno mjesto enzima

Ako se za slučaj kompeticijske inhibicije izvede Lineweaver-Burkov grafički prikaz (Slika 7.), može se uočiti da se i s inhibitorom i bez njega pravci sijeku u istoj točki, ali imaju različit nagib i odsječak na horizontalnoj osi. To znači da V_{max} ostaje ista, a da se konstanta K_m povećava i da nagib pravca raste povećanjem koncentracije inhibitora (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997). Povećanjem koncentracije supstrata može se smanjiti djelovanje ove vrste inhibicije.

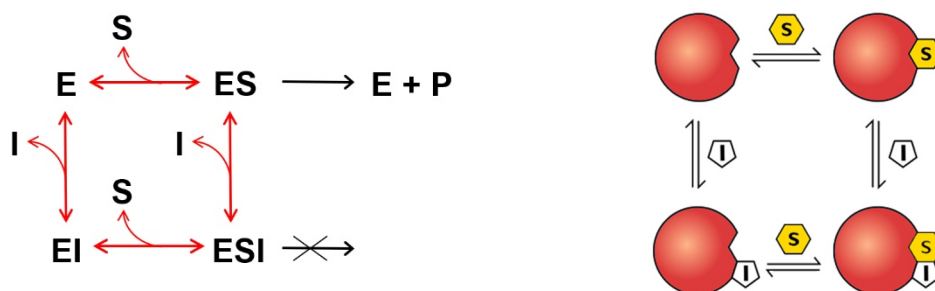


Slika 7. Lineweaver-Burkov grafički prikaz kompeticijske inhibicije za različite koncentracije inhibitora

1.4.5.2 Nekompeticijska inhibicija

Ovaj tip inhibicije predstavlja enzimsku reakciju s jednim supstratom koja rezultira interferencijom pri razgradnji ES kompleksa. Nekompeticijski se inhibitor veže za neko mjesto enzimske molekule izvan aktivnog mjesta i na taj se način mijenja konformacija enzimske molekule (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997). Takva enzimaska molekula veže supstrat budući da joj je aktivno mjesto enzima slobodno, ali enzim u prisustvu inhibitora, ne

može katalizirati reakciju pa ne nastaje produkt (Slika 8.). Zbog stvaranja kompleksa enzim-inhibitor-supstrat EIS preostaje manje slobodnog aktivnog enzima i smanjuje se V_{max} .

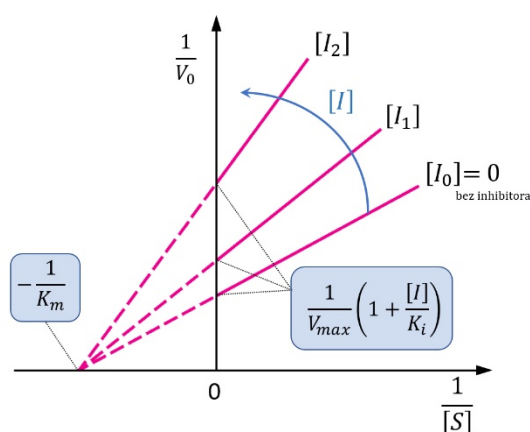


Slika 8. Kod nekompeticijske inhibicije inhibitor se veže za drugo mjesto na enzimu, i mijenja konformaciju enzima, te sprječava nastajanje produkta

Može se izvesti Michaelis-Menteničina jednadžba za ovakav tip inhibicije (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997) :

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (12)$$

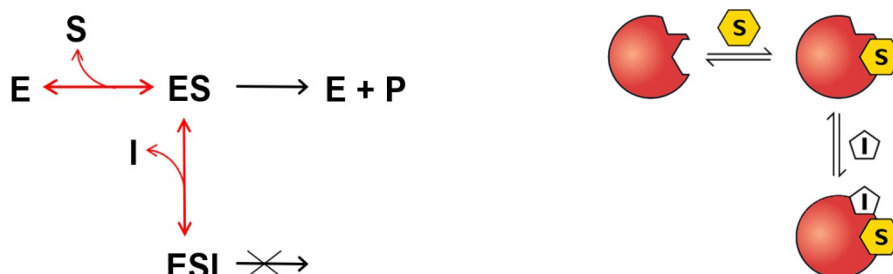
Kod Lineweaver-Burkovog grafičkog prikaza (Slika 9.) ovaj tip inhibicije rezultirao bi povećanjem odsjeka $\frac{1}{v_{max}}$ uz nepromijenjen $-\frac{1}{K_m}$, pa je nagib pravca strmiji nego kod kompetitivne inhibicije budući da se mijenja V_{max} . K_m ostaje ista (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997). Povećanjem koncentracije supstrata ne može se otkloniti ovaj tip inhibicije, jer on ovisi samo o koncentraciji inhibitora $[I]$.



Slika 9. Lineweaver-Burkov grafički prikaz nekompeticijske inhibicije za različite koncentracije inhibitora

1.4.5.3 Akompeticijska inhibicija

Akompeticijska inhibicija nastaje kada se inhibitor veže za već stvoreni enzim-supstrat kompleks, pa je onemogućeno razdvajanje tog kompleksa na produkt i enzim (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997) (Slika 10.).

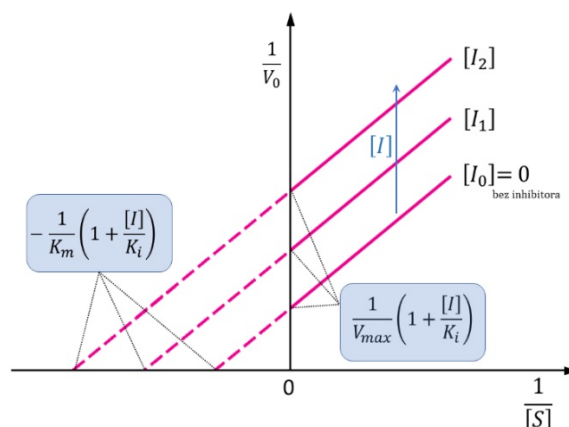


Slika 10. Kod akompeticijske inhibicije inhibitor se veže za već stvoreni enzim-supstrat kompleks, pa je onemogućeno razdvajanje tog kompleksa na produkt i enzim.

Michaelis-Menteničina jednačica za ovaj slučaj je (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997):

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]} \quad (13)$$

Kod Lineweaver-Burkovog grafičkog prikaza (Slika 11.) ovaj tip inhibicije bi rezultirao promjenom odsjeka horizontalne osi $\frac{1}{[S]}$, uz promjenu odsjeka na vertikalnoj osi $\frac{1}{v_0}$, što rezultira povećanjem K_m i smanjenjem V_{max} (Berg i sur., 2015; Štraus i sur., 1997).



Slika 11. Lineweaver-Burkov grafički prikaz akompeticijske inhibicije

1.4.5.4 Određivanje tipa inhibicije i konstante inhibicije K_i

Za određivanje tipa inhibicije enzima i konstante inhibicije K_i za kompleks enzim-inhibitor koristi se Dixonov grafički prikaz (Butterworth, 1973). Učinak inhibitora na brzinu enzimske reakcije v_0 određuje se za dvije ili više koncentracija supstrata, s različitim koncentracijama inhibitora $[I]$. Na grafikonu ovisnosti recipročne vrijednosti brzine $\frac{1}{v_0}$ o koncentraciji inhibitora $[I]$, podaci za svaku koncentraciju supstrata čine pravce koji presjecaju koordinatne osi u točkama $[I] = -K_i$ i $\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}}$ (kod kompetitivne inhibicije) ili presjecaju horizontalnu os u točki $[I] = -K_i$ (kod nekompetitivne inhibicije). Kod akompetitivne inhibicije pravci su paralelni.

Za enzime kao biokatalizatore važno je da rade ispravno, tj. da rade kada je to potrebno i u opsegu koliko je to potrebno za organizam. Pojedina patološka stanja karakterizira upravo to odstupanje od normalne funkcionalnosti, pa je potraga za inhibitorima i aktivatorima enzimske aktivnosti uvijek interesantna.

1.4.6. Enzimi značajni za ciljeve istraživanja u ovom radu

Budući da još nije poznat mehanizam antitumorskog djelovanja boroničnih kiselina i njihovih derivata koji su istraživani u ovom radu, ispitano je kako navedeni spojevi inhibiraju odabrane enzime čija je ekspresija u tumorskim stanicama povećana, i to enzime: butirilkolinesterazu (EC 3.1.1.8), tirozinazu (EC 1.14.18.1.), piruvat kinazu (EC 2.7.1.40.), laktat-dehidrogenazu (EC 1.1.1.27.) i heksokinazu (EC 2.7.1.1.)

1.4.6.1 Butirilkolinesteraza (EC 3.1.1.8)

Animalne kolinesteraze su široko rašireni enzimski sustavi prisutni u kolinergičnim i nekolinergičnim tkivima, u plazmi i ostalim tjelesnim fluidima. Predstavljaju grupu enzima koji kataliziraju hidrolizu acetilkolina i ostalih kolinskih estera. Dije se u dva različita razreda ovisno o specifičnosti prema supstratu, ponašanju u odsutnosti supstrata te prema osjetljivosti na inhibitore (Chatonnet i Lockridge, 1989). Prvi razred čine acetilkolinesteraze takozvane „prave kolinesteraze“, dok drugi razred čine butirilkolinesteraze ili nespecifične pseudokolinesteraze (serum kolinesteraze). Prave kolinesteraze - acetilkolinesteraze pronađene su manje-više u svim tkivima, ali je njihova ekspresija povećana u centralnom i

perifernom živčanom tkivu, mišićima i eritrocitima. Općenito su to enzimi s velikim prometnim brojem koji pokazuju visoki afinitet prema acetilkolinu, a mali afinitet prema nekolinskim esterima, dok ih povećana koncentracija kolinskih estera inhibira (Patočka i sur, 2004).

Butirilkolinesteraze su α -glikoproteini sa polu životom oko 12 dana, koji se nalaze također u manje-više svim tkivima, ali je njihova ekspresija povećana u središnjem i perifernom živčanom sustavu, jetri, crijevima, bubrezima, srcu i plućima. Butirilkolinesteraze se nalaze i u serumu gdje sa svojim kapacitetom za hidrolizu estera imaju važnu ulogu u detoksikaciji. Butirilkolinesteraze primarno kataliziraju reakciju pretvorbe butirilkolina, ali se kao supstrat može koristiti i acetilkolin. U odnosu na acetilkolinesteraze, butirilkolinesteraze imaju niži afinitet za acetilkolin, i ne inhibiraju ih visoke koncentracije acetilkolina (Patočka i sur, 2004).

Nedavno provedena istraživanja na raku dojke (Bernardi i sur., 2010) pokazala su jako sniženu razinu butirilkolinesteraze u plazmi ljudi oboljelih od raka. Zasada se smatra da bi to mogla biti posljedica sekundarne anoreksije nastale zbog tumorske metaboličke prilagodbe, no potrebna su daljnja istraživanja da bi se mogli donijeti čvršći zaključci.

Homologija slijeda aminokiselina za acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu iznosi 65 %. Ovi enzimi imaju slične molekulske strukturne oblike i slične strukture aktivnog mjesta, unatoč činjenici da su produkti različitih gena (Greig i sur., 2002). Monomerni oblik enzimskog sustava kod kolinesteraza uglavnom je sastavljen od oko 574 aminokiseline koje sadrže nekoliko ugljikohidratnih lanaca vezanih na asparagin (Pohanka, 2011). Uz to sadrže tri međulančana disulfidna mosta koji pomažu da se dobije specifičan trodimenzionalni kuglasti oblik. Disulfidni mostovi dobivaju na značaju pri stvaranju dimera koje disulfidna prisutnost stabilizira (Patočka i sur, 2004; Pohanka, 2011). Šest od 14 aromatskih aminokiselinskih ostataka stvaraju aktivno mjesto acetilkolinesteraze, dok su te iste aromatične aminokiseline zamijenjene alifatskim ostacima kod butirilkolinesteraze, što dovodi do toga da je aktivno mjesto butirilkolinesteraze volumenski veće od aktivnog mjesta acetilkolinesteraze, te su enzimi različito osjetljivi prema inhibitorima (Patočka i sur, 2004; Chatonnet i Lockridge, 1989)

Aromatske tvari (npr. aflatoksini) posjeduju veći afinitet prema acetilkolinesterazi nego prema butirilkolinesterazi. Karbamat inhibitori vezuju se na aktivno mjesto obaju kolinesteraza, ali kovalentna veza nije uvijek postojana i nakon određenog vremena dolazi do njihove hidrolize (Groner i sur., 2007). Osim njih, oba enzima mogu biti inhibirana djelovanjem brojnih sekundarnih biljnih metabolita ili metabolita gljiva. Kao primjer mogu se navesti galantamin, huperzin, α -kakonin, α -solanin, tomatin, berberin, palmatin i jatrorizin koji su svi odreda biljni alkaloidi (Pohanka, 2014).

Acetilkolinesteraza nosi epitet jednog od najbržih poznatih humanih enzima, što je razumljivo s obzirom na njegovu funkciju brze hidrolize neuroprijenosnika acetilkolina na sinapsama, dok je djelovanje enzimskog sustava butirilkolinesteraza čvrsto povezano sa kolinergičnim protuupalnim putem, dominantno lociranim u krvi i mišićima. Taj put predstavlja poveznicu između terminalnog živčanog tkiva i makrofaga, te utječe na ekspresiju $\alpha 7$ nikotin acetilkolin receptora ($\alpha/nAChR$) na njihovoj površini (Pohanka, 2014).

Povećana aktivnost butirilkolinesteraze uočena je kod oboljelih od debljine, šećerne bolesti, uremije, hipertireozma i hiperlipidemije. Zanimljiva činjenica je da količine butirilkolinesteraze drastično opadaju u krvnoj plazmi pri akutnim ili kroničnim oštećenjima jetre, ciroze ili metastaza jetre, te se donekle koristi kao biomarker organskih oštećenja (Pohanka, 2014). Niske razine butirilkolinesteraze zabilježene su i kod ljudi sa slabom proteinskom prehranom, tijekom stresnih razdoblja i kroničnih ili akutnih upalnih procesa, a dodatna istraživanja uspjela su enzim dovesti u korelaciju s razinom kolesterola i triglicerida u krvi (Haghnazari i sur., 2016).

Danas se oba enzima, i acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza, najčešće ipak spominju u kontekstu liječenja i dijagnosticiranja Alzheimerove bolesti. Alzheimerova bolest je kronična i progresivna neurodegenerativna bolest koju karakterizira degeneracija kolinergičnih neurona u područjima mozga, posebno vezanih za funkcije pamćenja i svjesnosti samog sebe i okoline. Može se reći da β -amiloidni plakovi i neurofibrilna klupka čine patološke biljege razvoja Alzheimerove bolesti. Evidentne su i reducirane razine acetilkolina zbog bitno smanjene funkcije acetilkolinesteraze, dok je paralelno uočen porast aktivnosti sustava butirilkolinesteraze (Patočka i sur, 2004). Ispitivanjima na „knockout“ miševima zaključeno je da pojačavanjem sustava butirilkolinesteraze organizam pokušava nadoknaditi odsutnost acetilkolinesteraze, moglo bi se reći da „pokreće“ rezervni mehanizam. Iako tijelo pokušava

popraviti nastalu situaciju, dugoročno gledano djelovanjem butirilkolinesteraze dolazi do razvoja i progresije bolesti. Butirilkolinesteraza cijepa amiloidne proteinske prekursore, kojih u normalno funkcionirajućem mozgu ima u izobilju u β -amiloidne proteine. Potom ti isti proteini stvaraju neželjene plakove. Stoga se danas znanstvenici trude pronaći efikasne inhibitore butirilkolinesteraze (Patočka i sur., 2004; Greig i sur., 2002).

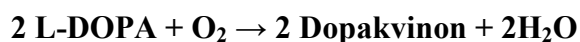
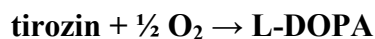
Poznati su sintetski lijekovi generičkih naziva *donepezil* i *tacrin* (1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amin). Tacrin je puno poznatiji jer lakše prelazi moždanu barijeru i uspješno aktivira zaustavljenu acetilkolinesterazu, a malo manje, ali još uvijek dovoljno inhibira pojačanu butirilkolinesterazu. Ipak, nakon nekog vremena kliničkog korištenja povučen je iz upotrebe zbog popratne hepatotoksičnosti. I drugi predstavnici ove grupe lijekova također pokazuju nepoželjne nuspojave pa zato potraga za odgovarajućim aktivatorom acetilkolinesteraze i inhibitorom butirilkolinesteraze, sa manje nuspojava i dalje traje (Dronfield i sur., 2000).

1.4.6.2 Tirozinaza (EC 1.14.18.1)

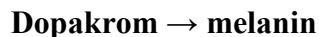
Tirozinaza je metaloenzim koji spada u grupu oksidoreduktaza. Humana tirozinaza je transmembranski protein uvršten u melanosome (Hearing i sur., 1987), to jest aktivno mjesto enzima se nalazi u melanosomima, dok se mali katalitički neesencijalan dio molekule proteže u citoplazmu melanocita. Dva iona bakra u aktivnom mjestu enzima vrše interakciju sa dikisikom, kako bi formirali visoko reaktivan intermedijer, koji će potpomoći oksidaciju supstrata.

Ovaj enzim pronađen je gotovo u svim tipovima stanica biljnog, gljivičnog i životinjskog svijeta. Zanimljiv je, jer mu supstrat nije specifičan, već katalizira reakcije više različitih supstrata. Uglavnom se radi o oksidacijama različitih fenolnih ostataka. Svoje ime duguje aminokiselini tirozinu. Dugo vremena smatralo se da je tirozinazi u životinjskom svijetu jedini supstrat tirozin, pa joj je tako formirano ime koje se kasnije nije mijenjalo. U biokemijsko-medicinskom svijetu poznata je i pod sljedećim nazivima: monofenol monooksidaza, fenolaza, monofenol oksidaza i krezolaza (Chang, 2012).

Funkcija tirozinaze u stanicama najizraženija je kod tvorbe pigmenta melanina iz tirozina. Enzim tirozinaza katalizira prve dvije reakcije u sintezi melanina: oksidaciju tirozina i nakon toga oksidaciju L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA). Sinteza melanina iz tirozina prikazana je sljedećim reakcijama:



(14)



Melanin je pigment u koži koji je odgovoran prvenstveno za njenu boju, a potom i zaštitu od štete nanesene ultraljubičastim (engl. *UltraViolet*, UV) zračenjem. Reakcija biosinteze melanina ne bi bila moguća bez enzima tirozinaze. Tirozinaza katalizira hidroksilaciju L-tirozina u L-DOPA-u koja se potom oksidira u dopakvinon, te postepeno prelazi u dopakrom (narančasto-crveni pigment). Konačno dopakrom prelazi u crno-smeđi melanin (Chang, 2012).

Aktivnost enzima može se pratiti pojavom dopakroma na 475 nm valne duljine, što naravno omogućava primjenu standardnih spektrofotometrijskih metoda. Osim nastajanja dopakroma, može se pratiti i nestajanje L-DOPA-e, tirozina ili kisika, te proizvodnja ugljičnog dioksida. Prednost je što reakcije u kojim sudjeluje tirozinaza slijede Michaelis-Menteničinu kinetiku (Winder i Harris, 1991).

U znanstvenim istraživanjima često se koristi tirozinaza ekstrahirana iz gljiva šampinjona *Agaricus bisporus* jer je taj oblik enzima prilično homologan životinjskom, te je dugo vremena bio jedini komercijalno dostupni oblik tirozinaze (Chang, 2012).

Kod ljudi enzim tirozinaza kodiran je pomoću *TYR* gena, i ako se dogodi mutacija nastaje oboljenje poznato kao albinizam, što se često pojavljuje kao nasljedna bolest i zahvaća u prosjeku jednu osobu na svakih 17000 stanovnika (Song i sur., 2017).

Pojačana aktivnost tirozinaze dovodi do pojačane sinteze melanina, što se nažalost dovodi u korelaciju (Ali i sur., 2016; An i sur., 2009; Balcos i sur., 2014) s nastankom jednog od danas najzloćudnijih tumora-melanomom. Smanjivanje aktivnosti tirozinaze (inhibicija tirozinaze) glavna je meta prevencije hiperpigmentacije kože poznate kao melazma i staračke pjege (Uchida i sur., 2014).

U literaturi se spominju sljedeći tipovi inhibitora tirozinaze (Chang, 2012):

- reducirajući agensi (kao što je askorbinska kiselina koji uzrokuju kemijsku redukciju dopakroma);
- dopakvinon hvatači (komponente koje sadrže tiol i reagiraju s dopakvinonom stvarajući obezbojene produkte);
- alternativni fenolni supstrati;
- nespecifični enzimski inaktivatori (poput baza i kiselina);
- specifični enzimski inaktivatori (poput katehola, nazvani i “samoubilački” inhibitori, jer stvaraju kovalentne veze s enzimom i utječu na ireverzibilnu inaktivaciju enzima tijekom katalizirane reakcije).

Posljednje dvije vrste inhibitora nazivaju se pravim inhibitorima, jer se doista vezuju na enzim i tako ometaju njegovu aktivnost. Ostali inhibitori su tzv. „zabunom nazvani inhibitori“, što je po nazivu doista čudna kategorija, ali zapravo znači da ti inhibitori nemaju snažnu inhibiciju i da njihovo vezivanje na aktivno mjesto enzima uglavnom nije favorizirano, te se događa samo pod određenim okolnostima (Chang, 2009).

Tirozinazu inhibiraju tvari koje čine komplekse s bakrom kao što su benzojeva kiselina i cijanid. Jedan od najpoznatijih tirozinaza inhibitora definitivno je mješoviti tip inhibitora kojična kiselina ($C_6H_6O_4$), koja je zapravo metabolit raznih gljiva. Trenutno se intenzivno koristi u kozmetičke svrhe posvjetljivanja kože, ali i kao aditiv hrani da se spriječi njeno posmeđivanje. U literaturi se zbog svoje aktivnosti, ali i dostupnosti, najčešće koristi kao pozitivna kontrola pri određivanju aktivnosti tirozinaze.

Zbog uloge inhibitora u sprječavanju vidljivog starenja kože (Chang, 2012), zadnjih pet godina lista poznatih inhibitora tirozinaze znatno je proširena na:

- polifenolne spojeve;
- benzaldehid;
- benzoat derivate;
- dugolančane lipide i steroide.

Nakon što je Galić (Galić, 2012; Galić, 2013) pokazao da dikalijevtrioksohidroksi-tetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) djeluje na hiperkeratoze na koži, to jest da tamno obojene izrasline izložene njegovom djelovanju gube boju i nepovratno otpadaju s površine kože, te nakon ispitivanja njegovog citotoksičnog i antitumorskog djelovanja u kojem je primijećen

njegov pojačani učinak na stanice tumora kože i melanoma (Ivanković i sur., 2014), enzim tirozinaza našao se u fokusu istraživanja mogućeg mehanizma djelovanja odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata, koje je provedeno u ovom radu.

1.4.6.3 Piruvat kinaza (EC 2.7.1.40.)

Piruvat kinaza iako pripada razredu beta proteina, u svojoj sekundarnoj strukturi ima kombinaciju i alfa-heliksa i beta-nabranih ploha (Engstrom i sur., 1987). U ljudskom tijelu, ovaj enzim je tetrameran sa mjestom vezivanja za metalne ione na sve četiri domene. Piruvat kinaza je treći glikolitički regulatorni enzim na kojeg utječu alosterički efektori i kovalentne modifikacije. Aktivira se pomoću fruktoza-6-fosfata. Piruvat kinaza katalizira krajnju reakciju glikolitičkog procesa u kojem nastaje piruvat potreban za daljnju pretvorbu u mitohondrijima. Za ovu reakciju nasušno je potreban jedan K^+ ion i dva Mg^{2+} iona. U prvom koraku, β -fosforil kisikov atom iz molekule adenzin-difosfata (ADP) nukleofilno napada fosforni atom PEP-a, pri čemu dolazi do formiranja enolpiruvatne molekule i ATP-a, dok se u drugom koraku enolpiruvat tautomerizira u piruvat. Formiranje visoko-energetskog intermedijera pomoću enolaza u devetom glikolitičkom koraku omogućava sintezu molekule ATP-a (Voet i sur., 2011).

Brojne studije pokazale su da piruvat kinazu inhibira PEP (supstrat koji utječe na enzimsku aktivnost na način da se povećavanjem koncentracije supstrata uspori reakcija), te ATP molekule, piruvat i alanin, koji su negativni alosterički modulatori (Xu i sur., 2012). Osim alosteričkih modulacija moguće je na katalitičku aktivnost piruvat kinaze djelovati kovalentnim vezivanjima, ili fosforilacijom (Jurica i sur., 1998). Ako nema dovoljno kisika dolazi do aktiviranja laktat-dehidrogenaze koja koristi nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH), nastao u reakciji kataliziranoj gliceraldehid-fosfat-dehidrogenazom da bi reducirala piruvat u laktat (Ramos i sur., 2004).

Katalitička reakcija piruvat kinaze je ireverzibilna, i stoga je njenim ometanjem moguće utjecati na glikolitički ciklus, jer ona predstavlja završni korak glikolize.

Postoje četiri tipa tkivno specifičnih izomera:

- jetrena izoforma piruvat kinaze L (L PK) - pojavljuje se u jetri i bubrezima;
- izoforma piruvat kinaze R (R PK) - pojavljuje se u crvenim krvnim stanicama;

- mišićna izoforma piruvat kinaze M1 (M1 PK) - pojavljuje se u svim ljudskim tkivima, dominantno u mišićima, srcu i mozgu;
- izoforma piruvat kinaze M2 (M2 PK) - pojavljuje se u ranom fetusnom tkivu.

L PK - jetreni oblik piruvat kinaze indirektno se regulira pomoću epinefrina i glukagona djelovanjem protein kinaze A, koja vrši ranije spomenutu fosforilaciju i time deaktivira enzim. Pojava epinefrina i/ili glukagona je naznaka stanja „gladovanja“. Zanimljivo je da isti mehanizam ne djeluje kod izoforme M1 PK, tako da glikoliza za vrijeme gladovanja (odnosno u periodu kada nema unosa glukoze) biva zaustavljena u jetri, ali ne i u mišićima. Povišene razine šećera u krvi dovode do lučenja inzulina koji aktivira enzim fosfoprotein fosfatazu 1, što posljedično dovodi do defosforilacije i aktivacije piruvat kinaze (Kim i sur., 2016).

Mutacije u genu za piruvat kinazu dovode do stanja poznatog pod nazivom piruvat kinazna deficijencija, karakterističnog po usporenoj glikolizi. Piruvat kinazna deficijencija posebno pogađa stanice koje nemaju mitohondrije (ili imaju grešku u njihovoj funkciji). Eritrociti su primjer zdravih stanica bez mitohondrija koje u slučaju da izostane djelovanje piruvat kinaze, brzo osjete nedostatak ATP-a i dogodi im se hemoliza. Posljedica piruvat kinazne deficijencije u tom slučaju je razvoj hemolitičke anemije (Twomey i sur., 1967).

S druge strane piruvat kinaza je važan regulatorni enzim za glukoneogenezu, odnosno biokemijski put kojim jetra generira glukozu iz piruvata i ostalih supstrata.

Brojna mjerenja prisutnosti izoformi piruvat kinaze M1 PK i M2 PK pomoću masene spektrometrije dovela su do obećavajućih spoznaja, da je povećana ekspresija M2 PK, naznaka transformacije zdravih stanica u maligne (Chen i sur., 2011; Christofk i sur., 2008), što može biti biljeg početka nastanka tumora, te time pridonijeti bržem otkrivanju tumora i primjeni odgovarajuće terapije.

Predominacija M2 PK u stanicama raka izravno uskraćuje proizvodnju piruvata, i vodi do porasta metaboličkih glikolitičkih intermedijera, što s vremenom dovodi do pokretanja biosinteze nukleotida, kolesterola te masnih kiselina potrebnih za staničnu proliferaciju i podjelu preko puta pentoza fosfata (Huang i sur., 2016).

Smatra se da se u tumorskim stanicama M2 PK pojavljuje u dimerskom obliku, gotovo potpuno katalitički neaktivnom. Kada je piruvat kinaza u svom manje aktivnom ili potpuno

neaktivnom dimeričkom obliku (Chen i sur., 2015), stanica proizvodi energiju degradacijom aminokiseline glutamina u aspartat, piruvat ili laktat (glutaminoliza), čime ponovno dolazimo do Warburgovog efekta (Yang i sur., 2012) koji navodi da tumorske stanice imaju povećanu proizvodnju laktata čak i u prisutnosti kisika.

1.4.6.4 Laktat-dehidrogenaza (EC 1.1.1.27.)

Enzim laktat-dehidrogenaza pripada širokoj grupi 2-ketokiseline-NADP-ovisnih dehidrogenaza, te katalizira reverzibilnu reakciju konverzije 2-hidroksikiseline u odgovarajuće 2-ketokiseline (Holbrook i sur., 1975). Laktat-dehidrogenaza je aktivna u posljednjem koraku anaerobne glikolize i jedan je od danas najproučavanijih enzima. Njena enzimska aktivnost, slično kao i kod heksokinaze, obuhvaća konformacijske prilagodbe u strukturi kako bi uspješno katalizirala transfer hidridnog iona s NADH na C2 atom u molekuli piruvata. Kristalografske analize strukture pokazale su da je tercijska struktura laktat-dehidrogenaze prilično slična malat dehidrogenazi (MalDH), a kasnija mutagena testiranja dokazala su da supstitucijom jedne amino kiseline u katalitički aktivnom dijelu, laktat-dehidrogenaza prelazi u MalDH (Madern i sur., 2001), koja ima puno manju aktivnosti od laktat-dehidrogenaze.

Laktat-dehidrogenaza je zastupljena u gotovo svim živim bićima (životinjama, biljkama i prokariotima) i dominantno katalizira reakcije pretvorbe piruvata u laktat i unatrag, uz pretvorbu NADH u oksidiranu formu nikotinamid-adenin-dinukleotida NAD⁺ i unatrag (Berg i sur., 2015).

Ovaj enzim strukturno je tetramer čija je tercijska struktura dominantno sastavljena od dvije podjedinice: podjedinica laktat-dehidrogenaze A (LDHA, LDHM ili LDH5) i podjedinica laktat-dehidrogenaze B (LDHB, LDHH ili LDH1). Primjetna razlika između ove dvije podjedinice je zamjena alanina (u LDHA lancu) s glutaminom (u LDHB lancu), dok im je aktivno mjesto strukturno iste građe. Vjeruje se da je ta sitna, ali značajna zamjena razlog što se LDHB brže vezuje, što je aktivnost LDHB podjedinice smanjena pet puta u odnosu na aktivnost LDHA podjedinice, te što se katalitička aktivnost LDHA podjedinice ne smanjuje kada se podvrgava istim uvjetima kao LDHB podjedinica (Eventoff i sur., 1977).

Ovisno o obliku i supstratu prema kojem enzim pokazuje afinitet moguće su različite kombinacije ovih podjedinica, pa se laktat-dehidrogenaza pojavljuje u više izoformi i to:

- izoforma laktat-dehidrogenaze 1 (LDH-1), L-laktat dehidrogenaza ovisna o NADP - sadrži četiri LDHB podjedinice;
- izoforma laktat-dehidrogenaze 2 (LDH-2), L-laktat dehidrogenaza ovisna o citokromu c - sadrži tri LDHB i jednu LDHA podjedinicu;
- izoforma laktat-dehidrogenaze 3 (LDH-3), D-laktat dehidrogenaza ovisna o D-laktatu i citokromu c – sadrži dvije LDHB i dvije LDHA podjedinice;
- izoforma laktat-dehidrogenaze 4 (LDH-4), D-laktat dehidrogenaza ovisna o D-laktatu – sadrži tri LDHA i jednu LDHB podjedinicu,
- izoforma laktat-dehidrogenaze 5 (LDH-5), sadrži četiri LDHA podjedinice.

Sve izoforme laktat-dehidrogenaze pokazuju sličnu enzimsku aktivnost, ali nisu jednako zastupljene u svim tkivima.

Laktat-dehidrogenaze s predominantnim udjelom LDHA podjedinica nalaze se u skeletnim mišićima, te ostalim tkivima koja su visoko glikolitički aktivna. Sukladno tome, ove izoforme pokazuju veći afinitet prema piruvatu i veću maksimalnu brzinu reakcije piruvat redukcije. One dakle kataboliziraju piruvat u laktat i stvaraju NAD⁺ nasušno potreban za aktivnost drugih enzimskih sustava (kao što je npr. enzim gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (Doherty i Cleveland, 2013)).

Laktat-dehidrogenaze s predominantnim udjelom LDHB podjedinica zastupljene su u cijelom organizmu, ali dominiraju u srčanom mišiću, jetri i bubrezima. Ove forme konvertiraju laktat u piruvat, čime koristeći laktat kao nutritient omogućavaju stanicama da nastave proces oksidacijske fosforilacije (srce i neuroni) i/ili za glukoneogenezu (jetra i bubrezi). Ekspresija ovih izoformi laktat-dehidrogenaze od medicinske je važnosti jer je proučavanjem opaženo njihovo otpuštanje tijekom tkivnih povreda. Smatraju se biomarkerom za srčana oboljenja (Doherty i Cleveland, 2013).

Piruvat je u normalnim staničnim uvjetima produkt posljednjeg koraka glikolize, a u laktat prelazi u trenucima pomanjkanja kisika ili kada je kisika premalo dostupno. Međutim u zdravim funkcionalnim stanicama visoke koncentracije laktata vrše inhibiciju same laktat-dehidrogenaze, što dovodi do opadanja konverzije piruvata u laktat (Wilkinson, 1970). Laktat-dehidrogenaza nije specifično selektivna, već djeluje na više različitih supstrata, pokazujući značajnu aktivnost prema nekoliko α -keto kiselina, premda su one puno slabiji

supstrati od laktata. α -ketobutirat jedan je od takvih supstrata, endogeni strukturni analog piruvata koji se reducira uz prisutnost laktat-dehidrogenaze, pri čemu kao nusprodukt nastaje 2-hidroksibutirat (Von Morze i sur., 2015).

Laktat-dehidrogenaza postaje puno aktivnija u periodima ekstremne mišićne aktivnosti, sukladno porastu količina supstrata potrebnih za kataliziranu reakciju. Kada se od mišića traži da proizvedu veću energiju, povećana potražnja za ATP molekulama dovodi do nagomilavanja ADP-a, adenzin-monofosfata (AMP) i molekula fosfata. U takvim uvjetima laktat-dehidrogenaza predstavlja prirodnu zaštitu mišića, jer pokretanjem svoje reakcije generira u citosolu NAD^+ koji pokreće gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu da bi se održao citosolni redukcijski potencijal i promovirao protok supstrata kroz drugu fazu glikolize, pri čemu se pokreće proizvodnja ATP-a. Proizvodnja i uklanjanje laktata iz stanica, također uklanja i protone nagomilane u reakciji s laktat-dehidrogenazom, što na neki način djeluje kao puferski sustav za mišićnu acidozu (Spriet i Heigenhauser, 2000).

Nekancerogena stanja koja mogu uzrokovati povećanu ekspresiju laktat-dehidrogenaze obuhvaćaju srčane probleme, hipotireozu, anemije, meningitise, encefalitis, akutne pankreatitise, HIV, te plućna i jetrena oboljenja (Berg i sur., 2015).

Nažalost brojna istraživanja pokazuju da je u kancerogenim stanicama povećana ekspresija ovog enzima (Talaiezhadeh i sur., 2015), tako da se njegova pojačana ekspresija može koristiti kao biološki marker za nastanak tumora, premda se to ne vezuje uz neki specifičan oblik tumora. Medicinsko praćenje razine laktat-dehidrogenaze stoga bi moglo biti jako korisno za ranu detekciju kancerogenih stanja.

Laktat-dehidrogenaza umiješana je u nastajanje tumora i njegov daljnji metabolizam, budući da se oboljele stanice oslanjaju na anaerobnu respiraciju za potrebe konverzije glukoze u laktat, čak i u prisutnosti kisika (Warburgov efekt). Ovaj mehanizam omogućava kancerogenim stanicama da većinu svojih zaliha glukoze pretvaraju u laktat, čak i kada se normaliziraju uvjeti sa opskrbom kisikom, prebacujući jednostavan izvor energije - glukozu u službu drugih funkcija staničnog rasta i proliferacije. Iz ovih razloga deaktivacija laktat-dehidrogenaze (Shi i Pinto, 2014), pogotovo njenih LDHA podjedinica, predstavlja važnu metu u budućim istraživanjima liječenja kancerogenih oboljenja.

Dosadašnja kemijska inhibicija LDHA demonstrirala je zapažene metaboličke promjene, te smanjeno preživljavanje oboljelih stanica (Allison i sur., 2014). Oksamat je dokazani citosolni inhibitor LDHA i dovodi do značajnog smanjivanja produkcije ATP-a u tumorskim stanicama, i povećavanja proizvodnje slobodnih radikalnih oblika u istim stanicama. Reaktivne čestice kisika aktiviraju kinaze što posljedično dovodi do smanjivanja faktora rasta. Konačno, nakupljeni oksidacijski stres dovodi do oštećenja DNA i odumiranja tumorskih stanica (Cooper i sur., 2010).

Povezanost LDHB podjedinice s tumorskim oboljenjima puno je kompleksnija od prethodno opisanog. Znanstvenici koriste termin da je LDHB „ugašen“ pojačanom metilacijom kod nekih tipova tumora, ali je povećana njihova ekspresija kod plućnih karcinoma (Drent i sur., 1996), adenokarcinoma s poznatom KRAS mutacijom, te u raku testisa.

Neki od dosad ispitivanih inhibitora laktat-dehidrogenaze su :

- gosipol (AT-101, prirodan proizvod u sjemenkama pamuka), neselektivni inhibitor laktat-dehidrogenaze koji djeluje tako da blokira vezivanje NADH (Lee i sur., 1982);
- galoflavin - inhibira obje podjedinice laktat-dehidrogenaze te inducira apoptozu hepatocelularnih karcinom staničnih linija i narušava proliferaciju tumorskih stanica raka dojke pri visokim koncentracijama od 250 μ M (Talaiezhadeh i sur., 2015; Farabegoli i sur., 2012);
- N-hidroksiindol blokira više aktivnost LDHA nego LDHB te zaustavlja proliferaciju tumorskih staničnih linija i primarnih tumorskih kultura sa mikromolarnom IC₅₀ aktivnosti (Granchi i sur., 2011).

Aktivnost laktat-dehidrogenaze mjeri se pomoću kolorimetrijskog testa.

1.4.6.5 Heksokinaza (EC 2.7.1.1.)

Heksokinaza je enzim koji je pronađen u dosad svim testiranim organizmima, od bakterija preko kvasaca, biljnih vrsta, animalnih vrsta i ljudi. Heksokinaza se klasificira kao aktivni protein, koji sadrži C-terminalnu katalitičku domenu i N-terminalnu regulatornu domenu povezanu sa alfa uzvojnicom (Ardehali i sur., 1999).

U tkivima sisavaca postoje četiri izoformna oblika heksokinaze koja se međusobno razlikuju po kinetičkim i regulatornim svojstvima, zastupljenosti u tkivima i korištenju različitih kofaktora (Wyatt i sur, 2010; Wilson, 1997; Wilson, 2003), i to:

- izoforma heksokinaze I (HK-I) - pronađena je u svim tkivima i smatra se da je enzim na koji ne utječu fiziološke, hormonalne i metaboličke promjene;
- izoforma heksokinaze II (HK-II) - koja čini osnovni regulatorni oblik izoformnog enzima prisutan u mnogim tkivima, dominantno u mišićima i srcu. Zabilježena je povećana aktivnost ove izoforme heksokinaze u mnogim oblicima tumorskih oboljenja;
- izoforma heksokinaze III (HK-III) - izoforma o čijoj se regulatornoj karakteristici nedovoljno zasada zna, uz izuzetak da je supstratno inhibirana ukoliko koncentracija glukoze premaši fiziološku koncentraciju;
- izoforma heksokinaze IV (HK-IV, glukokinaza) – ova izoforma heksokinaze specijalizirana je za katalitičku konverziju glukoznih molekula u jetri i gušterači. Njezin jedini heksozni supstrat je isključivo glukoza. Zanimljivo je da ovaj oblik nije alosterički inhibiran produktom, odnosno glukoza-6-fosfatom.

HK-I i HK-II nazivamo i mitohondrijskim heksokinazama jer se vezuju na membrane mitohondrija, te kataliziraju prvi korak metabolizma glukoze izravno spajajući citosolnu glikolizu s mitohondrijskom oksidacijskom fosforilacijom (Robey i Hay, 2006). HK-I i HK-II nalaze se u svim tkivima gdje se odvija stanični metabolizam, uz iznimku β -stanica gušterače. Ovi enzimi su aktivni kada je količina dostupne glukoze relativno stabilna ili niska. Aktivnost ovih izoformi heksokinaze slijedi Michaelis-Menteničin kinetički model pri fiziološkim koncentracijama supstrata, i poznate su kao izoforme niskih K_m vrijednosti zbog velikog afiniteta prema glukozi, čak i pri njezinim niskim koncentracijama (Wilson, 1997). Maksimalna brzina reakcije v_{max} ovih heksokinaza je također vrlo niska, zbog čega nije pogodna za brzu pretvorbu glukoze u energiju. HK-I i HK-II prolaze kroz konformacijska prilagođavanja nakon vezivanja glukoze i time se sprječava hidroliza ATP-a. Enzim se alosterički zakoči pomoću fiziološke koncentracije produkta glukoza-6-fosfata (Wilson, 2003). Na ovaj način ulazak novih molekula supstrata u glikolitički metabolički put biva zaustavljen do nove potrebe za njima, odnosno do opadanja koncentracije nastalog produkta.

HK-IV odnosno glukokinaza se nalazi u stanicama jetre i β -stanicama gušterače ljudi i većine drugih kralježnjaka. Afinitet glukokinaze prema glukozi je nizak, što znači da se aktivira samo kada poraste količina raspoložive glukoze (nakon velikog obroka ili priliva ugljikohidrata u organizam). Maksimalna brzina reakcije v_{max} glukokinaze je prilično visoka, što rezultira brzim pretvaranjem glukoze u iskoristivu energiju. Nizak afinitet za glukozu, velika brzina reakcije i odsutnost alosteričke regulacije glukoz-6-fosfatom čine glukokinazu ključnim regulatorom potrošnje glukoze. Zbog toga je nekoliko autora razmatralo glukokinazu kao senzor glukoze u β -stanicama gušterače (Matschinsky, 2002; Zelent i sur., 2005). Opisana je pozitivna korelacija između funkcionalnosti glukokinaze i sposobnosti stanica gušterače da reagiraju na povećane razine glukoze u krvi povećanjem proizvodnje i izlučivanja inzulina. Na sličan način glukokinaza djeluje i na kontrolu glukagona u λ -stanicama gušterače. Glukokinaza u β -stanicama gušterače inducirana je ili aktivirana glukozom za razliku od glukokinaze u jetri, koja je regulirana količinom inzulina. Tkivno specifična regulacija odgovara opažanjima da su glukokinaza u β -stanicama gušterače i u stanicama jetre strukturno različite. Smatra se da glukokinaza ima ulogu senzora glukoze u hepatocitima, gdje sudjeluje u odgovoru na promjene koncentracije glukoze preko povećanja ili reduciranja sinteze glikogena. Također se smatra da neki oblici šećerne bolesti mogu biti posljedica nedostatka glukokinaze u β -stanicama gušterače, hepatocita ili i u jednim i drugima istovremeno. Novija istraživanja (Sanz i sur., 2011) pokazuju da glukokinaza sličnu ulogu ima i u odabranim endokrinim enterocitima, hepatocitima i specijaliziranim neuronima hipotalamusa, čime se sugerira postojanje integralne senzorsko-signalizacijske mreže vezane uz promjenu razine glukoze u organizmu.

Heksokinaza u stanicama sisavaca katalizira ATP-ovisnu fosforilaciju aldo i keto heksoza u heksoza-6-fosfat, s tim da joj je dominantni supstrat ipak glukoz. Fosforilacija glukoze u glukoz-6-fosfat predstavlja prvi korak u nizu metaboličkih reakcija razgradnje glukoze u stanicama, poznatih pod nazivom glikoliza. U tom prvom koraku glikolize, γ -fosforilna skupina ATP-a prebacuje se na kisikov atom na C6 atomu glukoze. Kofaktor su ioni magnezija budući da ATP tek u kompleksu s njima prelazi u aktivni oblik. Ovaj korak predstavlja direktni nukleofilni napad hidroksilne grupe na terminalnu fosforilnu skupinu ATP-a, što dovodi do nastanka gore već spomenutog glukoz-6-fosfata i molekule ADP-a (Colowick, 1973).

Kaže se da je heksokinaza prije vezivanja glukoze otvorene konformacije. Mjesto vezivanja ATP-a relativno je udaljeno od mjesta vezivanja glukoze i usmjereno u drugom smjeru. Nakon vezivanja glukoze dolazi do konformacijske promjene koja utječe na zatvaranje dva velika reznja enzimske strukture, dok ugljikohidratni supstrat ostaje zarobljen u središtu. Sve to rezultira stvaranjem novih vodikovih veza u samom enzimu, ali i između enzima i supstrata (Aleshin i sur., 1998).

Brojna istraživanja provedena na heksokinazi dovela su u korelaciju promjene u aktivnosti heksokinaze s nastupanjem određenih malignih oboljenja. Ključ postojanja mnogih tumorskih oblika jest u povećanom metabolizmu glukoze kao posljedica velike potrebe za energijom, uslijed nekontrolirane proliferacije stanica (Ma i sur., 2016; Gershon i sur., 2013; Abu-Hamad i sur., 2008). U različitim oblicima ljudskih tumora zabilježena je povećana ekspresija enzima heksokinaze, te je ta promjena u ekspresiji dovedena u vezu s procesom metastaziranja tumora. Jedan od boljih primjera su mitohondrijske heksokinaze, čija je aktivnost jako povećana i do 200 puta izraženija u tumorskim stanicama nego u normalnim stanicama, osobito kod agresivnih oblika tumora (Robey i Hay, 2006). Model ponašanja heksokinaze u promijenjenim staničnim uvjetima unutar tumorske stanice, uklapa se u teoriju Warburgovog efekta, pa se pretpostavlja da bi rana detekcija navedenih promjena ekspresije mogla pomoći u bržoj dijagnozi nastanka tumora.

Aktivnost heksokinaze određuje se pomoću nekoliko enzimski kataliziranih kemijskih reakcija. Najprije se vrši pretvorba glukoze u glukoza-6-fosfat preko posredovanja heksokinaze, a zatim se pomoću glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze reakcijom oksidacije dobiva NADH. Nastanak NADH-a podrazumijeva promjenu boje iz prozirne u obojeni produkt koji apsorbira na 450 nm, i izmjerena apsorbancija može se dovesti u direktnu vezu sa aktivnosti heksokinaze (Meryerhof, 1935; Colowick i Kalckar, 1945; Racker, 1947).

1.5. Antioksidacijska aktivnost u živim organizmima

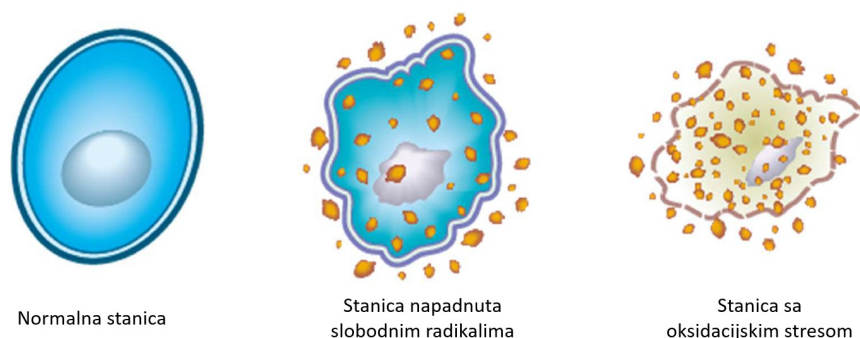
Oksidacijski stres je stanje organizma u kojem dolazi do povećanog stvaranja izuzetno reaktivnih, slobodnih čestica kisika. Takve čestice nazivamo „reaktivne čestice kisika“ ili skraćeno ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*) odnosno na njih se odnosi širi pojam slobodni radikali. Općenito, slobodna reaktivna čestica ili slobodni radikal je atom ili molekula koja sadrži nespareni elektron u valentnoj ljusci, a može biti neutralna, pozitivno ili negativno

nabijena. Nespareni elektroni nisu stabilni pa su takve čestice vrlo reaktivne, te stoga mogu uzrokovati „izgaranje“ (oksidativno oštećenje) drugih molekula. Vrlo često takvi elektroni „povuku“ vodikov atom druge molekule i uzrokuju nastanak novog radikala, čime pokreću lančanu reakciju (Bhattacharya, 2015; Štraus, 2009).

Najveći dio slobodnih radikala nastaje u mitohondrijima, tako da su najčešća mitohondrijska oštećenja i to na membranama i mitohondrijskoj DNA molekuli (De Gray, 1999).

Ljudski organizam posjeduje mehanizme i sustave koji omogućuju uspješnu eliminaciju ROS-a. Ako pak mehanizam obrane zakaže ili djeluje slabijim intenzitetom, u stanicama dolazi do prekomjernog nakupljanja ROS-a što uzrokuje njihovo oštećenje. Oštećene stanice tada više ne mogu normalno funkcionirati (Bhattacharya, 2015; Štraus, 2009).

Nekontrolirano nastajanje slobodnih radikala (bez odgovarajućeg odgovora organizma) dovodi se u vezu sa stimulirajućim djelovanjem inflamatornog citokina ili skraćeno TNF-a (engl. *Tumor necrosis factor alpha*) (Ferlat i Favier, 1993).



Slika 12. Oksidacijsko oštećenje stanice (oksidacijski stres).

Preuzeto i prilagođeno iz (BWell, 2017)

Stanične strukture vrlo su osjetljive na oštećenja slobodnim radikalima, osobito lipidi, bjelančevine i nukleinske kiseline. Npr. znanstvena istraživanja pokazuju da oštećenja kolesterola niske gustoće (engl. *Low-Density Lipoprotein*, LDL), koja se dovode u vezu s pojavom ateroskleroze, nastaju zbog djelovanja slobodnih radikala (Niki, 2010). Također, postoje naznake da slobodni radikali potiču nastanak različitih tipova tumora (Dreher i Junod, 1996), Alzheimerove bolesti (Pimentel i sur., 2012) te različitih upalnih procesa. Isto tako, pod utjecajem slobodnih radikala ubrzava se proces ljudskog starenja (De Grey, 2006).

Razlozi zbog koji dolazi do nakupljanja slobodnih radikala u tijelu mogu biti različiti: izloženost UV zračenju ili drugom obliku radijacije, izloženost zagađenom zraku i duhanskom dimu, unos velikih količina alkohola, toksina ili čak i nekih lijekova, visoke razine glukoze u krvnoj plazmi, ali slobodni radikali mogu nastajati i kao posljedica raznih reakcija u tijelu pri kojima slobodni radikali nastaju slučajno ili namjerno, primjerice kod enzimskih sustava katalize univalentne redukcije molekularnog kisika u superoksidni radikal (ksantin-oksidaza, aldehid-oksidaza, flavin-dehidrogenaza, peroksidaza), kod različitih neenzimskih sustava prijenosa elektrona, kod različitih reakcija autooksidacije, stvaranjem slobodnih radikala u mitohondrijskom elektron-transportnom sustavu, aktivacijom neutrofila itd. (Bhattacharya, 2015; Štraus, 2009).

Najveći dio slobodnih radikala u bio-sustavima su derivati ROS-a, premda je moguća pojava i dušičnih radikala. Slobodni radikali mogu se klasificirati prema redukcijskim potencijalima jednog elektrona izraženim u mV pri pH 7. Kako je vidljivo u dolje prikazanoj tablici (Tablica 2) hidroksilni radikal ima najveći potencijal i stoga pripada među najdestruktivnije slobodne radikale u biološkim sustavima.

Tablica 2. Redukcijski potencijal pojedinih slobodnih radikala (Erickson, 2002; Diplock i Symons, 1991; Warren i Mayer, 2010)

Radikal	Redukcijski potencijal elektrona [mV]
Hidroksil	+2300
Alkoksil	+1600
Peroksil	+1000
Glutation	+920
Urat	+590
Katehol	+530
Tokoferol	+500
Askorbat	+282
Fe³⁺ - EDTA	+120

Ipak, bez slobodnih radikala život ne bi bio moguć. Oni su normalni nusprodukti različitih metaboličkih reakcija. Tijelo ih koristi pri odgovoru imunološkog sustava na napad i infekcije različitim vrstama bakterija. Uravnotežen odnos antioksidansa i slobodnih radikala u tijelu

nužan je uvjet koji mora biti zadovoljen da bi organizam kao bio-cjelina funkcionirao bez oštećivanja makromolekula i tkiva (Štraus, 2009).

Antioksidativna zaštita jest fiziološki proces koji u zdravom organizmu djeluje neprekidno i ima za cilj da spriječi štetno djelovanje prooksidativnih faktora.

Antioksidansi su skupina kemijski aktivnih spojeva prirodnog ili sintetičkog porijekla koji različitim mehanizmima štite stanice vlastitog organizma od štetnog djelovanja oksidacijskog stresa ili slobodnih radikala. Oni sprječavaju oksidaciju biomolekula koja bi se neizbježno dogodila posredstvom generiranih slobodnih radikala u staničnim mitohondrijima, pojačavaju djelovanje imunskog sustava, popravljaju oštećenja nastala oksidacijom, eliminiraju oštećene molekule i djeluju preventivno na mogući nastanak mutacija. Antioksidansi su prisutni u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji oksidira, a značajno usporavaju ili u potpunosti sprječavaju oksidaciju tog supstrata (Štraus, 2009).

Po kemijskom sastavu antioksidansi mogu biti enzimi koje proizvodi sam organizam. Enzimski antioksidansi djeluju tako što razgrađuju i uklanjaju slobodne radikale na način da ih pretvaraju u vodikov peroksid (H_2O_2), a zatim u vodu, u višestupanjskom procesu u prisutnosti kofaktora kao što su bakar, cink, mangan i željezo. No antioksidansi nisu samo enzimi, već to mogu biti i polifenoli i organske molekule koje se sastoje od jednog ili više aromatskih prstenova na koje je vezana jedna ili više hidrofilnih skupina, koje se stvaraju u organizmu ili se u organizam unose hranom. Takve antioksidanse nazivamo neenzimskim antioksidansima. Oni djeluju tako što prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala. Najpoznatiji primjeri neenzimskih antioksidansa su vitamin C, vitamin E, biljni polifenoli, karotenoidi i glutation. Neenzimski antioksidansi čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u biljkama, kojoj pripada više od 8000 različitih spojeva (Nimse i Pal, 2015).

Tijekom antioksidacijskog procesa (Badarinath i sur., 2010), molekule antioksidansa neutraliziraju slobodne radikale prihvaćajući njihove ili donirajući im elektrone čime eliminiraju nesparene elektrone u slobodnim radikalima koji ih čine nestabilnima i reaktivnima. Uglavnom, to znači da molekula antioksidansa postaje novi slobodni radikal, no antioksidativni radikal uvijek je slabo reaktivan te obično biva „ugašen“ djelovanjem drugog antioksidansa ili nekom sebi svojstvenom reakcijom terminacije radikalnog stanja. Antioksidacijske molekule koje u svojoj strukturi posjeduju slabo vezan vodikov atom najčešće vrše neutralizaciju radikalne jedinice donacijom vodika koji se u tom slučaju naziva

reducirajućim ekvivalentom. Tako na primjer djeluje askorbinska kiselina (vitamin C). Donacijom vodika radikalu sama askorbinska kiselina prelazi u svoj askorbat radikalni oblik, koji je stabilan zbog svoje rezonantne strukture. Sam oblik radikal askorbata regenerira se posredovanjem reduktaza ovisnih o reduciranim koenzimima NADH i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH) (Badarinath i sur., 2010).

Uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta putem antioksidacijskih molekula pomaže u prevladavanju oksidacijskoga stresa.

U ljudskom organizmu postoji više različitih enzima kojima je osnovna uloga da sudjeluju u antioksidacijskoj obrani tijela, a najpoznatiji su: superoksid-dismutaza, glutathion-peroksidaza, glutathion-reduktaza, tioredoksin-reduktaza, hemoksigenaza, metionin-sulfoksid-reduktaza, biliverdin-reduktaza te katalaza. U smislu antioksidacijske obrane tijelo sintetizira glutathion i koenzim Q, dok se iz hrane uzima vitamin C (askorbinsku kiselinu), vitamin E (tokoferol) i karotenoidne tvari (Pisoschi i Negulescu, 2012).

1.5.1. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti nekog spoja generalno imaju problem što molekule antioksidansa ne djeluju sve na isti način. Ako se mjerenjem jednom metodom utvrdi da ne postoji antioksidacijska aktivnost, to ne znači da takva aktivnost uistinu ne postoji i da ispitivani spoj ne djeluje antioksidacijski nekim drugim mehanizmom (Apak i sur., 2013).

Antioksidansi mogu iskazivati svoju aktivnost na različite načine. Mogu djelovati prema slobodnim radikalima ili kao donatori ili kao primatelji. Pri tome mogu donirati ili primati u nekim slučajevima elektrone, a u drugim slučajevima H^+ ion.

Gruba podjela dijeli antioksidacijske metode na dvije velike skupine prema mehanizmu reakcije između antioksidansa i supstrata koji prolazi kroz oksidaciju (Alam i sur., 2013; Badarinath i sur., 2010), i to na:

- **HAT** metode (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) ili metode koje se temelje na reakcijama s H-atomom,
- **ET** metode (engl. *Electron Transfer*) ili metode koje se temelje na redukcijama sa oksidansima, a koje se mogu mjeriti.

HAT metodama kvantitativno se određuje sposobnost antioksidansa da „hvata“ slobodne radikale donirajući im vodikov atom putem protonom-praćenog prijenosa elektrona (engl. *Proton-Coupled Electron Transfer*, PCET). HAT metode uglavnom se temelje na praćenju kinetike reakcija. U HAT reakciji, molekula slobodnog radikala se gasi reakcijom prijenosa atoma vodika pri čemu nastaje radikal antioksidansa koji je manje reaktivan, a cijela reakcija obično se manifestira stvaranjem obojenog produkta (Apak i sur., 2007). Najpoznatije HAT metode su:

- **ORAC** metoda (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*).
Metoda se temelji na stvaranju slobodnih radikala upotrebom AAPH (2,2-azobis 2-amidopropan dihidroklorida) i mjerenjem smanjenja fluorescencije u prisutstvu antioksidansa.
- **TRAP** metoda (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*).
Metoda bilježi sposobnost antioksidansa da ometa reakciju između peroksidnog radikala i ciljane fluorescentne probe, pri čemu se mijenja obojenje otopine.
- **metoda β-karoten - linolenska kiselina.**
Metoda se temelji na načelu da linolenska kiselina, koja je nezasićena masna kiselina, oksidira u kontaktu sa ROS. Nastali produkt potiče oksidaciju β-karotena, što rezultira slabljenjem inteziteta obojenja.

ET metode zasnivaju se na jednostavnoj redoks reakciji u kojoj antioksidans reducira slobodni radikal, a pri tom sam oksidira. Kod ovih metoda mjerenja se provode spektrofotometrijski praćenjem kolorimetrijske promjene u jažicama pri karakterističnim valnim duljinama. Nastajanje ili nestajanje obojenja direktno je proporcionalno antioksidacijskoj aktivnosti ispitivanih molekula (Apak i sur., 2007). Najpoznatije ET metode su:

- **DPPH** metoda (engl. *1,1'-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*).
Koristi se stabilni radikal difenilpikrilhidrazil DPPH čija je otopina tamno ljubičaste boje a dodatkom antioksidansa blijedi jer se slobodni radikal reducira u svijetlo-žuti difenilpikrilhidrazin.
- **FRAP** metoda (engl. *Ferric Ion Reduction Potential(Power)*).
U prisutnosti antioksidansa u kiselom mediju dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa Fe^{3+} -TPTZ u plavo obojeni Fe^{2+} -TPTZ (gdje je TPTZ kratica za spoj 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin).

- **Keliranje.**

Koristi sposobnost stvaranja kompleksa između kelatirajućeg sredstva (npr. ferozina ili spojeva iz ispitivanog uzorka) i metalnog iona (npr. željeza Fe^{2+}). Npr. ferozin koji služi kao sredstvo za indiciranje keliranja natječe se za prisutne slobodne ione željeza u prisutnosti drugog kelatora (ispitivanog uzorka), pri čemu se mijenja obojenje otopine.

- **CUPRAC** (engl. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*).

Koristi se redukcija Cu^{2+} iona u prisutnosti antioksidansa pri pH 7, pri čemu dolazi do promjena obojenja otopine.

- **TEAC** metoda (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

Koristi otopinu plavo-zeleno obojenog radikala 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsku kiselinu ABTS^{2-}) čija boja uz prisutstvo antioksidansa blijedi.

- **DMPD** metoda (engl. *N,N-dimetil-p-fenilenediamine*).

U prisutstvu antioksidansa radikal N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) prelazi u kinonski $\text{DMPD}^{\bullet+}$ pri čemu se mijenja obojenje otopine.

- **FC** metoda (ukupna fenolna aktivnost po Folin-Ciocalteu).

FC reagens u alkalnom mediju oksidira fenolne spojeve, pri čemu se prisutne kiseline u reagensu reduciraju u okside koji su plavo obojeni.

Za istraživanja antioksidacijskih aktivnosti spojeva u ovom radu korištene su metode: DPPH, FRAP i keliranje.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj i hipoteze doktorskog rada

Cilj predloženoga doktorskoga rada jest istraživanje bioloških aktivnosti: citotoksično, antitumorsko i antioksidacijsko djelovanje, te inhibitorno djelovanje na enzime (tirozinazu, heksokinazu, piruvat kinazu, laktat-dehidrogenazu i butirilkolinesterazu), odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata (fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksin ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$)). Na temelju dosadašnjih objavljenih rezultata i vlastitih preliminarnih istraživanja pretpostavka je da odabrane boronične kiseline i njihovi derivati, poput dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), mogu imati jake biološke aktivnosti te bi mogli biti razmatrani kao potencijalni lijekovi za razne bolesti.

2.2. Očekivani znanstveni doprinos

Očekuje se doprinos u vidu potpunog profiliranja bioloških aktivnosti: citotoksično, antitumorsko i antioksidacijsko djelovanje odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata (fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksin ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$)). Takođe se očekuje da se profilira sposobnost odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata da inhibiraju odabrane enzime (tirozinazu, heksokinazu, piruvat kinazu, laktat-dehidrogenazu i butirilkolinesterazu). Uz preliminarne studije koje su nedvojbeno pokazale da dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) ima antitumorsku aktivnost, te da inhibira enzime katalazu i karbonanhidrazu, daljnja istraživanja i rezultati ovog istraživanja pridonijet će boljem razumijevanju njegovih antioksidacijskih i inhibitorских svojstava. Također se očekuje utvrđivanje antioksidacijskih i inhibicijskih svojstava ostalih navedenih boroničnih kiselina i njihovih derivata na odabrane enzime što bi impliciralo njihovo moguće antitumorsko djelovanje.

3. MATERIJALI I METODE

Sve kemikalije korištene u eksperimentima kupljene su kod tvrtke Biovit (Zagreb, Hrvatska) zastupnika tvrtke Sigma-Aldrich za Republiku Hrvatsku. Jedino je dikalijevtrioksohidroksi-tetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) sintetiziran na Odsjeku za hemiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Sarajevu, prema izmijenjenoj metodi prethodno opisanoj u literaturi (Ryss i Slutskaya, 1951). Pri provedbi eksperimenata na Kemijsko-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Splitu korištena je digitalna vaga (Kern ALS 120-4) i spektrofotometar Tecan Sunrise.

3.1. Priprema otopina uzoraka odabranih derivata boroničnih kiselina

U svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom, DPPH metodom i metodom keliranja te ispitivanja sposobnosti inhibiranja pet (5) različitih enzima (butirilkinesteraze, tirozinaze, piruvat-kinaze, laktat-dehidrogenaze i heksokinaze) pripravljene su 1 M matične otopine uzoraka svih odabranih spojeva. Matične otopine pripremljene su otapanjem početnih odvaga uzoraka odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata, prikazanih u tablici 3, u 10 mL odabranog otapala. Korištenjem spomenutih matičnih otopina nadalje su pripravljena serijska razrjeđenja u omjerima 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000 i 1:10000, kako bi se dobile otopine manjih koncentracija. Budući da su fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$, P2009), 2,4,6-trifluorofenilboronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$, 524700), trimetil boroksin ($C_3H_9B_3O_3$, 323135) i trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$, T70203) dobro topljivi u jednostavnim alkoholima, za pripremu otopina navedenih spojeva kao otapalo je korišten metanol (CH_3OH), dok je dikalijevtrioksohidroksi-tetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) otapan u destiliranoj vodi.

Sve pripremljene otopine su bistre, prozirne, stabilne tekućine neosjetljive na svjetlost, te su u pauzama mjerenja čuvane u hladnjaku pri temperaturi od 4°C. Iako su metanolne otopine pokazale izrazitu stabilnost, za svaku metodu mjerenja uvijek su pripravljane nove, svježije otopine.

Tablica 3. Početne odvage uzoraka odabranih derivata boroničnih kiselina upotrijebljene za pripravu 1 M matičnih otopina.

Spoj	Odvaga [g]
fenilboronična kiselina	1,22
2,4,6- trifluorofenil boronična kiselina	1,79
trimetil boroksin	1,26
trimetoksi boroksin	1,74
dikalijevtrioksohidroksitetrafluoriborat	2,51

3.2. Ispitivanje biološke aktivnosti

3.2.1. Određivanje citotoksične aktivnosti *in vitro*

Za određivanje citotoksične aktivnosti ispitivanih spojeva korištene su tumorske stanične linije 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, B16F10 mišjeg melanoma te SCCVII, mišjeg karcinoma pločastih stanica kože. Stanične linije 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke i B16F10 mišjeg melanoma nabavljene su od udruge American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), a stanična linija SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože dobivena je iz Centra za istraživanje raka kanadske pokrajine British Columbijе (BC Cancer Research Center, Vancouver, Kanada). Pored nabrojanih, citotoksična aktivnost izdvojenih boroničnih kiselina i njihovih derivata ispitana je i na normalnim stanicama L929-mišjeg fibroblasta. Stanice su uzgajane u RPMI 1640 mediju (Sigma-Aldrich, Buchs, Švicarska) uz dodatak 10 % FCS (Sigma-Aldrich, Buchs, Švicarska), u vlažnoj atmosferi od 5 % CO₂ u zraku pri temperaturi od 37°C.

Za provedbu ispitivanja pripremljene su matične otopine odabranih spojeva njihovim otapanjem u fosfatnom puferu (Fisher Chemical, Wien, Austrija). U svaku jažicu mikrotitarske pločice s 96 jažica stavljeno je 10⁴ (ne)tumorskih stanica na 250 µL RPMI medija. Nakon prva 24 sata, kada je došlo do udruživanja stanica, stari medij zamijenjen je novim, svježim medijem te su kulturama dodani ispitivani spojevi u različitim koncentracijama. Fenilboronična kiselina (C₆H₇BO₂), 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina (C₆H₄BF₃O₂), trimetil boroksin (C₃H₉B₃O₃) i trimetoksi boroksin (C₃H₉B₃O₆) dodavani su

u koncentracijama od 0,1, 1,0 i 10,0 mg/mL¹, dok je dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) dodavan u koncentracijama od 0,125, 0,25, 0,5 i 1 mg/mL. Kontrolne stanice inkubirane su u čistom mediju, bez dodavanja ispitivanih spojeva. Nakon dodavanja spojeva, stanice su kultivirane sljedeća 24h, nakon čega je proveden test citotoksičnosti primjenom Crystal violet metode za mjerenje brzine inhibicije rasta stanica. Stanice su 15 minuta fiksirane dodavanjem 3-postotne otopine formalina, te su potom isprane deioniziranom vodom i osušene na zraku. Tijekom sljedećih 20 minuta, stanice su obojene dodavanjem 0,1-postotne Crystal violet otopine, a zatim su ponovno dobro isprane deioniziranom vodom i ostavljene da se suše preko noći. Sljedećeg jutra, iz stanica je ekstrahirana boja pomoću 10-postotne otopine octene kiseline, nakon čega je, korištenjem spektrofotometarskog čitača mikropločica, izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 540 nm, koja je približno proporcionalna broju preživjelih stanica. Svaki eksperiment ponovljen je četiri puta. Inhibicija rasta stanica (IRS) u odnosu na stanice kontrole računata je prema formuli:

$$IRS (\%) = \frac{C - T}{C} \cdot 100 \quad (15)$$

gdje je T srednja apsorbancija tretiranih stanica, a C srednja apsorbancija kontrolnih (netretiranih) stanica.

3.2.2. Procjena antitumorske aktivnosti *in vivo*

In vivo istraživanja antitumorskog djelovanja na eksperimentalnim životinjama provedena su samo za spojeve fenilboronične ($C_6H_7BO_2$) i 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) te dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). Spojevi trimetil ($C_3H_9B_3O_3$) i trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$) nisu bili uključeni u daljnja ispitivanja antitumorske aktivnosti, budući da su nestabilni u vodenom mediju, a produkt njihove biorazgradnje je metanol (CH_3OH), koji je toksičan za žive organizme (Santa Cruz Biotechnology, 2009a; Santa Cruz Biotechnology, 2009b). *In vivo* istraživanja vršena su na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu te su u njima korišteni miševi iz uzgojne kolonije Instituta. Upotrijebljena su tri soja miševa: BALB/c singenični s

¹ Koncentracije svih spojeva izražene su u mg/mL, budući da iako $K_2[B_3O_3F_4OH]$ ima boroksinski prsten kao „ciklični anhidrid“, nije do kraja razjašnjeno kako se hidratizira (n H_2O).

4T1 stanicama, C57BL/ 6 singenični s B16F10 stanicama i C3H/H singenični sa SCCVII stanicama. Životinje su bile stare oko 3 mjeseca, teške između 20-23 grama. Osigurana im je standardna dijeta (Mucedola, Italija) i voda iz slavine *ad libitum*. Životinje su držane u uobičajenim uvjetima: izmjene svjetlo/tama po 12/12 sati, pri temperaturi od 22°C i vlažnosti zraka od 55 %. Životinje su tretirane u skladu s Pravilnikom o dobrobiti životinja. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od sedam životinja. Razvoj solidnih (čvrsto formiranih) tumora 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, B16F10 mišjeg melanoma i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože postignut je ubrizgavanjem 5×10^5 tumorskih stanica supkutano u desno bedro singeničnih miševa.

Svi eksperimentalni postupci izvedeni su u skladu s trenutno važećim smjernicama za skrb o laboratorijskim životinjama, uključujući uporabu 3R postupaka. Eksperimenti su prekinuti prije nego što je prosječni promjer tumora premašio 15 mm, kako je preporučeno u smjernicama za dobrobit i uporabu životinja u istraživanju raka iz 2010. godine (Workman i sur., 2010).

Tretman otopinama izdvojenih spojeva započet je nekoliko dana (7-12) nakon transplantacije tumorskih stanica, kada su volumeni tumora dosegli veličine od oko 250-300 mm³. Za miševe s injektiranim 4T1 adenokarcinomom dojke istražena su dva različita načina primjene ispitivanih spojeva, i to: intraperitonealni i intratumoralni. Miševima sa SCCVII karcinomom pločastih stanica kože ispitivani spojevi davani su ili intraperitonealno, ili peroralno, dok su miševi s B16F10 melanomom ispitivane spojeve primali intraperitonealno i topikalno. Preliminarnim istraživanjima utvrđeno je da su zaražene životinje dobro podnijele jednostruku dozu od 50 mg/kg dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) primijenjenu intratumoralno; drugim riječima, životinje su bile dobrog općeg stanja te kod njih nije primijećen značajni gubitak težine. Međutim, kad su jednaku dozu spomenutog spoja primile intraperitonealno, više od 50 % miševa je uginulo, zbog čega je ona razdijeljena u 5 doza po 10 mg/kg, koje su davane u uzastopnim danima. Doze od 50 mg/kg dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) primijenjene peroralno, unosom pomoću sonde za hranjenje direktno u želudac, devet dana uzastopno od početka tretmana, nisu se pokazale smrtonosnima za miševe. Za intraperitonealnu primjenu, navedena doza otopljena je u 300 µL fiziološke otopine, dok je za intratumoralnu i peroralnu primjenu volumen upotrijebljene fiziološke otopine iznosio 100 µL, odnosno 500 µL. Usporedbe radi, pokusi koji uključuju subdermalne načine primjene (intraperitonealno i intratumoralno) ponovljeni su

na zasebnim skupinama miševa s injektiranim 4T1 adenokarcinomom dojke, odnosno SCCVII karcinomom pločastih stanica kože, na način da je umjesto ispitivanoga derivata, tretman proveden standardnim citostatikom 5-fluorouracilom² (5-FU), primijenjenom u jednakom vremenskom trajanju i jednakim terapijskim dozama, kao i spoj dikalijevog-trioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). Kod zdravih miševa (bez tumora) smrtonosna doza 5-FU za jednokratnu primjenu iznosi 190 mg/kg (Martin i sur., 1982), dok se kod višestrukih tretmana toksični efekt postiže uzastopnim davanjem 130 mg/kg po tjednu (Stolfi i sur., 1983). 5-FU otopina za injekcije (250 mg/5 ml) nabavljena je od tvrtke Pliva d.o.o. (Zagreb, Hrvatska).

Prema dostupnoj literaturi (Soriano-Ursua i sur., 2014), kiseline koje u svojoj strukturi sadrže atome bora imaju vrlo nisku toksičnost. Sukladno tome, kod miševa su utvrđene vrlo visoke vrijednosti akutne oralne toksičnosti (LD_{50}) za fenilboroničnu ($C_6H_7BO_2$) i 2,4,6-trifluorofenil boroničnu kiselinu ($C_6H_4BF_3O_2$), u iznosu od 900 mg/kg, dok su u samim ispitivanjima korištene devet puta manje doze navedenih spojeva (100 mg/kg) u odnosu na utvrđene LD_{50} vrijednosti. Neovisno o načinu primjene (intraperitonealni, intratumoralni ili peroralni), spomenute doze bile su otopljene u 300 μ L fiziološke otopine i davane jednom dnevno tijekom devet uzastopnih dana, tako da je ukupna primljena doza za svaki od načina primjene bila 900 mg/kg.

Topikalni način primjene, neovisno o ispitivanom spoju, sastojao se od lokalnog nanošenja kreme, koja sadrži 5-postotnu otopinu ispitivanog spoja, na kožu preko tumora, jednom dnevno u razdoblju od devet uzastopnih dana. U svim provedenim pokusima, miševi u kontrolnim skupinama primali su na iste načine odgovarajuće volumene čiste fiziološke otopine, bez dodatka ispitivanih spojeva.

Rast tumora praćen je tako da se šestarom mjerilo tri ortogonalna promjera tumora (A, B, C), a ukupni volumen tumora određen je po formuli:

$$V = \frac{ABC\pi}{6} \quad (16)$$

Inhibicija rasta tumora (IRT) utvrđena je po formuli:

² Antitumorsko djelovanje spoja 5-fluorouracila nije ispitivano na miševima zaraženim B16F10 tumorskim stanicama, zato što taj spoj nije indiciran kao antimelanomski citostatik.

$$IRT (\%) = \frac{C - T}{C} \cdot 100 \quad (17)$$

gdje C označava srednji volumen tumora kontrolne (netretirane) skupine, a T je srednji volumen tumora tretiranih skupina.

3.3. Ispitivanje enzimske kinetike

3.3.1. Ispitivanje inhibicije enzima butirilkolinesteraze

Kao izvor enzima korištena je butirilkolinesteraza (BuChE, C1057 SIGMA) iz konjskog seruma. Aktivnost enzima ispitana je prilagođenom spektrofotometrijskom metodom, opisanom u literaturi (Ellman i sur., 1961; Worek i sur., 1999). Kao supstrat korišten je butiriltiokolin jodid (BuTChI, 20780 SIGMA), a da bi reakcija bila kolorimetrijska, u reakcijsku otopinu dodaje se DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina, D218200 ALDRICH). Enzimskom hidrolizom supstrata nastaje tiokolin koji reagira s DTNB-om, pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline.

Za potrebe mjerenja, pripremljene su otopina butirilkolinesteraze jakosti 20 U, otopine butiriltiokolin jodida koncentracija 0,1, 0,2, 0,5, 1 i 2 mM i otopina DTNB-a koncentracije 6,6 mM u 50 mM fosfatnom puferu (pH 8,0). Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti enzima sastojala se od 170 μ L fosfatnog pufera, 10 μ L otopine enzima i 10 μ L otopine DTNB-a. Reakcija je pokrenuta dodatkom 10 μ L otopine supstrata i nakon početne zadržke od 30 sekundi mjerena je promjena apsorbancije pri 412 nm, svakih 10 sekundi tijekom 10 minuta, uz kontrolu raspada supstrata kao slijepu probu priređenu ispuštanjem enzima iz reakcijske smjese, kako bi se odredila moguća neenzimska hidroliza butiriltiokolin jodida. Aktivnost enzima butirilkolinesteraze određena je iz nagiba linearnog dijela krivulje, te izražena u enzimskim jedinicama (U), pri čemu je jedna enzimska jedinica (U) definirana kao promjena apsorbancije za 0,001 mM u minuti. Vrijednosti kinetičkih parametara K_m i v_{max} izračunate su korištenjem dvostrukog recipročnog dijagrama ($1/v$ naprama $1/[S]$) – poznatijeg kao Lineweaver-Burkov dijagram – gdje v označava brzinu reakcije, a S predstavlja koncentraciju supstrata.

Volumen i sastav reakcijske smjese za ispitivanje inhibicije enzima bio je isti kao i za neinhibiranu reakciju, s tom razlikom što je volumen dodanog fosfatnog pufera, umanjivan za volumen (10 μL) dodanog inhibitora. Inhibicijski učinak ispitivanih spojeva pri različitim koncentracijama inhibitora u reakcijskoj smjesi (0,5, 1, 2 i 5 mM) određen je korištenjem Dixonovog dijagrama.

3.3.2. Ispitivanje inhibicije enzima tirozinaze

Tirozinaza je enzim koji katalizira reakcije oksidacije s raznim fenolnim supstratima. Topljiva je (2 mg/mL) u 50 mM fosfatnom puferu pri pH 6,5, pri čemu se otopina oboji u blago smeđu boju. Skladišti se pri temperaturi od -20 °C. Prilikom mjerenja, kao izvor enzima, korištena je tirozinaza (T3824 SIGMA) iz gljive *Agaricus bisporus*, koja je komercijalno dostupan preparat. Kao supstrat, u ovom slučaju, korištena je L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin, 333786 ALDRICH).

Otopina enzima jakosti 104,17 U/mL, pripravljena je otapanjem 1 mg tirozinaze u 50 mM fosfatnom puferu, u omjeru 1:30, pri pH 6,5, te je čuvana u ledu prije korištenja. Osim spomenute otopine enzima, pripremljene su i otopine supstrata L-DOPE koncentracija 0,1, 0,2, 0,5, 1 i 2 mM. Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti enzima načinjena je miješanjem 150 μL fosfatnog pufera i 120 μL otopine enzima. Sama reakcija pokrenuta je dodavanjem 30 μL otopine supstrata te je mjerena promjena apsorbancije pri valnoj duljini od 475 nm, svakih 10 sekundi tijekom 3 minute, uz kontrolu raspada supstrata kao slijepu probu priređenu ispuštanjem enzima iz reakcijske smjese. Volumen i sastav reakcijskih smjesa za ispitivanje inhibicije enzima bio je isti kao i za neinhibiranu reakciju, s tom razlikom što je volumen fosfatnog pufera umanjivan za volumen (15 μL) dodanog inhibitora različitih koncentracija.

Aktivnost enzima te vrijednosti kinetičkih parametara K_m i v_{max} , i ovdje su računati primjenom Lineweaver-Burkovog dijagrama, sukladno postupku koji je opisan u prethodnom potpoglavlju, dok je za određivanja tipa inhibicije i vrijednosti inhibicijske konstante K_i korišten Dixonov dijagram.

3.3.3. Ispitivanje inhibicije enzima heksokinaze

Aktivnost enzima heksokinaze određuje se putem povezane enzimске reakcije, gdje se u prvom koraku, uz posredovanje enzima heksokinaze, vrši pretvorba glukoze u glukoza-6-fosfat, koji se potom u drugom koraku reakcijom oksidacije prevodi u NADH, uz posredovanje enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze. Kao krajnji rezultat dobiva se žuto obojena otopina NADH, čiji je intezitet obojenja proporcionalan aktivnosti korištenog enzima heksokinaze. Pri provedbi mjerenja, kao izvor enzima, korištena je heksokinaza iz tkiva sisavaca.

Postupak mjerenja započinje aktivacijom lipofilizirane smjese NADH standarda, dodavanjem 400 μL ultra čiste vode, za pripremu osnovne otopine 1,25 mM NADH. Za određivanje NADH standardne krivulje, jažice mikrotitarske pločice pune se redom s 0, 2, 4, 6, 8 i 10 μL spomenute otopine NADH, te ih se nadopuni do ukupnog volumena od 50 μL s otopinom pufera (0,05M TRIS-HCl + 13,3 mM MgCl_2 , pH 8). Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti enzima pripremljena je miješanjem 34 μL pufera, 2 μL mješavine enzima heksokinaze i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, 2 μL koenzima (16,6 mM ATP) te 2 μL razvijaača boje. Reakcija je pokrenuta dodavanjem 10 μL 0,67 M glukoze, koja služi kao supstrat. Nakon petominutne inkubacije na tamnom mjestu, pri sobnoj temperaturi, započinje se s mjerenjima apsorbancije na valnoj duljini od 450 nm. Očitavanja apsorbancije vrše se u petominutnim razmacima, uz kontrolu raspada supstrata kao slijepu probu priređenu ispuštanjem mješavine enzima iz reakcijske smjese, sve dok vrijednost apsorbancije najaktivnijeg uzorka ne prijeđe najveću vrijednost apsorbancije NADH standarda. U tom trenutku, vrijednost apsorbancije najaktivnijeg uzorka nalazi se vrlo blizu ili čak izvan granica linearnog dijela standardne krivulje. Sastav reakcijskih smjesa za ispitivanje inhibicije enzima bio je isti kao i za neinhibiranu reakciju, uz dodavanje 50 μL pojedinih inhibitora različitih koncentracija.

Pri proračunu aktivnosti enzima, izračunava se razlika očitanih apsorbancija između završnog i početnog trenutka mjerenja (ΔA_{450}) te se za tako određenu vrijednost razlike apsorbancija, iz standardne krivulje očitava odgovarajuća koncentracija NADH. Aktivnost enzima zatim se računa po formuli:

$$\text{Aktivnost HK} = \frac{B \times F}{t \times V} \quad (18)$$

gdje je B očitana koncentracija NADH, F je faktor razrijeđenja uzorka, t je reakcijsko vrijeme, a V ukupni volumen reakcijske smjese. Vrijednosti kinetičkih parametara K_m i v_{max} , još jednom su računate primjenom Lineweaver-Burkovog dijagrama, sukladno postupku koji je opisan u prethodnim potpoglavljima, dok je za određivanja tipa inhibicije i vrijednosti inhibicijske konstante K_i korišten Dixonov dijagram.

3.3.4. Ispitivanje inhibicije enzima laktat-dehidrogenaze

Laktat-dehidrogenaza katalizira međupretvorbu piruvata i laktata te reducira NAD^+ u NADH, što rezultira žutim obojenjem otopine, čiji je intenzitet proporcionalan aktivnosti korištenog enzima laktat-dehidrogenaze. Pri provedbi mjerenja, kao izvor enzima, korištena je laktat-dehidrogenaza iz stanica sisavaca.

Postupak mjerenja i ovdje započinje aktivacijom lipofilizirane smjese NADH standarda, dodavanjem 400 μL ultra čiste vode, za pripremu osnovne otopine 1,25 mM NADH. Za određivanje NADH standardne krivulje, jažice mikrotitarske pločice pune se redom s 0, 2, 4, 6, 8 i 10 μL spomenute otopine NADH, te ih se nadopuni do ukupnog volumena od 50 μL s otopinom pufera (0,2M TRIS-HCl, pH 7,3). Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti enzima načinjena je miješanjem 38 μL pufera i 2 μL otopine enzima laktat-dehidrogenaze. Reakcija je pokrenuta dodavanjem 10 μL 30 mM natrijevog piruvata, koja ima ulogu supstrata. Nakon nekoliko minuta inkubacije na tamnom mjestu, pri temperaturi od 37°C, započinje se s mjerenjima apsorbancije na valnoj duljini od 450 nm. Očitavanja apsorbancije vrše se u petominutnim razmacima, uz kontrolu raspada supstrata kao slijepu probu priređenu ispuštanjem mješavine enzima iz reakcijske smjese, sve dok vrijednost apsorbancije najaktivnijeg uzorka ne prijeđe najveću vrijednost apsorbancije NADH standarda. U tom trenutku, vrijednost apsorbancije najaktivnijeg uzorka nalazi se vrlo blizu ili čak izvan granica linearnog dijela standardne krivulje. Sastav reakcijskih smjesa za ispitivanje inhibicije enzima jednak je onome za neinhibiranu reakciju, uz dodavanje 50 μL pojedinih inhibitora različitih koncentracija.

Pri proračunu aktivnosti enzima, izračunava se razlika očitanih apsorbancija između završnog i početnog trenutka mjerenja (ΔA_{450}) te se za tako određenu vrijednost razlike apsorbancija, iz standardne krivulje očitava odgovarajuća koncentracija NADH. Aktivnost enzima laktat-dehidrogenaze računa se po formuli (18), na isti način kao za enzim heksokinazu.

Vrijednosti kinetičkih parametara K_m i v_{max} , izračunavaju se primjenom Lineweaver-Burkovog dijagrama, sukladno postupku koji je opisan u prethodnim potpoglavljima, dok je za određivanja tipa inhibicije i vrijednosti inhibicijske konstante K_i korišten Dixonov dijagram.

3.3.5. Ispitivanje inhibicije enzima piruvat-kinaze

Piruvat-kinaza je enzim koji katalizira posljednji korak reakcije glikolize, prijenos fosfatne skupine PEP-a na ADP, pri čemu nastaje jedna molekula piruvata i jedna molekula ATP-a. Aktivnost enzima piruvat-kinaze određuje se putem povezane enzimske reakcije, tijekom koje nastaje obojeni produkt, čiji je intezitet obojenja proporcionalan aktivnosti korištenog enzima piruvat kinaze.

Postupak mjerenja započinje razrjeđivanjem 10 μL otopine piruvat standarda koncentracije 100 nmol/ μL , s 990 μL otopine pufera (0,05 M IMIDAZOL-HCl + 0,12 M KCl + 0,067 M MgSO_4 , pH 7,6), pri čemu nastaje standardna otopina koncentracije 1 nmol/ μL . U svrhu određivanja standardne krivulje, jažice mikrotitarske pločice pune se redom s 0, 2, 4, 6, 8 i 10 μL spomenute standardne otopine te ih se nadopuni do ukupnog volumena od 50 μL s otopinom pufera. Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti enzima načinjena je miješanjem 46 μL pufera i 2 μL mješavine enzima. Reakcija je pokrenuta dodavanjem 2 μL mješavine supstrata (45 mM ADP + 45 mM PEP). Nakon nekoliko minuta inkubacije na tamnom mjestu, pri sobnoj temperaturi, započinje se s mjerenjima apsorbancije na valnoj duljini od 570 nm. Očitavanja apsorbancije vrše se u petominutnim razmacima, uz kontrolu raspada supstrata kao slijepu probu priređenu ispuštanjem mješavine enzima iz reakcijske smjese, sve dok vrijednost apsorbancije najaktivnijeg uzorka ne prijeđe najveću vrijednost apsorbancije piruvat standarda. U tom trenutku, vrijednost apsorbancije najaktivnijeg uzorka nalazi se vrlo blizu ili čak izvan granica linearnog dijela standardne krivulje. Sastav reakcijskih smjesa za ispitivanje inhibicije enzima jednak je onome za neinhibiranu reakciju, uz dodavanje 50 μL pojedinih inhibitora različitih koncentracija.

Pri proračunu aktivnosti enzima, izračunava se razlika očitanih apsorbancija između završnog i početnog trenutka mjerenja (ΔA_{570}) te se za tako određenu vrijednost razlike apsorbancija, iz standardne krivulje očitava odgovarajuća koncentracija piruvat standarda. Aktivnost enzima piruvat-kinaze računa se po formuli (18), gdje u ovom slučaju B predstavlja očitano koncentraciju piruvat standarda.

Vrijednosti kinetičkih parametara K_m i v_{max} , izračunavaju se primjenom Lineweaver-Burkovog dijagrama, sukladno postupku koji je opisan u prethodnim potpoglavljima, dok je za određivanja tipa inhibicije i vrijednosti inhibicijske konstante K_i korišten Dixonov dijagram.

3.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3.4.1. FRAP metoda

FRAP metoda mjeri ukupni redukcijski potencijal neke otopine, koji predstavlja neizravnu otpornost sustava na oksidativni stres. Radi se o kolorimetrijskoj metodi, koja se često koristi za mjerenje antioksidacijskog karaktera hrane, pića i nutritivnih dodataka koji sadrže polifenole (Benzie i Strain 1999; Prior i sur., 2005; Rabeta i Nur Faraniza, 2013). Metoda se temelji na sposobnosti tvari da reduciraju Fe^{3+} ione u Fe^{2+} ione u otopini TPTZ-a, pri čemu nastaje plavoljubičasto obojani produkt.



Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH 3,6, kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava redoks potencijal, koji dodatno omogućuje pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe^{3+}/Fe^{2+} iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulaze u reakciju redukcije željeza te tako doprinose konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta (Benzie i Strain, 1996; Benzie i Strain, 1999).

Redukciju kompleksa $Fe^{3+}(TPTZ)_2$ u $Fe^{2+}(TPTZ)_2$ može se pratiti spektrofotometrijski, bilježeći promjenu apsorbancije otopine pri 593 nm. Promjena apsorbancije se unosi i očitava s kalibracijske krivulje te pokazuje visoku linearnost za široki raspon koncentracija, bilo da se radi o antioksidansima u tekućem ili čvrstom stanju.

Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom u ovom radu obavljeno je prema proceduri koju su osmislili Benzie i Strain (1996), uz određene prilagodbe. Za potrebe mjerenja pripremljene su sljedeće matične otopine:

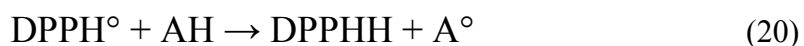
- 40 mM otopina klorovodične kiseline (HCl);
- 300 mM acetatnog pufera, pH 3,6;
- 10 mM otopina TPTZ-a dobivena otapanjem 159,4 mg TPTZ u 50 mL 40 mM otopine klorovodične kiseline (HCl); te
- 20 mM otopina željezovog (III)-klorida ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), dobivena otapanjem 551,6 mg spomenutog spoja u 100 mL destilirane vode.

Sve navedene otopine uvijek su pripremane svježe, na sam dan mjerenja. FRAP reagens priređen je miješanjem acetatnog pufera, otopine TPTZ-a i otopine željezovog(III)-klorida ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) u omjeru 10:1:1. Za pripremu reakcijskih otopina, u jažice mikrotitarske pločice stavljan je volumen od 0,225 mL FRAP reagensa, kojemu je dodano 0,075 mL otopina uzoraka pojedinih spojeva različitih koncentracija te je sve zajedno dobro promiješano. Za svaku koncentraciju otopine uzoraka napravljena su tri mjerenja te su izračunate srednje vrijednosti. Očitavanja apsorbancije rađena su na valnoj duljini od 595 nm u trenutku $t = 0$ te nakon 30 minuta inkubacije u tami pri sobnoj temperaturi. Za izradu kalibracijske krivulje načinjene su standardne otopine željezovog(II)-sulfata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), u koncentracijskom rasponu od 100 do 1000 μM . Primijenjen je isti postupak mjerenja kao i za reakcijske otopine uzoraka, samo što su kod njihove priprave, umjesto uzoraka ispitivanih spojeva, dodavane priređene koncentracije otopina željezovog(II)-sulfata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija, pomoću računala, nacrtana je kalibracijska krivulja tako što su na apscisu nanese koncentracije standardne otopine željezovog(II)-sulfata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), izražene u mM, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm. FRAP vrijednosti izražene su u obliku koncentracija spoja koje imaju sposobnost redukcije željeza ekvivalentnu onoj 1 mM željezovog(II)-sulfata (FeSO_4). Kao kontrola, korišten je čisti FRAP reagens, bez dodanih otopina uzoraka.

3.4.2. DPPH metoda

DPPH metoda je pouzdana, brza i jednostavna metoda određivanja sposobnosti molekulskih sustava da djeluju kao „hvatači“ slobodnih radikala ili donori vodik. Isprva se najviše primjenjivala za vrednovanje antioksidacijske aktivnosti hrane, ali danas se sve više koristi za

kvantifikaciju antioksidansa u kompleksnim biološkim sustavima, te čvrstim i tekućim uzorcima (Prior i sur., 2005; Huang i sur., 2005; Villaño i sur., 2007). Ovu metodu razvio je Blois 1958. godine polazeći od pretpostavke da se antioksidacijska aktivnost nekog spoja može odrediti korištenjem slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,32 \text{ g mol}^{-1}$). DPPH se karakterizira kao stabilni radikal zbog postojanja delokaliziranih elektrona koji nisu koncentrirani na jednom mjestu, već se njihov utjecaj osjeća preko cijele molekule zbog čega ne dolazi do dimerizacije. Ovaj sustav radikala ima tamno ljubičasto obojenje i jako apsorbira u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra, pri 515-520 nm. Nakon miješanja radikala s donorom protona (antioksidans koji hvata slobodne radikale) dolazi do obezbojenja otopine što je posljedica redukcije DPPH radikala iz hidrazil oblika u hidrazin oblik do koje dolazi uslijed doniranja vodikovog atoma nesparenim elektronima dušika u DPPH molekuli. Nastala promjena u boji otopine DPPH radikala može se pratiti spektrofotometrijski, mjerenjem promjene apsorpcije svjetlosti na određenoj valnoj duljini. I dok DPPH-radikal lako prihvaća elektron ili proton te prelazi u stabilnu, dijamagnetičnu molekulu, njegova oksidacija ide jako teško i predstavlja nepovratnu reakciju.



DPPH metoda jedinstvena je i zbog činjenice da se reakcija s uzorkom odvija u metanol/voda DPPH otopini, što pojednostavljuje ekstrakciju antioksidacijske tvari iz ispitivanog uzorka, a dobivene vrijednosti usporedive su sa rezultatima drugih metoda. Prednost ove metode je ta što DPPH radikal reagira sa cijelim ispitivanim molekulskim sustavom. DPPH radikal može reagirati i sa slabijim antioksidansima, u polarnim i nepolarnim organskim otapalima, pa se može vršiti detekcija hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa uz vidnu kolorimetrijsku promjenu nakon svega 15-20 minuta trajanja reakcije u zatamnjenom prostoru (Molyneux, 2004). Antioksidacijska sposobnost mjeri se pri sobnoj temperaturi što smanjuje opasnost od termalne degradacije ispitivane molekule. Ipak, ova metoda ima i određenih ograničenja koja se očituju u reaktivnosti DPPH radikala spram drugih radikala zbog čega se gubi linearnost standardne krivulje pri različitim omjerima antioksidans/DPPH. DPPH radikal osjetljiv je na prisutnost kisika i nekih Lewisovih baza u otopini (Ionita, 2005), a njegova apsorbancija opada na svjetlu u metanolnim i acetonskim otopinama. Jednako tako, metoda nije pouzdana za emulzijske sustave, te se ne može primijeniti kod određivanja antioksidacijske aktivnosti plazme zbog svih proteina koji se precipitiraju u alkoholnom mediju.

Mjerenje sposobnosti „gašenja“ aktivnosti DPPH radikala ispitivanih spojeva provedeno je prema metodologiji koju su razvili Brand-Williams i suradnici (1995). Za potrebe mjerenja pripremljena je otopina DPPH radikala načinjena otapanjem 4 mg DPPH u 100 mL ultra-čiste vode. Spomenuta otopina uvijek je pripremana svježa te ju se razrjeđivalo s vodom, sve dok očitavanja apsorbancije ne poprime vrijednosti iz raspona 0,8 - 1,0. Jažice mikrotitarske pločice punjene su s 200 μ L otopine DPPH radikala i 10 μ L otopine uzorka ispitivanog spoja različitih koncentracija. Pripremljene otopine dobro su promiješane u spektrofotometru i ostavljene da odstoje u tami, na sobnoj temperaturi, u trajanju od sat vremena. Nakon toga je svakoj otopini izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 520 nm, te se za svaki uzorak i svaku koncentraciju računao postotak preostalog DPPH^o prema formuli:

$$Preostali\ DPPH^o\ (\%) = \frac{A_k - A_u}{A_k} \cdot 100 \quad (21)$$

gdje A_k označava apsorbanciju kontrole, a A_u apsorbanciju uzorka određene koncentracije. Kao kontrola korištena je čista otopina DPPH radikala, bez dodavanja otopina uzoraka. Iz rezultata koji su dobiveni, nacrtana je ovisnost koncentracije uzoraka u otopini c (mmol/mL) o preostaloj količini DPPH^o (%). Iz jednadžbe pravca izračunata je koncentracija uzorka (mmol/mL) koja je potrebna da se početna koncentracija DPPH^o smanji za 50 % (IC_{50}). Antiradikalni kapacitet ispitivanog spoja je to veći što je dobivena vrijednost IC_{50} manja.

3.4.3. Kelirajuća aktivnost

Sposobnost kelacije predstavlja sposobnost tvari da stvara kemijske veze s metalnim ionima smanjujući njihovu reaktivnost. Organski ligand naziva se kelatorom ili kelirajućim sredstvom, dok se metalni kompleks naziva kelatom. Povezivanjem kelatora s metalom dolazi do stabilizacije prstena, što se objašnjava povećanjem entropije sustava koja obično prati reakciju keliranja (Lehman, 1963).

U ljudskom tijelu dokazano brojni radikali nastaju posredstvom željezovih iona. Željezo je redoksaktivan metal koji sudjeluje u oksidativno-redukcijskim reakcijama te u regulaciji diferencijacije i rasta stanica. Osim toga, ono je integralni dio mnogih proteina i enzima. Željezo katalizira razgradnju vodikova peroksida u tzv. Fentovoj reakciji, pri čemu nastaju reaktivni kisikovi radikali skloni oštećivanju biomolekula. Vezivanje željeza s kelatorom

preko dušika, kisika ili sumpora blokira njegovu sposobnost da katalizira nastanak slobodnih radikala (Jomova i Valko, 2011).

Sposobnost keliranja željeza predstavlja učinkoviti terapijski pristup (Gumienna-Kontecka i sur., 2014; Nuñez i Chana-Cuevas, 2018) te ujedno otvara mogućnost dokazivanja drugačijeg mehanizma antioksidacijske aktivnosti od onog koji se ispituje DPPH i FRAP metodama. Postupak određivanja kelirajućeg učinka zasniva se na reakciji između ferozina i metalnih iona željeza Fe^{2+} , pri čemu nastaje intenzivno crveno obojeni kompleks. Uslijed prisutnosti drugog kelirajućeg agensa u otopini smanjuje se količina nastalog kompleksa, što dovodi do promjene obojenja otopine, koju je moguće mjeriti bilježenjem promjene apsorbancije pri valnoj duljini od 562 nm.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom keliranja izvršeno je prema prilagođenoj proceduri koju su predložili Yen i suradnici (2000). Otapanjem 24 mg ferozina (97 %-tni 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,3-triazin-p,p'-disulfonična kiselina mononatrijeva sol hidrat), odnosno 2,5 mg željezovog(II) klorida ($FeCl_2$) u 10 mL destilirane vode, za potrebe mjerenja, najprije su pripremljene vodene otopine navedenih spojeva, u koncentracijama od 5 mmol/L (ferozin), odnosno 2 mmol/L ($FeCl_2$).

Sposobnost keliranja Fe^{2+} iona ispitana je pomoću spektrofotometra, tako da je u kivetu mikrotitarske pločice sa 96 jažica otpipetirano 100 μ L otopina uzoraka ispitivanih spojeva različitih koncentracija i 50 μ L otopine željezovog(II)-klorida ($FeCl_2$). Reakcija je pokrenuta dodavanjem 50 μ L otopine ferozina te je sve dobro promiješano. Nakon deset minuta stajanja na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 562 nm. Negativna kontrola sadržavala je sve, osim otopine uzorka, umjesto kojeg je dodano 100 μ L askorbinske kiseline. Kao pozitivna kontrola korištena je otopina EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, $C_{10}H_{16}N_2O_8$) u DMSO (dimetil sulfoksid, C_2H_6OS), koncentracije 10 mg/mL. Sva mjerenja izvedena su u triplikatu. Kelirajuća aktivnost (KA) izražena je u postocima inhibicije prema formuli:

$$KA(\%) = \frac{A_k - A_u}{A_k} \cdot 100 \quad (22)$$

gdje je A_k srednja apsorbancija negativne kontrole, a A_u srednja apsorbancija u prisutnosti uzorka.

3.5. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka dobivenih mjerenjima obavljena je primjenom programskog paketa Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Seattle, SAD). U ovisnosti o vrsti ispitivanja i korištenim metodama, s izuzetkom *in vivo* ispitivanja antitumorskih učinaka, sva mjerenja vršena su u triplikatu ili četveroplikatu. Analizom normalnosti razdiobe mjerenih podataka Kolmogorov-Smirnovljevim testom utvrđeno je kako se svi dobiveni rezultati podvrgavaju normalnoj razdiobi. Rezultati svih ispitivanja izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama aritmetičke sredine, pri čemu su rezultati *in vitro* i *in vivo* ispitivanja citotoksičnosti prikazani kao postotne vrijednosti u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. Koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50 postotni učinak (IC_{50}) u ispitivanjima antiradikalne aktivnosti i sposobnosti kelacije određene su metodom interpolacije na osnovu linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka, dok su koncentracije uzoraka na kojima postotak preživljavanja stanica u odnosu na kontrolu iznosi 50 % (LC_{50}) u ispitivanjima citotoksičnih učinaka izračunate korištenjem probit analize (Finney, 1952; Islamović i sur., 2014).

Za ocjenu značajnosti promjena između tretiranih skupina životinja u *in vivo* ispitivanjima te međusobnu usporedbu rezultata određivanja antiradikalne sposobnosti, sposobnosti kelacije i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta korištena je jednosmjerna analiza varijance (engl. Analysis Of Variance, ANOVA), nakon koje je proveden Tukeyev post-hoc test višestruke usporedbe. U svim provedenim statističkim analizama, razina značajnosti $p < 0,05$ predstavljala je statistički značajnu razliku. Rezultati dobiveni statističkom obradom prikazani su u tablicama i grafikonima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ispitivanje antitumorske aktivnosti

4.1.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti *in vitro*

Citotoksična aktivnost odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata ispitana je na staničnim linijama 4T1 mišjeg adenokarcinoma, B16F10 mišjeg melanoma i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože. Ove stanične linije imaju sposobnost stvaranja solidnih tumora kod singeničnih miševa te su iz tog razloga vrlo pogodne za ispitivanje antitumorskog potencijala izdvojenih spojeva. 4T1 mišji adenokarcinom dojke izvorno je izoliran kao subpopulacija izdvojena iz spontano nastalog tumora mliječnih stanica u BALB/cfC3H miševima (Dexter i sur., 1978; Heppner i sur., 1978). Tumor 4T1 otporan na 6-tiogvanin, metastazira hematogenim putem na jetri, plućima, kostima i mozgu, što ga čini dobrim modelom humanog metastaziranog karcinoma dojke (Heppner i sur., 2000). Tumor 4T1 raste progresivno i uzrokuje jednako smrtonosnu bolest, čak i nakon operativnog uklanjanja primarnog tumora (Morecki i sur., 1998; Pulaski i sur., 2000). Budući da se stanice B16F10-mišjeg melanoma, nakon unosa putem intravenske injekcije (Fidler, 1970), zaustavljaju u plućima, ove stanice predstavljaju pak idealan izbor za proučavanje plućnih metastaza kod miševa. Usporedbe radi, citotoksična aktivnost izdvojenih boroničnih kiselina i njihovih derivata ispitana je i na normalnim stanicama L929 mišjeg fibroblasta.

Određivanje citotoksične aktivnosti ispitivanih derivata boroničnih kiselina na navedenim staničnim linijama provedeno je u rastućem koncentracijskom nizu od 0,1, 1,0 i 10,0 mg/mL za spojeve fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$) i trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$), odnosno 0,125, 0,25, 0,5 i 1 mg/mL za spoj dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). Rezultati ispitivanja prikazani su na slikama 13 – 17. U tablici 4 dane su vrijednosti LC_{50} , procijenjene iz dobivenih rezultata, metodom probit analize.

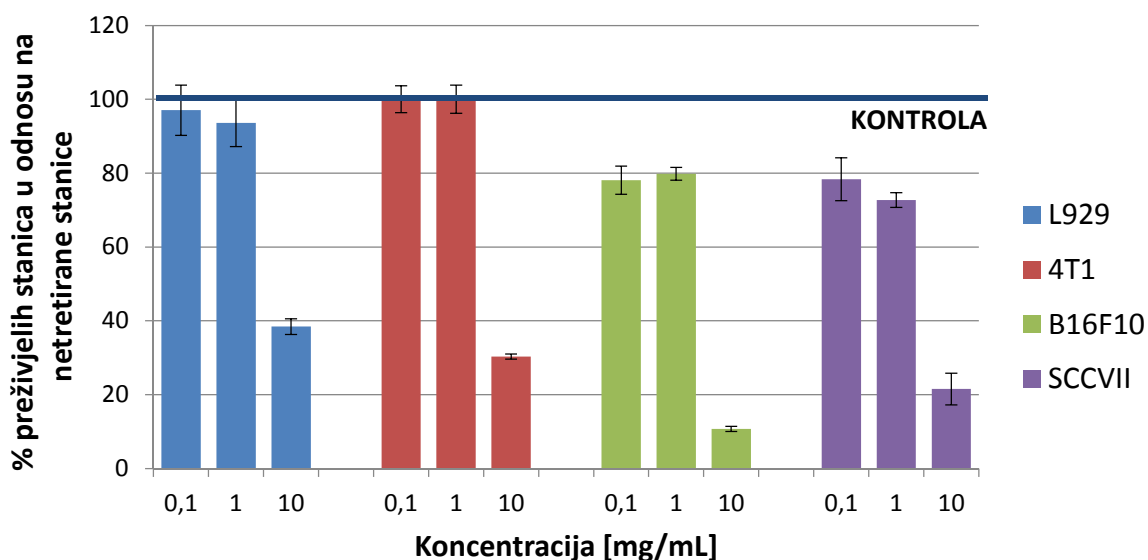
Općenito gledano, gotovo svi ispitivani spojevi, s izuzetkom 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), značajno su ($p \leq 0,001$) smanjili broj preživjelih stanica u odnosu na

kontrolne skupine, za sve vrste korištenih staničnih linija, a njihov učinak izravno je ovisio o upotrebljenoj dozi. U ispitivanjima su ujedno uočene i značajne ($p < 0,001$) razlike u osjetljivosti između pojedinih tumorskih staničnih linija na nižim testiranim koncentracijama (0,1 i 1,0 odnosno 0,125 i 0,25 mg/mL). U ovim koncentracijama, fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$) i dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) nisu pokazali citotoksično djelovanje na rast stanica 4T1-mišjeg adenokarcinoma. Riječ je o pojavi prethodno već opisanoj u nizu preliminarnih studija, u kojima su korištene različite tumorske i normalne stanične linije. Istu su pojavnost u svojim ispitivanjima, kojima su obuhvatili 81 vrstu različitih staničnih linija, uočili i znanstvenici s Odjela za dijagnostiku i liječenje raka pri Nacionalnom institutu za rak (Bethesda, MD) u suradnji sa znanstvenicima s Instituta Ruđer Bošković (Zagreb, Hrvatska), koji su zaključili da vodena otopina spoja dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) u koncentracijama do 10^{-4} M nimalo ne utječe na rast stanica, dok u koncentracijama većim od 10^{-3} M znatno usporava njihov rast, što je u korelaciji s ovim rezultatima za 4T1 stanice. Jedinim iznimkama u ispitivanjima do sada su se pokazale tumorske stanične linije SK-MEL-28, CAK-1 i HS 578T, kod kojih je uočeno suprotno ponašanje, odnosno izraženo povećanje broja stanica pri koncentraciji spoja od 10^{-5} M. Nasuprot tome, spoj trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$), već pri koncentraciji od 0,1 mg/mL, uspješno je neutralizirao $23,08 \pm 4,8$ % ($p = 0,001$) stanica 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, a slični učinci utvrđeni su i kod spoja trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$) pri koncentraciji od 0,1 mg/mL, dok je pri višim koncentracijama ovaj spoj imao slabije djelovanje. Za preostale dvije ispitivane tumorske stanične linije obuhvaćene istraživanjima, fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$) i trimetil boroksin ($C_3H_9B_3O_3$), pri niskim koncentracijama, pokazali su blago citotoksično djelovanje. S druge strane, izraženi citotoksični učinci zabilježeni su za spoj dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) – kod kojeg je pri koncentraciji od 0,25 mg/mL preživjelo $52,03 \pm 1,4$ % ($p < 0,001$) stanica B16F10 mišjeg melanoma i samo $22,5 \pm 6,4$ % ($p < 0,001$) stanica SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože u odnosu na kontrolu – te za spoj trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$), $52,67 \pm 4,0$ %, ($p < 0,001$) i $59,43 \pm 4,7$ %, ($p < 0,001$) živih stanica pri koncentraciji od 1 mg/mL respektivno). Isti spojevi na navedenim koncentracijama, pokazali su snažne citotoksične učinke i na L929 staničnoj liniji, pri čemu je udio preživjelih stanica iznosio $49,26 \pm 6,7$ % ($p < 0,001$) za spoj dikalijevogtriokso-

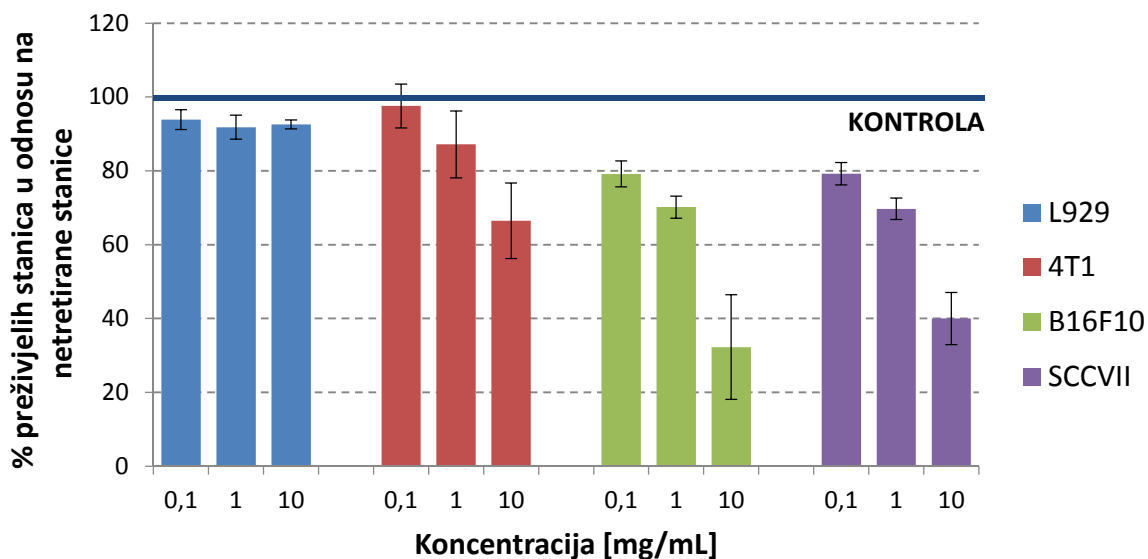
hidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), odnosno $34,59 \pm 4,8 \%$ ($p < 0,001$) za spoj trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$). Kod spojeva fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) i trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$) pri niskim koncentracijama citotoksični učinak na L929 staničnoj liniji je izostao, uz postotke preživjelih stanica od $93,58 \pm 2,2 \%$ ($p = 0,020$), $91,82 \pm 3,3 \%$ ($p = 0,011$) i $97,12 \pm 3,9 \%$ ($p = 0,395$).

Kod primjene na staničnim linijama B16F10-mišjeg melanoma i SCCVII-karcinoma, pri najvišoj koncentraciji (10 odnosno 1,0 mg/mL), svi ispitivani spojevi pokazali su snažno citotoksično djelovanje (postotak inhibicije rasta stanica u odnosu na kontrolu veći od 50 %). Prema ostvarenim učincima na rast stanica 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke i L929 mišjeg fibroblasta pri najvišoj testiranoj koncentraciji, ispitivane spojeve možemo svrstati u dvije skupine. Prvu skupinu čine spojevi fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) koji su pokazali izrazite inhibicijske učinke na obje testirane stanične linije, uz postotak preživljavanja stanica u rasponu od 7 – 39 % ($p < 0,001$). U drugoj skupini nalazi se, pak, spoj 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), koji je pokazao blago citotoksično djelovanje na stanice 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, uz postotak preživljavanja stanica od $66,45 \pm 10,2 \%$ ($p = 0,002$) u odnosu na kontrolu, dok na L929 staničnoj liniji nije imao učinka (preživljavanje stanica iznosilo je $92,58 \pm 1,2 \%$, ($p = 0,006$). Spoj trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$) po svojem se citotoksičnom učinku na stanice L929 mišjeg fibroblasta svrstao uz bok spojeva iz prve skupine, dok je na 4T1 staničnoj liniji pokazao izraženiji inhibicijski učinak, uz rast stanica od $54,23 \pm 6,0 \%$ ($p < 0,001$), ali nije dosegnuo LC_{50} vrijednost. Zanimljivo je istaknuti i kako su, iako strukturno vrlo slične, fenilboronična ($C_6H_7BO_2$) i 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$) pokazale znatnu razliku u djelovanju. Pri višim testiranim koncentracijama fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$) ostvarila je izrazito dobre citotoksične učinke, a pri nižim je zaostajala za ostalim ispitivanim spojevima, dok 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$) niti pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji nije postigla 70-postotnu inhibiciju tumorskih stanica. Razlozi ovakvog ponašanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Istraživanjima je uočeno kako na površini stanica različitih tumora – među ostalim i stanicama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke (Wang i sur., 2016) te SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože (Shikata i sur., 2002) – dolazi do prekomjerne ekspresije sijalične kiseline. Budući da fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$)

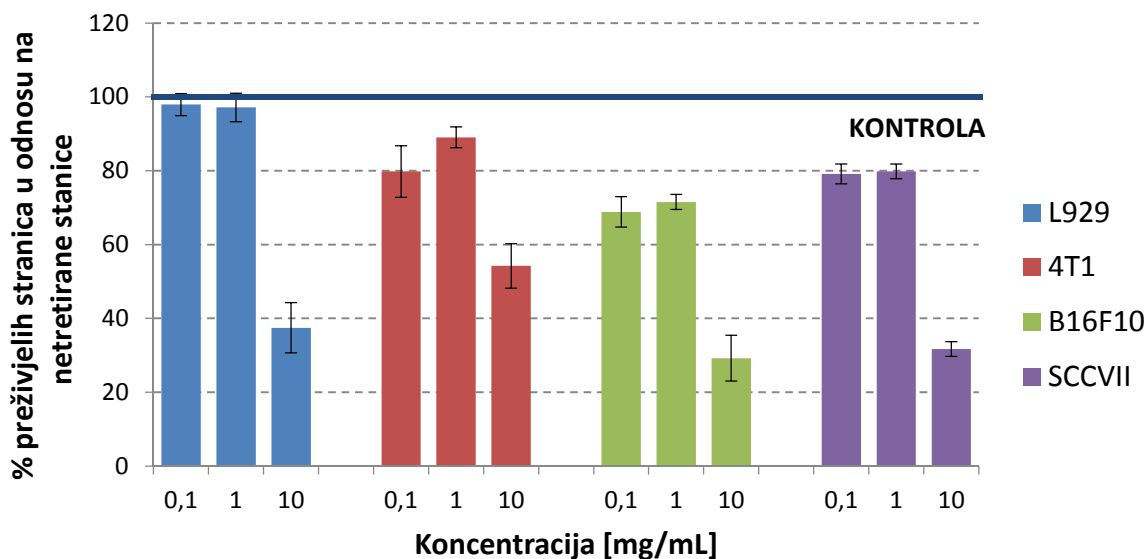
dokazano pokazuje visoki afinitet prema receptorima sijalične kiseline (Djanashvili i sur., 2005), moguće je da upravo posredstvom ovih receptora vrši utjecaj na stanice tumora.



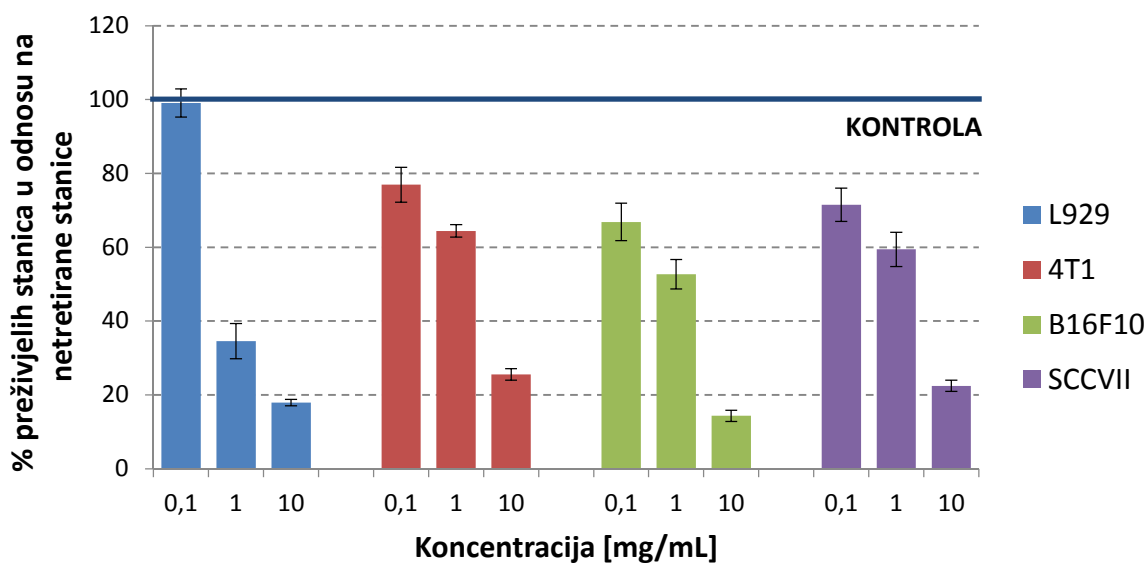
Slika 13. Citotoksični učinci spoja fenilboronične kiseline na odabranim tumorskim staničnim linijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju četiriju neovisnih ispitivanja.



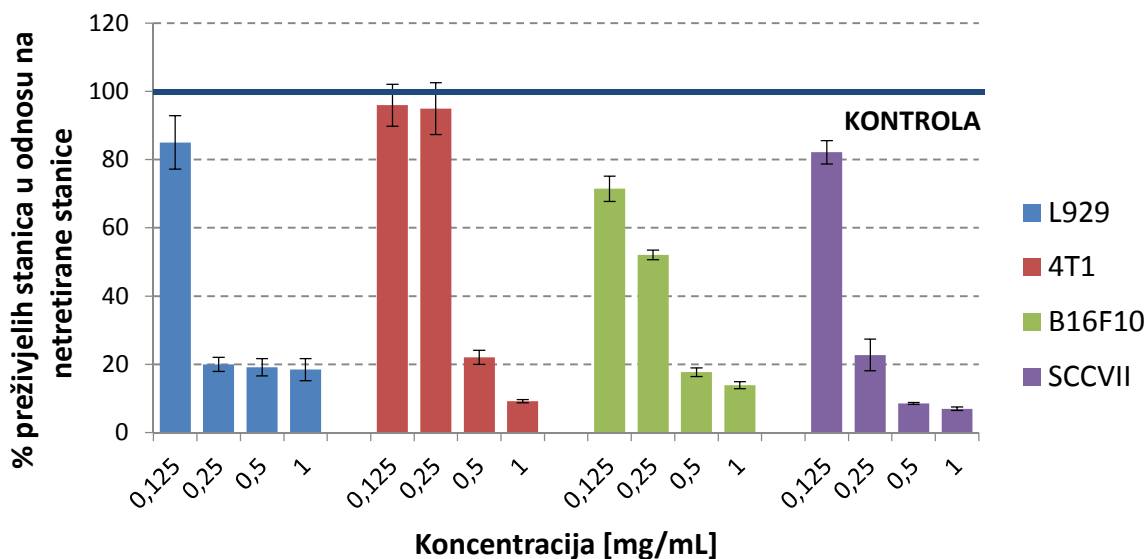
Slika 14. Citotoksični učinci spoja 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline na odabranim tumorskim staničnim linijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju četiriju neovisnih ispitivanja.



Slika 15. Citotoksični učinci spoja trimetil boroksina na odabranim tumorskim staničnim linijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju četiriju neovisnih ispitivanja.



Slika 16. Citotoksični učinci spoja trimetoksi boroksina na odabranim tumorskim staničnim linijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju četiriju neovisnih ispitivanja.



Slika 17. Citotoksični učinci spoja dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata na odabranim tumorskim staničnim linijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju četiriju neovisnih ispitivanja.

Tablica 4. Usporedba LC_{50} vrijednosti citotoksičnog učinka ispitivanih spojeva, izraženih u mM, za različite tumorske stanične linije. Vrijednosti označene različitim slovima unutar pojedinih stupaca međusobno se značajno statistički razlikuju ($p < 0,05$).

Spoj	Stanične linije			
	L929	4T1	B16F10	SCCVII
fenilboronična kiselina	$6,89 \pm 0,46^a$	$7,20 \pm 0,67^a$	$2,52 \pm 0,16^a$	$2,71 \pm 0,16^a$
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	*	$39,65 \pm 3,78^b$	$3,42 \pm 0,28^b$	$4,68 \pm 0,50^b$
trimetil boroksin	$7,18 \pm 0,80^a$	$12,43 \pm 1,67^c$	$3,23 \pm 0,21^b$	$4,34 \pm 0,37^b$
trimetoksi boroksin	$0,67 \pm 0,05^b$	$2,29 \pm 0,20^d$	$1,15 \pm 0,06^c$	$1,74 \pm 0,14^c$
dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat	$0,25 \pm 0,04^c$	$0,40 \pm 0,02^c$	$0,26 \pm 0,02^d$	$0,20 \pm 0,02^d$

* navedeni spoj nije pokazao djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

4.1.2. Ispitivanje antitumorske aktivnosti *in vivo*

Antitumorsko djelovanje spojeva fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) *in vivo*³ ispitano je na istim tumorskim staničnim linijama, koje su korištene u *in vitro* testovima. Učinci intraperitonealne (ip), intratumoralne (it), peroralne (po) i topikalne (to) primjene ispitivanih spojeva na rast stanica 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, B16F10 mišjeg melanoma te SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože, prikazani su na slikama 18 – 20. U svrhu usporedbe, na slici 21 prikazani su rezultati ispitivanja antitumorske aktivnosti za spoj 5-fluorouracila (5-FU) kojeg se smatra najpoznatijim trenutno dostupnim citostatikom.

Iz eksperimentalnih podataka jasno je vidljivo da fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$) ima izraženo antitumorsko djelovanje na sve tri vrste testiranih tumorskih staničnih linija, naročito kada se primijenjuje intraperitonealno. Fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$) značajno ($p < 0,001$) usporava rast stanica 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke u odnosu na kontrolu, neovisno o načinu primjene. Najveća razlika u volumenu tumora zabilježena je kod miševa s injektiranim 4T1 stanicama koji su primali fenilboroničnu kiselinu ($C_6H_7BO_2$) intraperitonealno. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, razlika u volumenu iznosila je 613 mm^3 , što predstavlja $56,9 \pm 4,2 \%$ inhibicije tumorskih stanica i 7-dnevno kašnjenje u razvoju tumora. Nešto slabije djelovanje zamijećeno je u ispitivanjima na SCCVII stanicama, gdje je intraperitonealnim i peroralnim načinom primjene rast tumorskih stanica inhibiran $46,03 \pm 15,5 \%$ ($p < 0,001$) i $32,49 \pm 8,3 \%$ ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu. U ispitivanjima na B16F10 stanicama intraperitonealnim načinom primjene ostvareno je $33,71 \pm 15,9 \%$ ($p = 0,005$) inhibicije rasta tumorskih stanica, dok je kod topikalnog načina primjene učinak izostao. Za razliku od fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), u slučaju 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) slaba antitumorska aktivnost uočena je jedino kod intratumoralnog ($29,99 \pm 7,8 \%$, $p = 0,004$) načina primjene na tumorskim stanicama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke. Na preostale dvije testirane stanične linije, niti jedan način primjene nije značajno utjecao na usporavanje rasta stanica. Štoviše, 2,4,6-trifluorofenil

³ Iako su u *in vitro* istraživanjima pokazali snažno citotoksično djelovanje, spojevi trimetil ($C_3H_9B_3O_3$) i trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$), kao što je ranije pojašnjeno, zbog nestabilnosti u vodenom mediju, nisu bili uključeni u ispitivanja antitumorske aktivnosti.

boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$) djelovala je blago stimulirajuće na stanice SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože.

Pri intraperitonealnoj primjeni dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) na miševе zaražene 4T1 stanicama zabilježeno je $32,28 \pm 9,5 \%$ ($p < 0,001$) inhibicije rasta stanica u odnosu na kontrolu. Učinkovitijim se u ovom slučaju pokazao intratumoralni način primjene, kod kojega je rast tumorskih stanica inhibiran $42,66 \pm 6,3 \%$ ($p < 0,001$). Kod miševa s injektiranim stanicama SCCVII karcinoma pločastih stanica kože, maksimalnih $41,95 \pm 12,2 \%$ ($p < 0,001$) inhibicije ostvareno je 20-tog dana nakon transplatacije tumora intraperitonealnim načinom primjene dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), a tek neznatno slabiji učinak postignut je njegovom peroralnom primjenom. Blago antitumorsko djelovanje spoja dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) primijećeno je i u ispitivanjima na stanicama B16F10 mišjeg melanoma. U razdoblju od 12. dana do kraja eksperimenta, uočena je inhibicija rasta tumorskih stanica u rasponu od 25-30 % ($p < 0,05$) i 35-40 % ($p < 0,005$) za intraperitonealni i topikalni način primjene.

Primjetno je kako su intraperitonealnim načinom primjene spojeva fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) na 4T1 stanicama ostvareni značajno ($p < 0,001$) bolji inhibicijski učinci u usporedbi sa spojem 5-fluorouracilom, koji je ovako primijenjen imao zanemariv utjecaj na rast tumorskih stanica. Upravo suprotno, kod intratumoralnog načina primjene na 4T1 stanicama, spoj 5-fluorouracil pokazao se značajno ($p < 0,001$) djelotvornijim ($63,5 \pm 6,9 \%$) u odnosu na fenilboroničnu kiselinu ($C_6H_7BO_2$, $33,92 \pm 14,6 \%$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$, $42,66 \pm 6,3 \%$). Međutim, treba istaknuti kako je nakon 23. dana provedbe eksperimenta u skupini miševa tretiranih spojem 5-fluorouracila zabilježena visoka stopa smrtnosti od 57 %, dok u skupinama miševa koji su liječeni pripravcima fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) nije bilo smrtnih slučajeva. U ispitivanjima provedenim na tumorskoj staničnoj liniji SCCVII karcinoma pločastih stanica kože uočene su malene, ali ipak statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u djelovanju spoja 5-fluorouracila ($35,13 \pm 5,4 \%$) u odnosu na spoj dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$, $41,95 \pm 12,2 \%$).

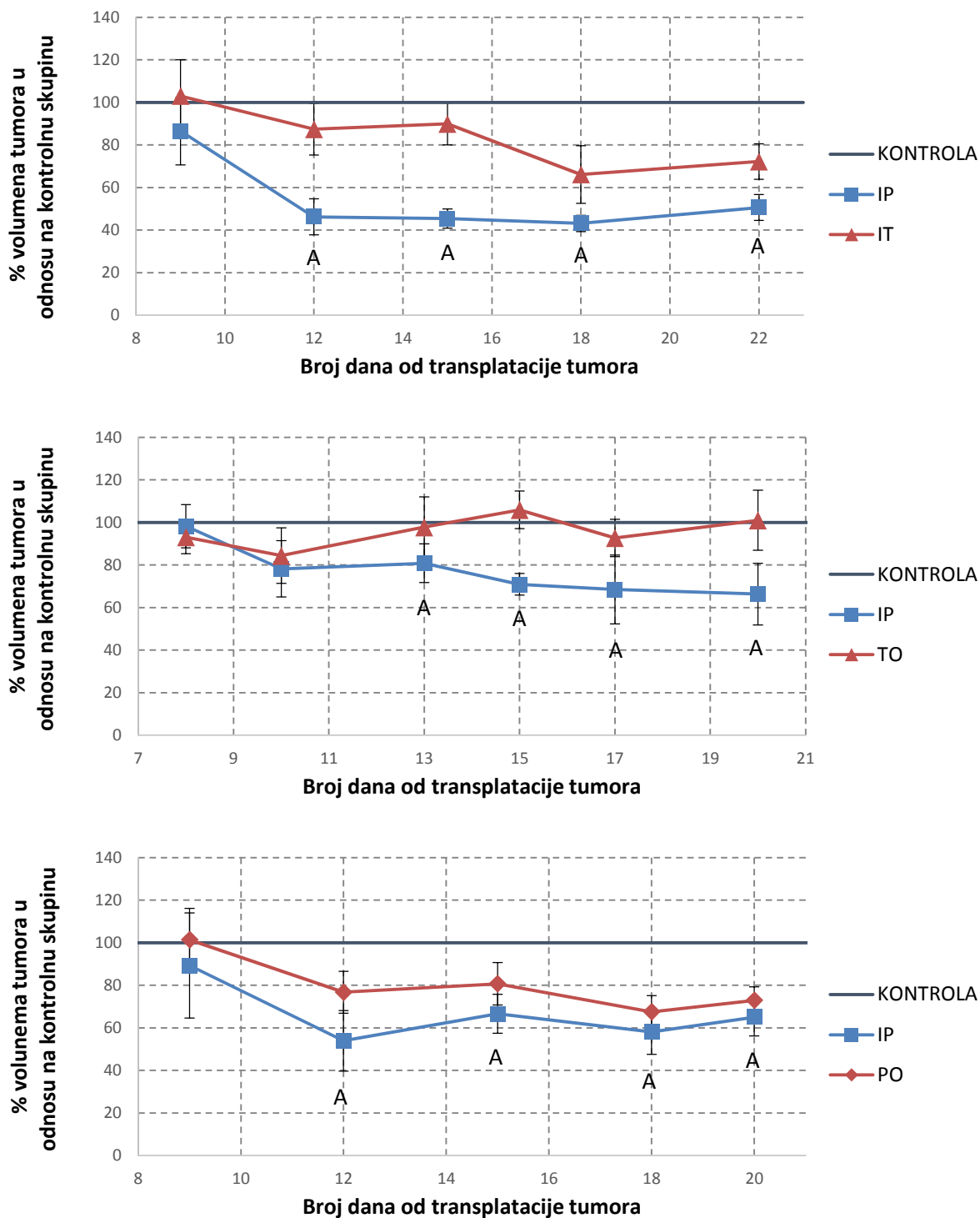
Prikazani rezultati nedvojbeno pokazuju da spoj dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) u *in vivo* uvjetima usporava rast tumorskih stanica 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, B16F10 mišjeg melanoma te SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože u odnosu na kontrolne skupine miševa. Usporeni rast tumora povezan je sa trajanjem terapije. Za vrijeme primanja terapije, rast tumora bio je inhibiran, a nakon prestanka tretmana dolazi do ubrzavanja rasta tumorskih stanica u odnosu na kontrolu. Različiti načini primjene ovog spoja imali su slične učinke na rast tumorskih stanica te nisu uočene značajnije razlike u djelovanju kad je spoj dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) primijenjen intraperitonealno, intratumoralno, peroralno ili topikalno u obliku masti. Ovi rezultati sugeriraju da je spoj dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) stabilan u različitim tjelesnim tekućinama (krv, plazma, itd.) te da bez obzira na način primjene, na neki za sada nerazjašnjeni način, prepoznaje stanice raka ili pak stanice raka imaju neko zajedničko svojstvo koje privlači molekule dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). U prilog ovoj pretpostavci govori i činjenica da mali broj molekula ovog spoja djeluje selektivno te, u mnoštvu normalnih stanica, pronalazi i vrši utjecaj isključivo na stanice raka.

Islamović i suradnici (2014) pretpostavili su da lokalna primjena kreme koja u sebi sadrži dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) ili njegovo intratumoralno injektiranje u mM koncentracijama može uvelike smanjiti aktivnost enzima katalaze i povećati koncentraciju vodikovog peroksida te na taj način proizvesti povoljne učinke isključivo u tumorskim tkivima. U drugom istraživanju (Vullo i sur., 2014) pretpostavilo se da se spoj dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) vezuje za cinkove ione u aktivnom mjestu enzima karbon anhidraze, stvarajući monodentalnu koordinatnu vezu sa metalnim ionima preko svoje OH funkcionalne skupine te je nadalje pretpostavljeno da su uočeni povoljni antitumorski učinci ovog spoja posljedica inhibicije enzima karbon anhidraze koji je prisutan u stanicama raka kože.

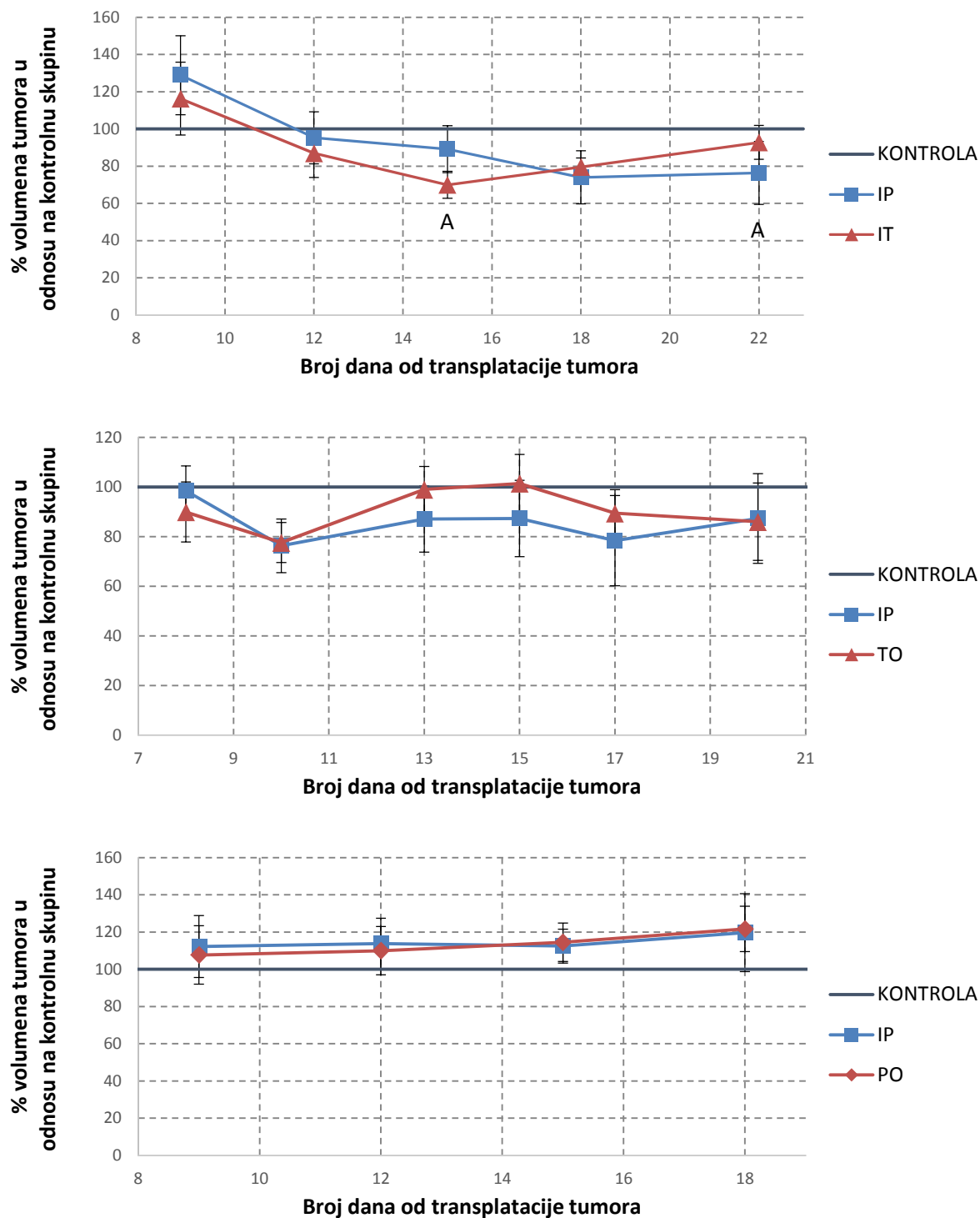
S druge strane, u dosadašnjim istraživanjima za fenilboroničnu kiselinu ($C_6H_7BO_2$) se smatralo da djeluje kao inhibitor proteasoma. Boronične kiseline djeluju kao analozi prijelaznog stanja, stvarajući vodikove i kovalentne veze u aktivnom mjestu enzima. Primjerice, utvrđeno je kako pri pH 7,0 fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$) znatno bolje inhibira djelovanje enzima kimotripsina ($K_i = 1,96 \times 10^{-4}$ M) od fenilmetanola ($K_i = 1,0 \times$

10^{-2} M), koji ne sadrži borove atome. Pokazano je da je inhibicijska aktivnost fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$) u cijelosti posljedica postojanja borovih atoma u strukturi. Male promjene pH mogu za posljedicu imati otpuštanje inhibitora iz aktivnog mjesta enzima, zbog čega se boronične kiseline mogu koristiti kao „biološke sonde“ i u proizvodnji lijekova (Trippier i McGuigana, 2010).

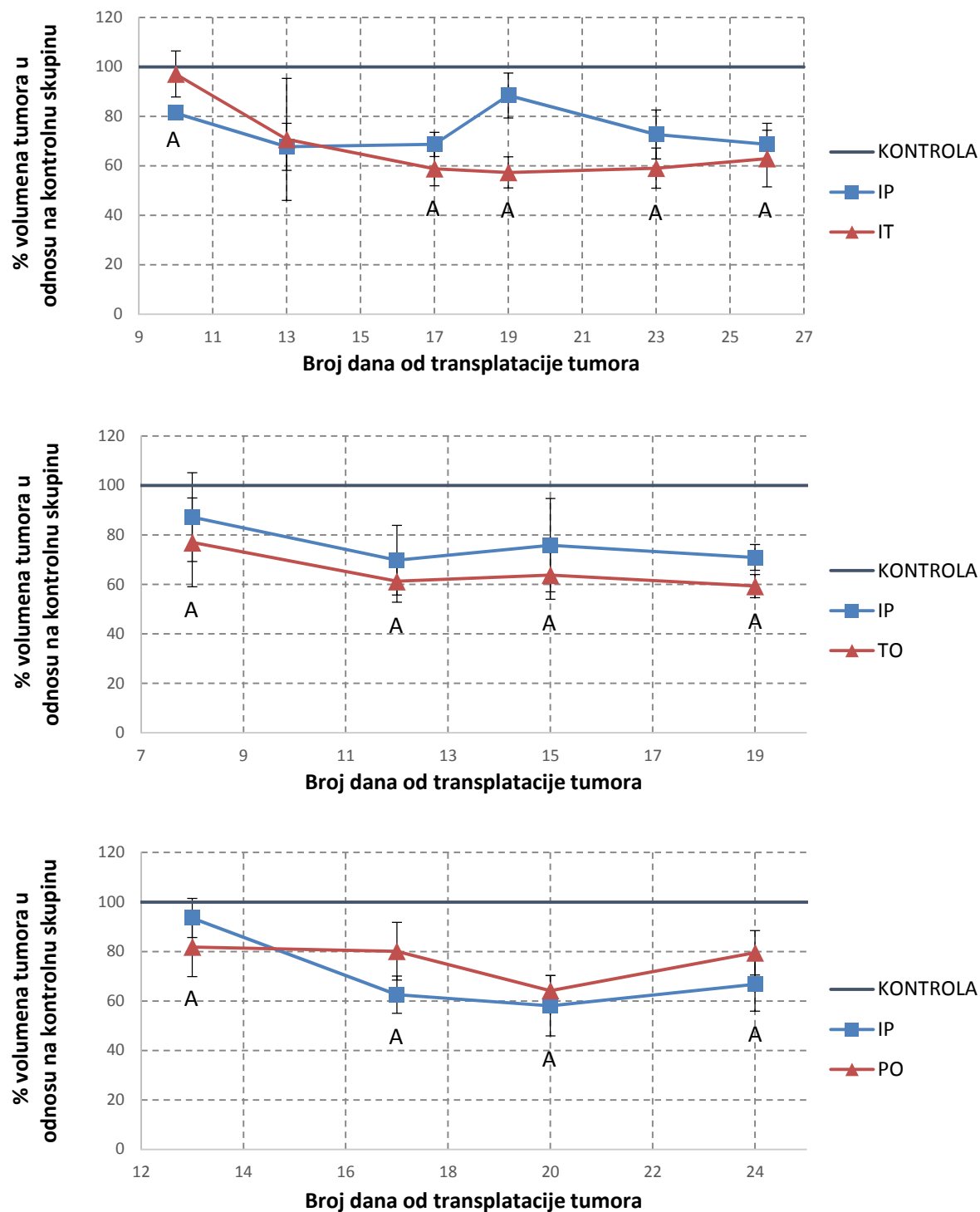
U prikazanim *in vivo* ispitivanjima antitumorske aktivnosti fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$) – s izuzetkom topikalnog načina primjene – nisu uočene značajnije razlike u rezultatima među testiranim tumorskim staničnim linijama, s obzirom na način primjene. Najizraženiji učinci u sva tri slučaja ostvareni su intraperitonealnom primjenom, nakon čega slijede peroralna i intratumoralna primjena. Znatna inhibicija rasta tumora nakon peroralne primjene mogla bi upućivati na to da se fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$) ne metabolizira nakon oralnog unosa ili da njeni metaboliti imaju sličan antitumorski učinak. Ti metaboliti, poput arilboroničnih kiselina i njihovih estera, mogu selektivno reagirati s vodikovim peroksidom te mogu biti metabolizirani, pri čemu nastaju boronski međuprodukti koji se brzo hidroliziraju, otpuštajući fenole, boratne estere i boronične kiseline (Kuivila i Armour, 1957). Boronične kiseline i esteri, čini se, nisu sami po sebi škodljivi, a i borna kiselina, koja nastaje kao krajnji produkt njihove razgradnje, smatra se neotrovnom za ljudska bića (Yang, Gao i Wang, 2003). Poznato je da vodikov peroksid može potaknuti različite prolijeke – biološki neaktivne spojeve čijom razgradnjom unutar tijela nastaju lijekoviti spojevi – združene sa ROS-om, na oslobađanje aktivnih antikancerogenih spojeva (efektora) sa selektivnom toksičnošću usmjerenom prema stanicama raka (Kuang i sur., 2011; Hagen i sur., 2012). Iz svega navedenoga slijedi da se boronične kiseline mogu upotrijebiti u razvoju novih metoda za otpuštanje farmakološki aktivnih tvari, potaknutih visokom razinom vodikovog peroksida u stanicama raka (Peng i Gandhi, 2012). Takvi spojevi mogli bi uništavati zloćudne stanice raka, ne nanoseći pritom gotovo nikakvu štetu zdravim stanicama. Uz to, boronične kiseline pružaju izvrsnu priliku za procjenu učinkovitosti metoda liječenja raka ROS-aktiviranim prolijekevim.



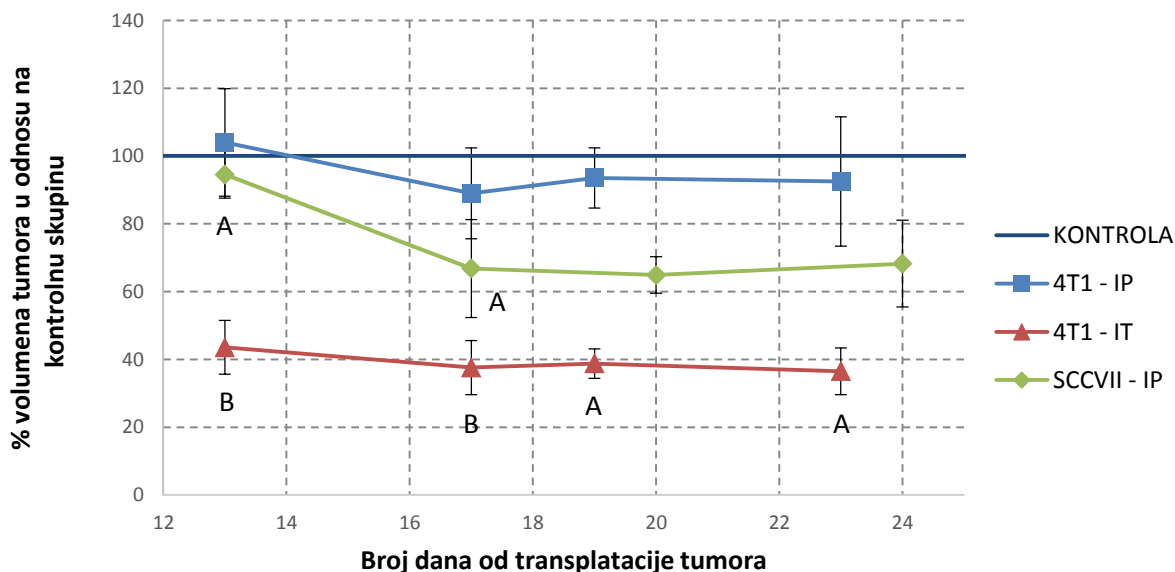
Slika 18. Rezultati *in-vivo* ispitivanja antitumorskog djelovanja spoja fenilboronične kiseline na stanicama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke (gore), B16F10 mišjeg melanoma (sredina) i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože (dolje). Slovima su označene vrijednosti kod kojih postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između ispitivanih načina primjene. IP – intraperitonealna primjena; IT – intratumoralna primjena; PO – peroralna primjena; TO – topikalna primjena



Slika 19. Rezultati *in-vivo* ispitivanja antitumorskog djelovanja spoja 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline na stanicama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke (gore), B16F10 mišjeg melanoma (sredina) i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože (dolje). Slova su označene vrijednosti kod kojih postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između ispitivanih načina primjene. IP – intraperitonealna primjena; IT – intratumoralna primjena; PO – peroralna primjena; TO – topikalna primjena



Slika 20. Rezultati *in-vivo* ispitivanja antitumorskog djelovanja spoja dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborata na stanicama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke (gore), B16F10 mišjeg melanoma (sredina) i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože (dolje). Slovim su označene vrijednosti kod kojih postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između ispitivanih načina primjene. IP – intraperitonealna primjena; IT – intratumoralna primjena; PO – peroralna primjena; TO – topikalna primjena



Slika 21. Rezultati *in-vivo* ispitivanja antitumorskog djelovanja spoja 5-fluorouracila na stanicama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože. Slovom su označene vrijednosti kod kojih postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između ispitivanih načina primjene. IP – intraperitonealna primjena; IT – intratumoralna primjena

4.2. Ispitivanje enzimske kinetike

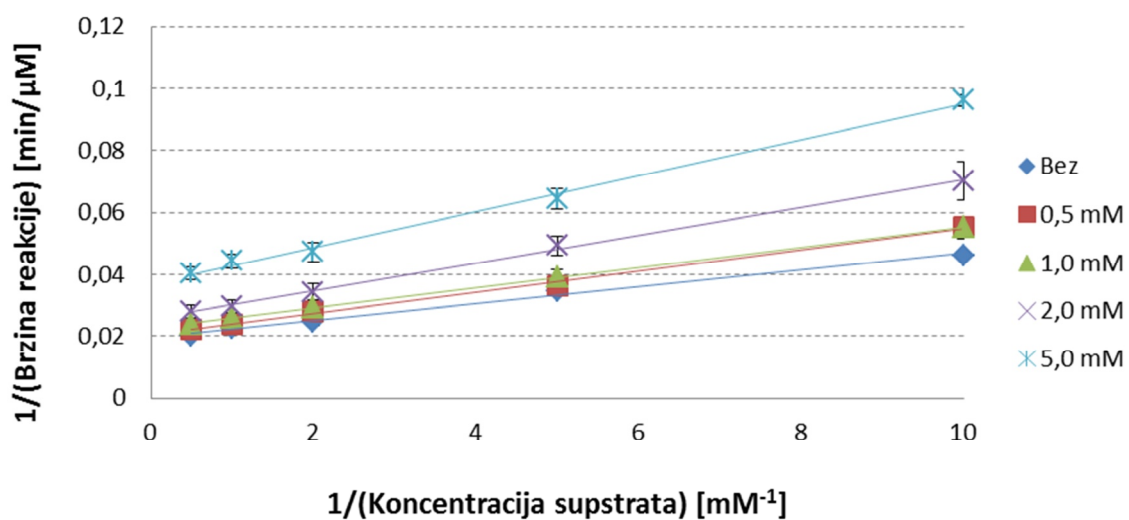
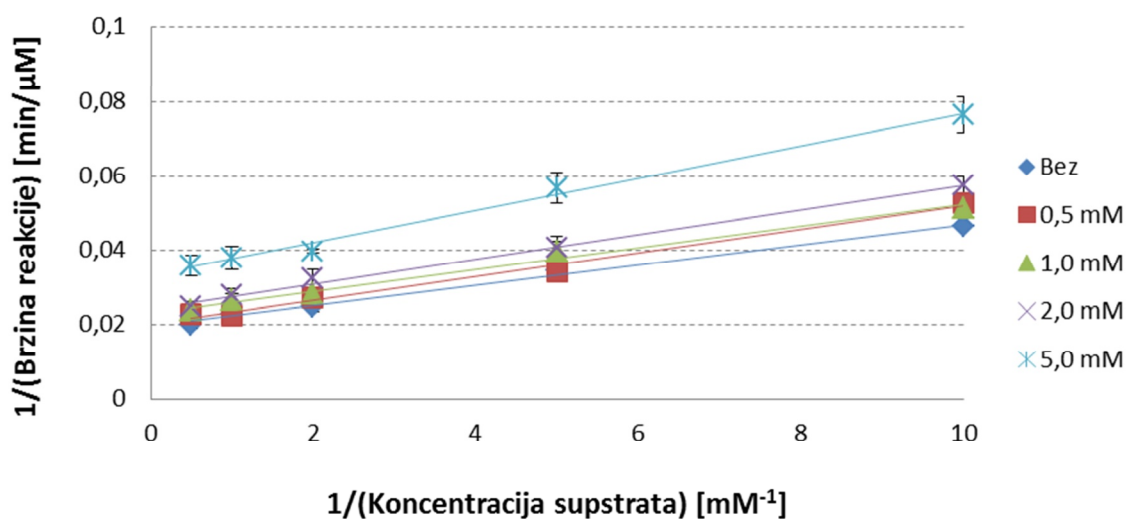
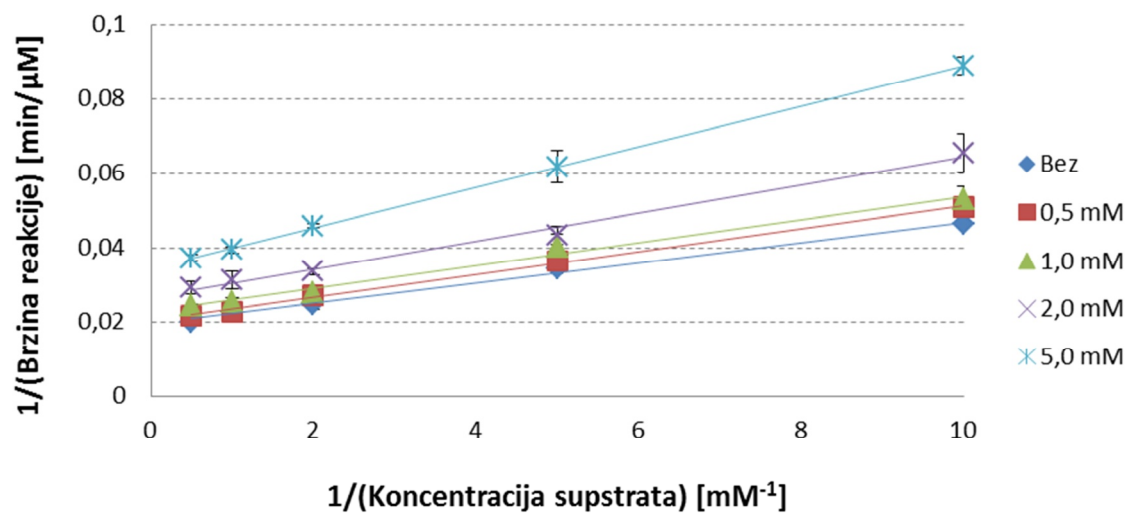
4.2.1. Ispitivanje inhibicije enzima butirilkolinesteraze

Određivanje inhibicijskog učinka spojeva fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) na aktivnost enzima butirilkolinesteraze provedeno je uz korištenje butiriltiokolin jodida kao supstrata, pri pH 8,0 i sobnoj temperaturi, i to primjenom četiri različite koncentracije inhibitora: 0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 mM. Rezultati ispitivanja prikazani su na slikama 22 – 25 te u tablicama 5 i 6. Iz eksperimentalnih podataka, na slikama označenim različitim markerima, metodom linearne regresije procijenjene su vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante (K_m), maksimalne brzine reakcije (V_{max}) i konstante inhibicije (K_i).

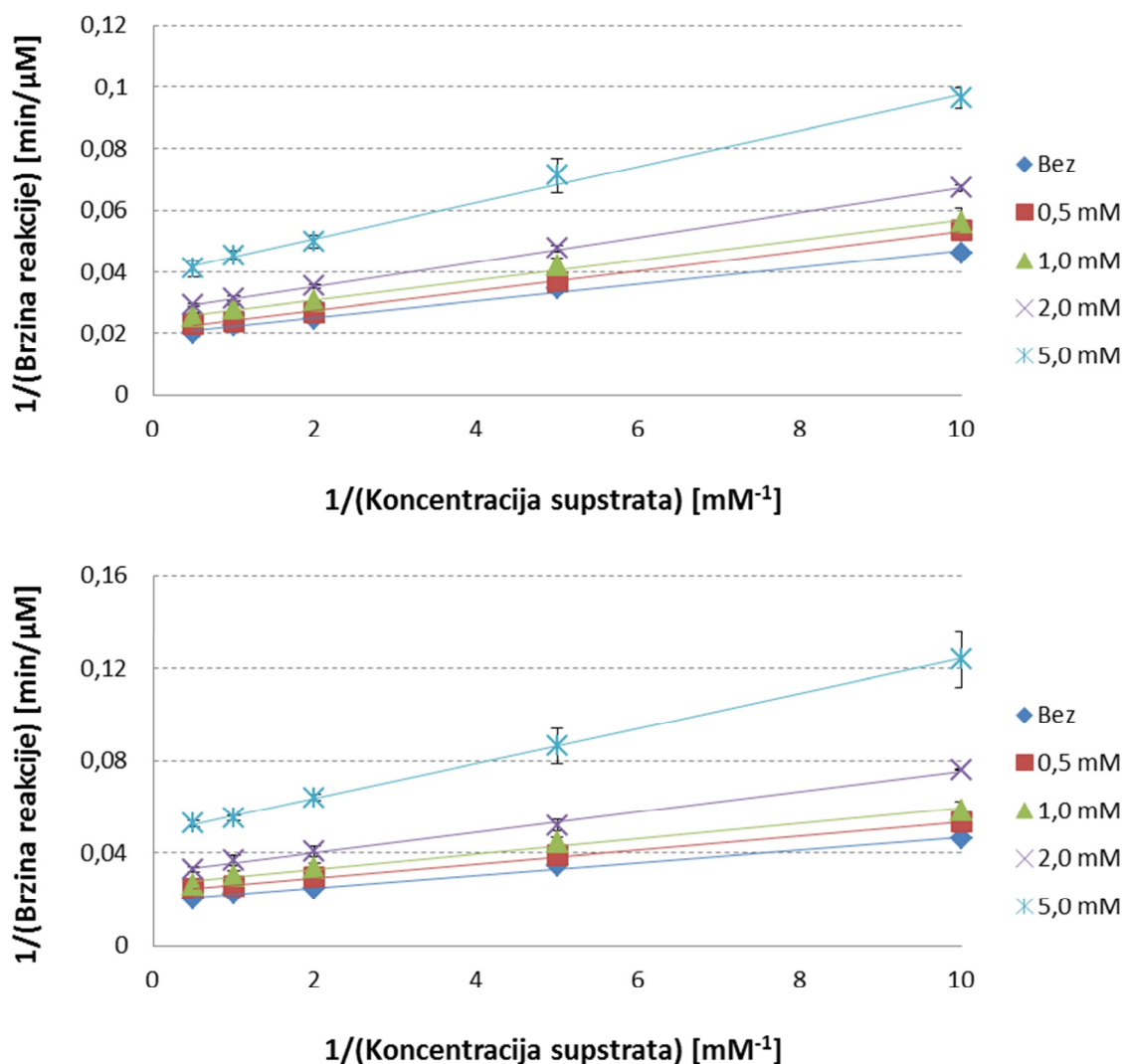
Tablica 5. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za enzim butirilkolinesterazu

Spoj	Koncentracija [mM]	K_m [mM]	V_{max} [μ M/min]
fenilboronična kiselina	Bez	$0,141 \pm 0,005$	$51,402 \pm 0,576$
	0,5	$0,152 \pm 0,008$	$49,207 \pm 1,947$
	1,0	$0,137 \pm 0,010$	$44,130 \pm 0,434$
	2,0	$0,143 \pm 0,014$	$37,733 \pm 1,227$
	5,0	$0,158 \pm 0,012$	$29,014 \pm 0,499$
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	Bez	$0,141 \pm 0,005$	$51,402 \pm 0,576$
	0,5	$0,161 \pm 0,013$	$50,267 \pm 1,209$
	1,0	$0,130 \pm 0,034$	$43,832 \pm 4,531$
	2,0	$0,138 \pm 0,021$	$41,346 \pm 1,677$
	5,0	$0,135 \pm 0,032$	$30,437 \pm 2,940$
trimetil boroksin	Bez	$0,141 \pm 0,005$	$51,402 \pm 0,576$
	0,5	$0,168 \pm 0,031$	$48,814 \pm 3,388$
	1,0	$0,145 \pm 0,010$	$44,360 \pm 3,555$
	2,0	$0,182 \pm 0,064$	$39,527 \pm 5,134$
	5,0	$0,159 \pm 0,024$	$27,171 \pm 2,362$
trimetoksi boroksin	Bez	$0,141 \pm 0,005$	$51,402 \pm 0,576$
	0,5	$0,156 \pm 0,009$	$48,127 \pm 1,121$
	1,0	$0,135 \pm 0,030$	$41,104 \pm 3,114$
	2,0	$0,146 \pm 0,005$	$36,581 \pm 0,385$
	5,0	$0,149 \pm 0,004$	$25,502 \pm 0,608$
dikalijevtrioksohidroksi- tetrafluortriborat	Bez	$0,141 \pm 0,005$	$51,402 \pm 0,576$
	0,5	$0,135 \pm 0,039$	$43,729 \pm 4,383$
	1,0	$0,126 \pm 0,028$	$37,993 \pm 3,135$
	2,0	$0,142 \pm 0,009$	$32,011 \pm 0,781$
	5,0	$0,158 \pm 0,033$	$20,743 \pm 0,490$

Analiza dobivenih kinetičkih parametara pokazuje da kod vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante K_m ne postoji izraženi trend promjene, dok se maksimalna brzina reakcije V_{max} , s porastom koncentracije, za sve ispitivane spojeve, smanjuje. Svi ispitivani inhibitori, pri višim koncentracijama, ostvarili su značajne ($p < 0,001$) postotke inhibicije. Najveći inhibicijski učinak na aktivnost enzima butirilkolinesteraze imao je spoj dikalijevogtrioksohidroksi-tetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). Ovaj spoj pri koncentraciji od 5 mM u reakcijskoj smjesi izazvao je $59,6 (\pm 0,7, p < 0,001)$ % inhibicije enzima. Pri istoj koncentraciji, izražene učinke ostvarili su i trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$) sa $50,4 (\pm 0,3, p < 0,001)$ %



Slika 22. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim butirilkolinesterazu, pri različitim koncentracijama fenilboronične kiseline (gore), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (sredina) i trimetil boroksina (dolje).



Slika 23. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim butirilkolinesterazu, pri različitim koncentracijama trimetoksi boroksina (gore) i dikalijevotrioksohidroksitetrafluoroborata (dolje).

te trimetil boroksin ($\text{C}_3\text{H}_9\text{B}_3\text{O}_3$) sa $47,1 (\pm 3,0, p = 0,002)$ % inhibicije, dok su fenilboronična ($\text{C}_6\text{H}_7\text{BO}_2$) i 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($\text{C}_6\text{H}_4\text{BF}_3\text{O}_2$) pokazale slabije inhibicijske učinke iznosu od $43,5 (\pm 0,5, p < 0,001)$ %, odnosno $40,8 (\pm 4,6, p < 0,001)$ %. I pri najnižoj koncentraciji od 0,5 mM, dikalijevotrioksohidroksitetrafluoroborata ($\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$) pokazao se najboljim inhibitorom izazivajući $14,9 (\pm 7,2, p = 0,04)$ % inhibicije, dok su – za razliku od njega – ostali ispitivani inhibitori pokazali zanemariv postotak inhibicije, manji od 7 %. Na temelju dobivenih rezultata, razvidno je da se svi ispitivani spojevi ponašaju kao nekompetitivni inhibitori, što upućuje na njihovu interakciju

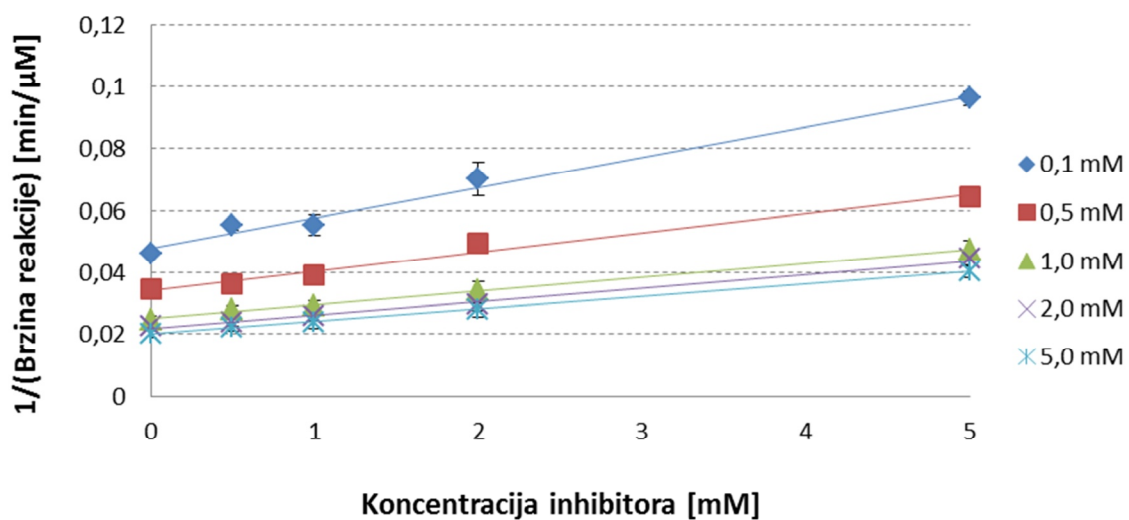
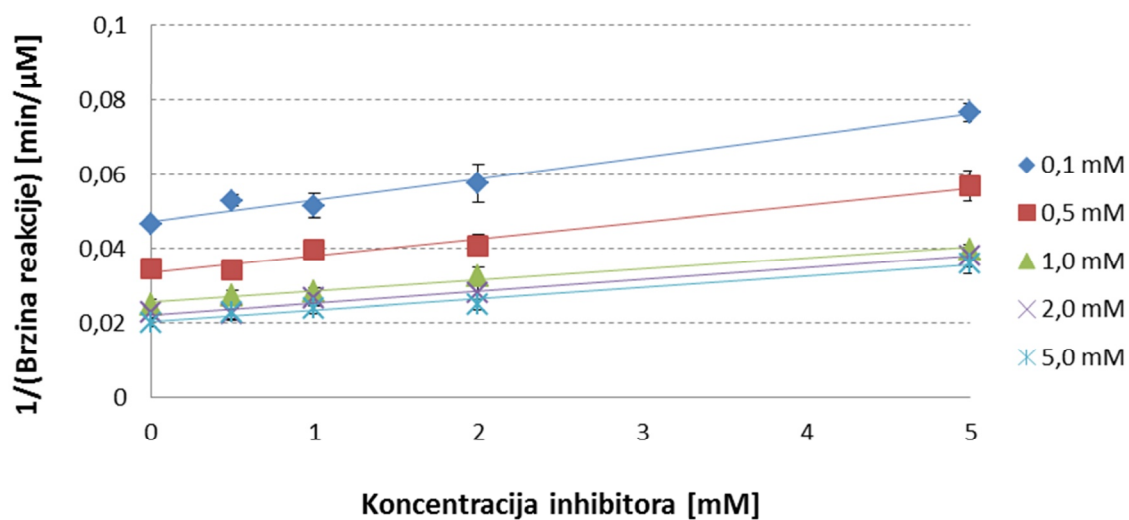
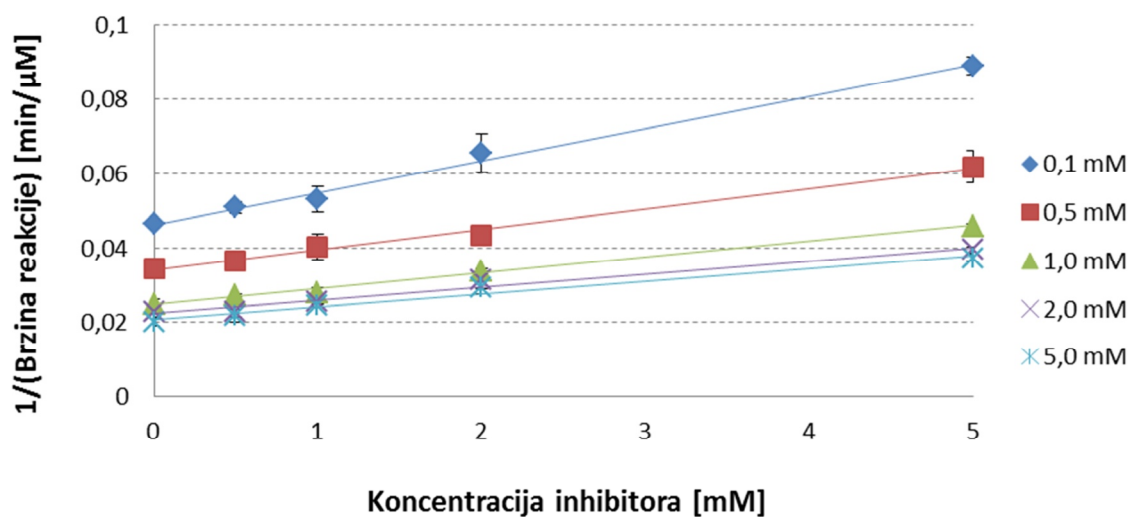
sa dijelovima strukture enzima koji nisu aktivno mjesto. Takav zaključak ne iznenađuje, s obzirom da ispitivani spojevi strukturno nisu slični supstratu butiriltiokolin jodidu.

Iz podataka u tablici 5 može se zaključiti da veći inhibicijski učinak prikazuje karakteristični boroksinski prsten, prisutan kod istoimenih spojeva, za razliku od običnog benzenskog prstena. Primjetno je i da najveći postotak inhibicije enzima butirilkolinesteraze ostvaruju spojevi dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) i trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$), kod kojih su u strukturi prisutne elektrofilne skupine vezane na boroksinski prsten, koje ga dodatno aktiviraju. Daljnje objašnjenje za izraženu sposobnost inhibicije dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) može se pronaći u prisustvu dva borova atoma u tzv. sp^3 hibridizaciji, zahvaljujući kojoj se oni nalaze u pobuđenom stanju.

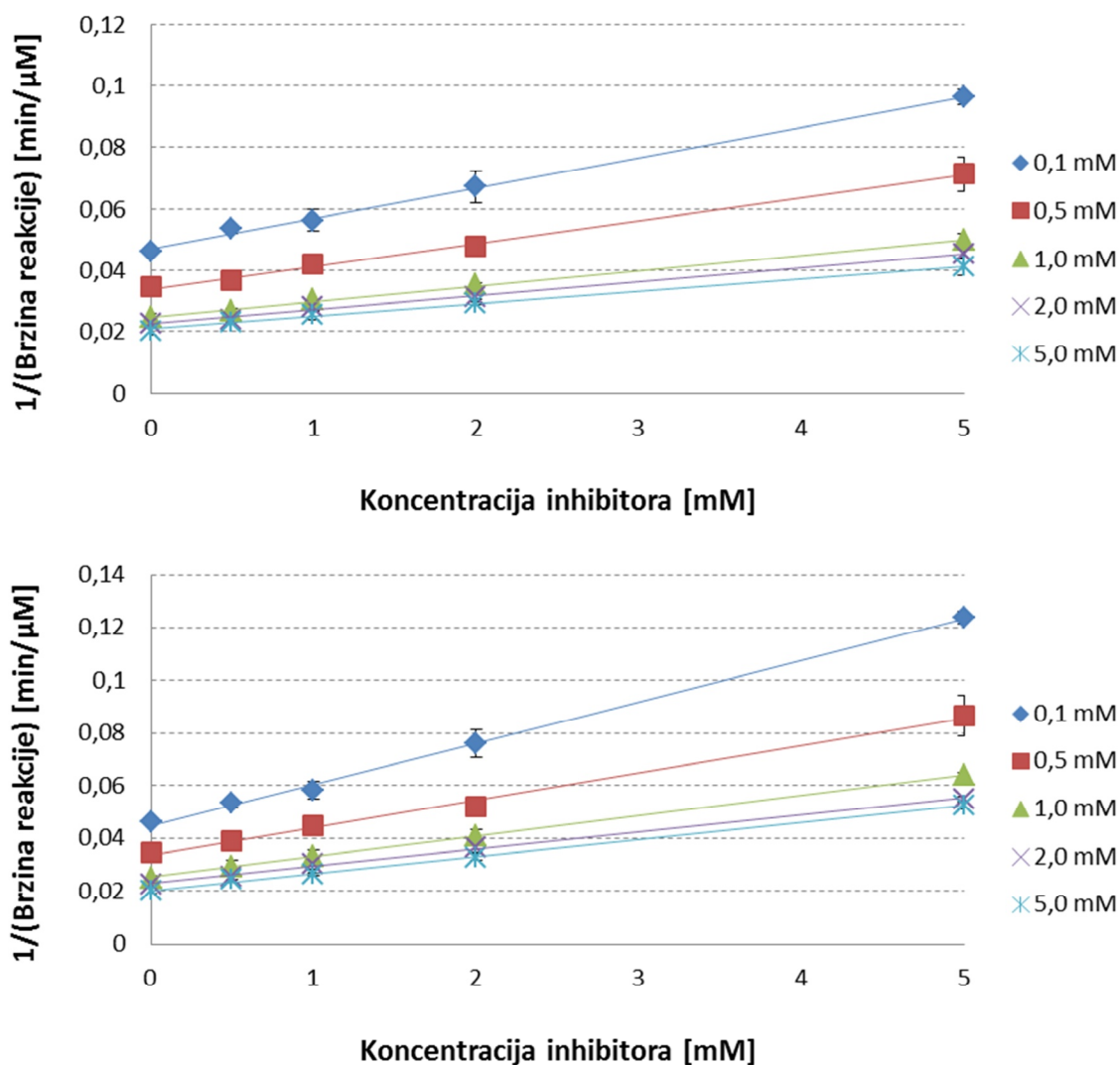
Tablica 6. Usporedba vrijednosti inhibicijskih konstanti K_i , izraženih u mM, za različite ispitivane enzime i spojeve inhibitora. Vrijednosti označene različitim slovima unutar pojedinih stupaca međusobno se značajno statistički razlikuju ($p < 0,05$).

Spoj	Enzim				
	Butirilkolin- esteraza	Tirozinaza	Heksokinaza	Laktat- dehidrogenaza	Piruvat- kinaza
fenilboronična kiselina	5,939 ^a ± 0,369	54,096 ^a ± 10,252	33,929 ^a ± 2,903	35,209 ^a ± 5,131	35,948 ^a ± 8,469
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	7,658 ^b ± 0,800	40,134 ^b ± 2,853	28,509 ^{a,b} ± 6,737	28,732 ^b ± 3,166	27,836 ^a ± 3,583
trimetil boroksin	5,221 ^c ± 0,402	20,591 ^c ± 2,975	22,767 ^{b,c} ± 5,045	26,601 ^b ± 1,295	16,829 ^b ± 1,999
trimetoksi boroksin	4,869 ^c ± 0,194	15,908 ^d ± 1,716	18,481 ^{c,d} ± 1,586	17,871 ^c ± 1,747	12,820 ^c ± 2,896
dikalijevtriokso- hidroksitetrafluortriborat	3,249 ^d ± 0,238	32,662 ^e ± 3,926	22,249 ^{c,e} ± 2,362	21,576 ^d ± 2,628	9,968 ^c ± 0,969

Vrijednosti izračunatih konstanti inhibicije K_i za ispitivane inhibitore iznose redom: 3,25 mM za dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), 4,87 mM za trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$), 5,22 mM za trimetil boroksin ($C_3H_9B_3O_3$), 5,94 mM za fenilboroničnu kiselinu ($C_6H_7BO_2$) te 7,66 mM za 2,4,6-trifluorofenil boroničnu kiselinu ($C_6H_4BF_3O_2$).



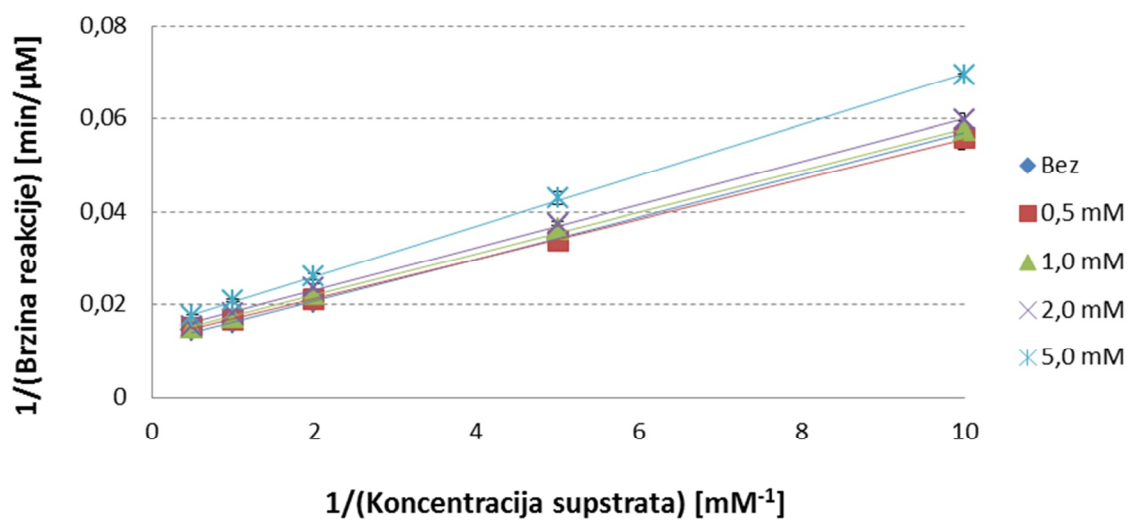
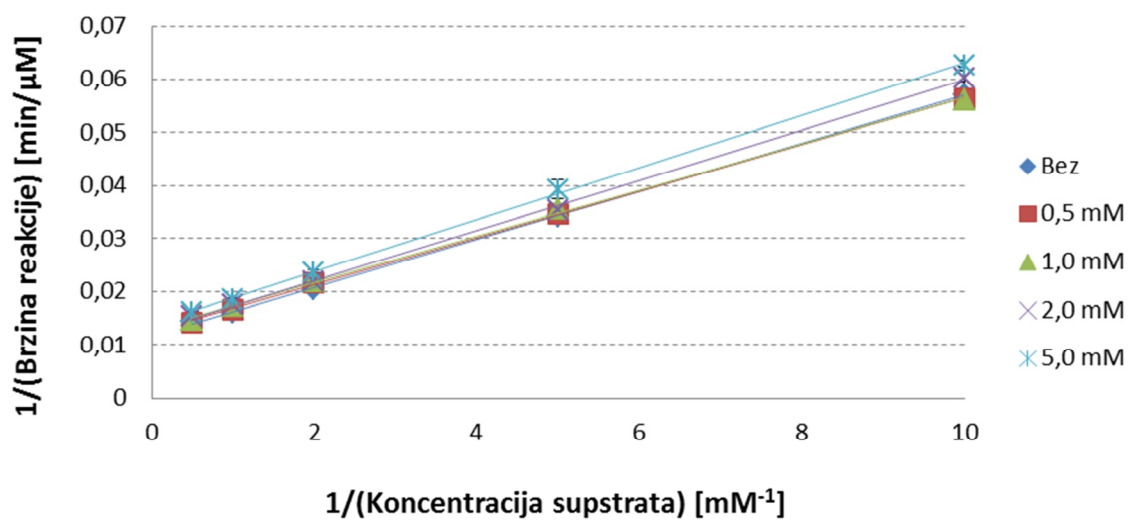
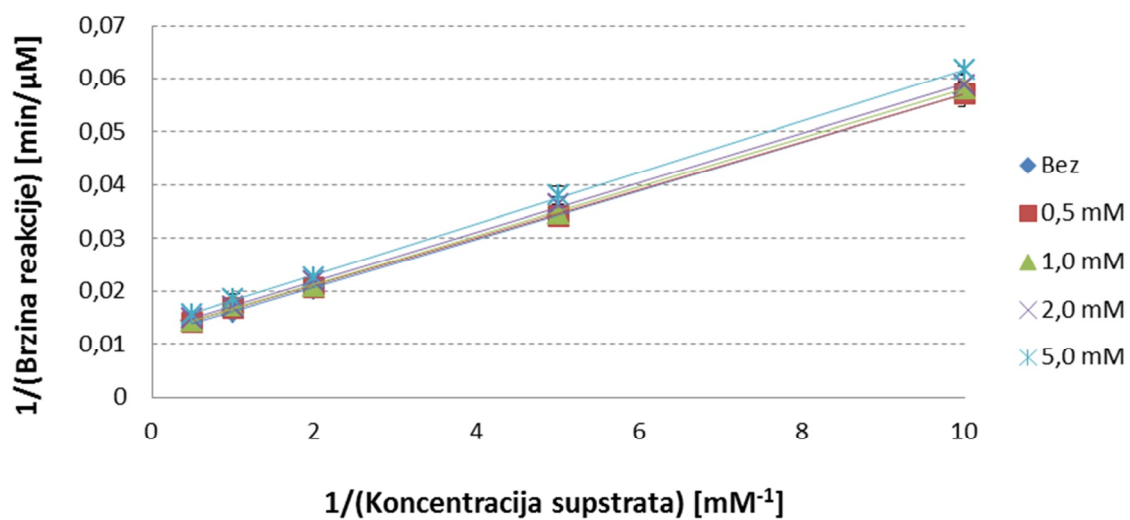
Slika 24. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji fenilboronične kiseline (gore), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (sredina) i trimetil boroksina (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim butirilkolinesterazu.



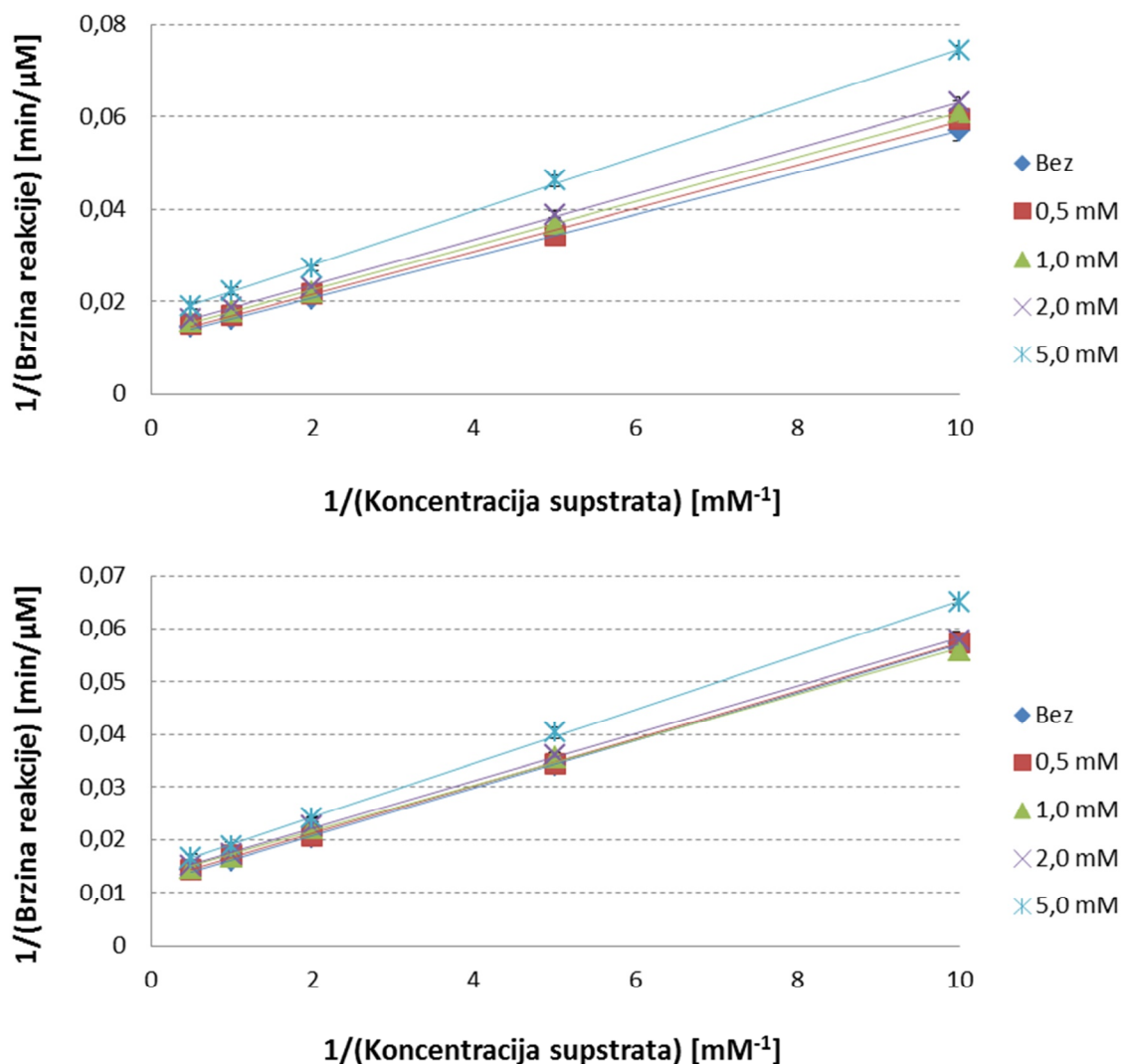
Slika 25. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji trimetoksi boroksina (gore) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluoriborata (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim butirilkolinesterazu.

4.2.2. Ispitivanje inhibicije enzima tirozinaze

Inhibicijski učinak derivata boroničnih kiselina fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluoriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) na aktivnost enzima tirozinaze ispitivan je uz korištenje L-DOPE kao supstrata, pri pH 6,5 i sobnoj temperaturi, primjenom četiri različite koncentracije inhibitora: 0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 mM. Rezultati ispitivanja i vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante (K_m), maksimalne brzine reakcije (V_{max}) i konstante inhibicije (K_i), procijenjenih metodom linearne regresije iz mjerenih podataka, dani su na slikama 26 – 29 te u tablicama 6 i 7.



Slika 26. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim tirozinazu, pri različitim koncentracijama fenilboronične kiseline (gore), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (sredina) i trimetil boroksina (dolje).



Slika 27. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim tirozinazu, pri različitim koncentracijama trimetoksi boroksina (gore) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata (dolje).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su inhibicijski učinci svih ispitivanih spojeva, na višim koncentracijama, značajno ($p < 0,05$) slabiji u odnosu na ostvarene inhibicijske potencijale kod enzima butirilkolinesteraze. Ponovno se može uočiti da spojevi s boroksinim prstenom imaju nešto jače izraženu sposobnost inhibicije. Najjači inhibicijski učinak na aktivnost enzima tirozinaze, u iznosu od približno $27,2 (\pm 2,8, p = 0,001) \%$, zabilježen je za spoj trimetoksi boroksina ($\text{C}_3\text{H}_9\text{B}_3\text{O}_6$), pri koncentraciji od 5 mM. Osim kod njega, pri istoj koncentraciji, jače izraženi inhibicijski učinak od $22,2 (\pm 3,1, p = 0,003) \%$, izmjeren je i za spoj trimetil boroksina ($\text{C}_3\text{H}_9\text{B}_3\text{O}_3$), dok su dvije fenilboronične kiseline i dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$) ostvarili znatno slabije učinke od

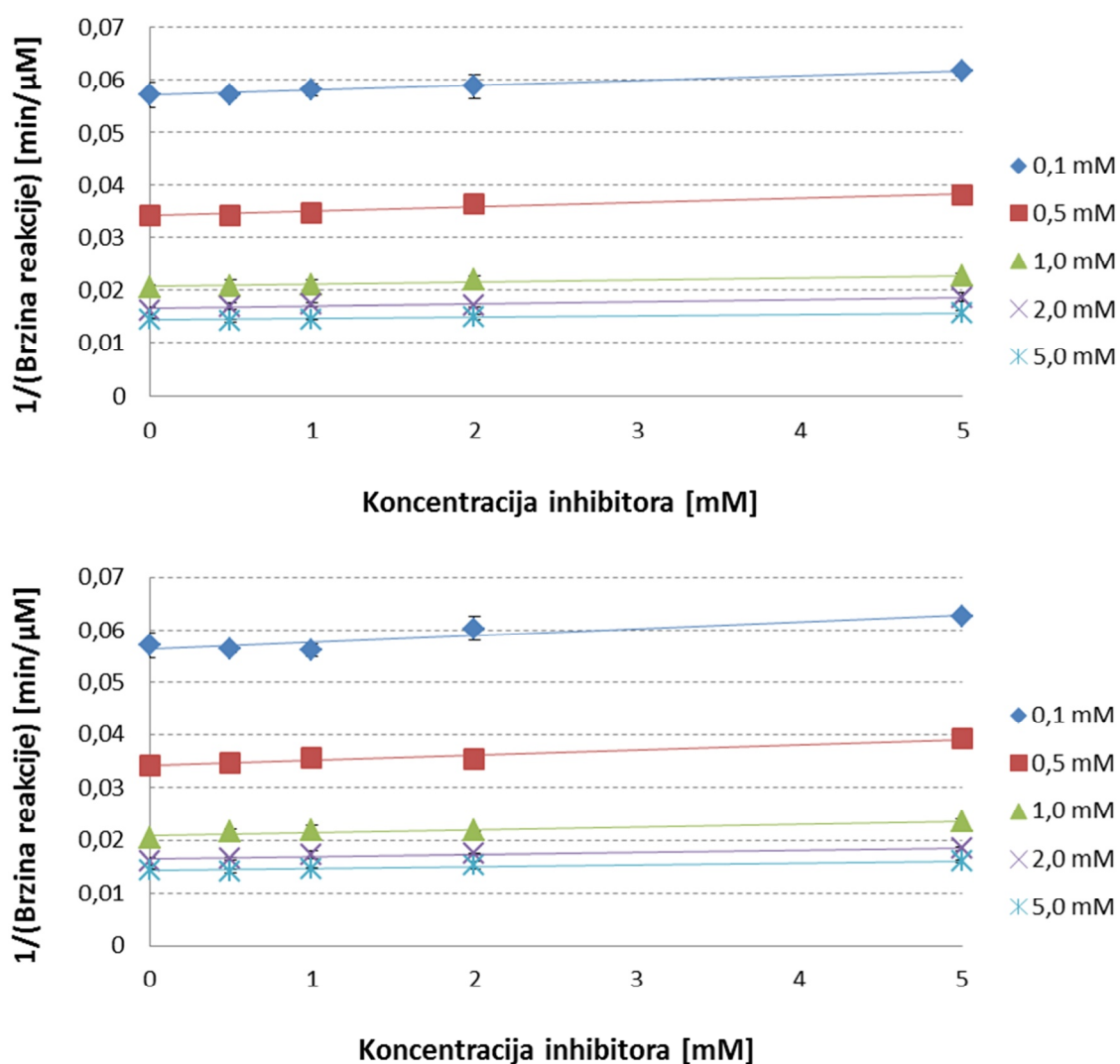
11,7 ($\pm 3,8$, $p = 0,02$) %, 14,5 ($\pm 3,8$, $p = 0,01$) %, odnosno 15,7 ($\pm 4,2$, $p = 0,009$) % inhibicije.

Tablica 7. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za enzim tirozinazu

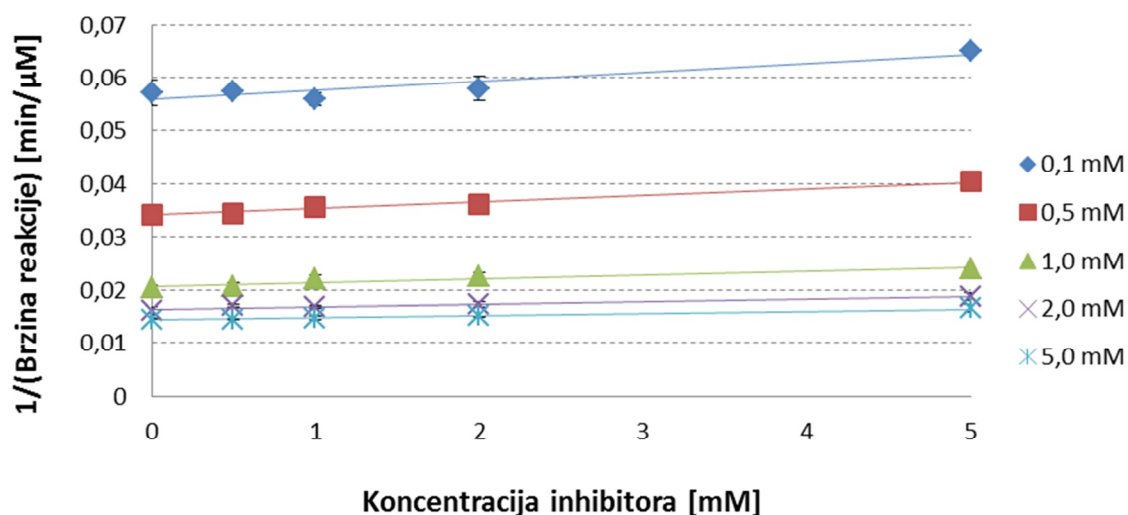
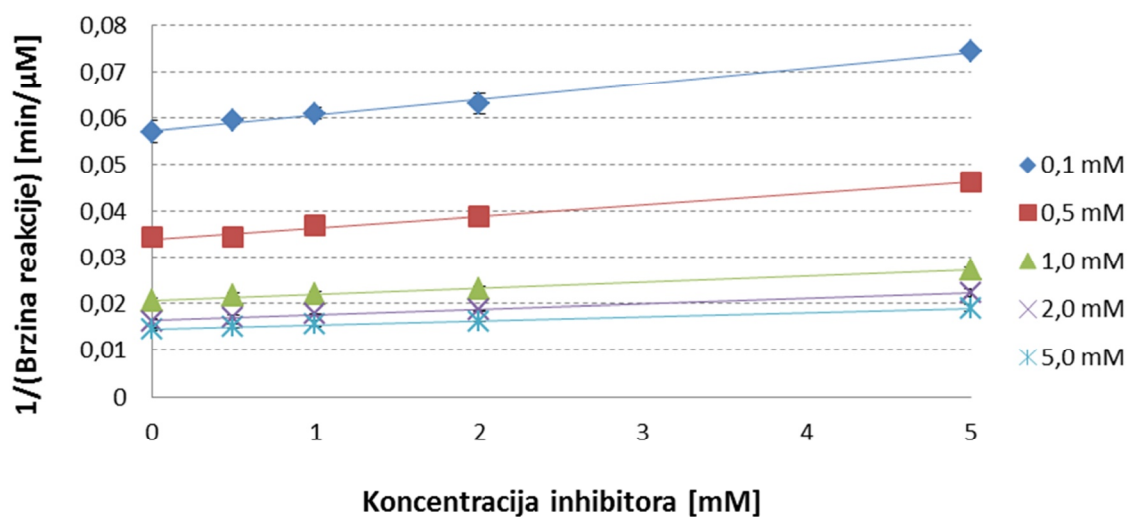
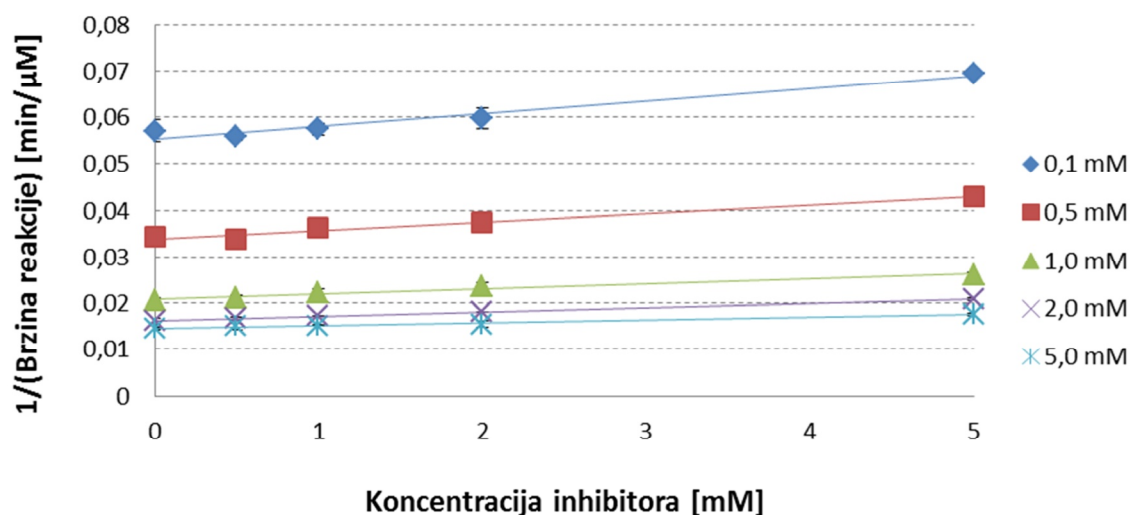
Spoj	Koncentracija [mM]	K_m [mM]	V_{max} [μ M/min]
fenilboronična kiselina	Bez	$0,386 \pm 0,048$	$85,177 \pm 4,670$
	0,5	$0,374 \pm 0,015$	$83,207 \pm 1,676$
	1,0	$0,379 \pm 0,025$	$82,643 \pm 3,023$
	2,0	$0,370 \pm 0,032$	$79,455 \pm 2,307$
	5,0	$0,364 \pm 0,008$	$75,058 \pm 0,306$
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	Bez	$0,386 \pm 0,048$	$85,177 \pm 4,670$
	0,5	$0,359 \pm 0,010$	$81,011 \pm 0,827$
	1,0	$0,338 \pm 0,036$	$77,366 \pm 4,953$
	2,0	$0,379 \pm 0,018$	$79,972 \pm 1,214$
	5,0	$0,359 \pm 0,008$	$72,680 \pm 0,679$
trimetil boroksin	Bez	$0,386 \pm 0,048$	$85,177 \pm 4,670$
	0,5	$0,345 \pm 0,033$	$79,878 \pm 2,307$
	1,0	$0,340 \pm 0,018$	$75,975 \pm 2,608$
	2,0	$0,339 \pm 0,019$	$72,943 \pm 1,964$
	5,0	$0,361 \pm 0,014$	$66,057 \pm 2,198$
trimetoksi boroksin	Bez	$0,386 \pm 0,048$	$85,177 \pm 4,670$
	0,5	$0,380 \pm 0,032$	$81,511 \pm 4,001$
	1,0	$0,372 \pm 0,024$	$77,540 \pm 0,871$
	2,0	$0,365 \pm 0,017$	$73,630 \pm 1,374$
	5,0	$0,362 \pm 0,011$	$61,893 \pm 1,098$
dikalijevtrioksohidroksi- tetrafluortriborat	Bez	$0,386 \pm 0,048$	$85,177 \pm 4,670$
	0,5	$0,375 \pm 0,015$	$82,925 \pm 1,902$
	1,0	$0,337 \pm 0,022$	$77,349 \pm 2,314$
	2,0	$0,346 \pm 0,017$	$76,558 \pm 1,567$
	5,0	$0,368 \pm 0,012$	$71,717 \pm 1,770$

S obzirom na preliminarne rezultate istraživanja, tijekom kojih je utvrđeno značajno djelovanje dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) na stanice melanoma, očekivalo se da bi ispitivani spojevi mogli imati jači utjecaj na aktivnost enzima tirozinaze, budući da upravo taj enzim igra ključnu ulogu u sintezi pigmenta melanina u ljudskom organizmu. Nadalje, Vullo i suradnici (2014) pokazali su da dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) uspješno inhibira čak 10 od 11 mogućih izoformi karbon anhidraza, što je objašnjeno njegovim vezivanjem sa cinkovim ionima u aktivnom

mjestu enzima. Kako se u aktivnom mjestu enzima tirozinaze nalaze bakreni ioni, moglo se pretpostaviti da bi se slična interakcija mogla dogoditi i pri djelovanju ispitivanih spojeva na ovaj enzim. No, rezultati ispitivanja opovrgavaju ovu pretpostavku i ukazuju da, ukoliko i dolazi do interakcije s bakrenim ionima, ta reakcija nema značajnijeg utjecaja na aktivnost enzima tirozinaze. Moguće je također da najveći zabilježeni postotak inhibicije u slučaju trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) nije posljedica njegovog izravnog inhibitorskog djelovanja, već njegove agresivne interakcije sa supstratom i vodom, pri čemu nastaje metanol koji ometa aktivnost enzima.



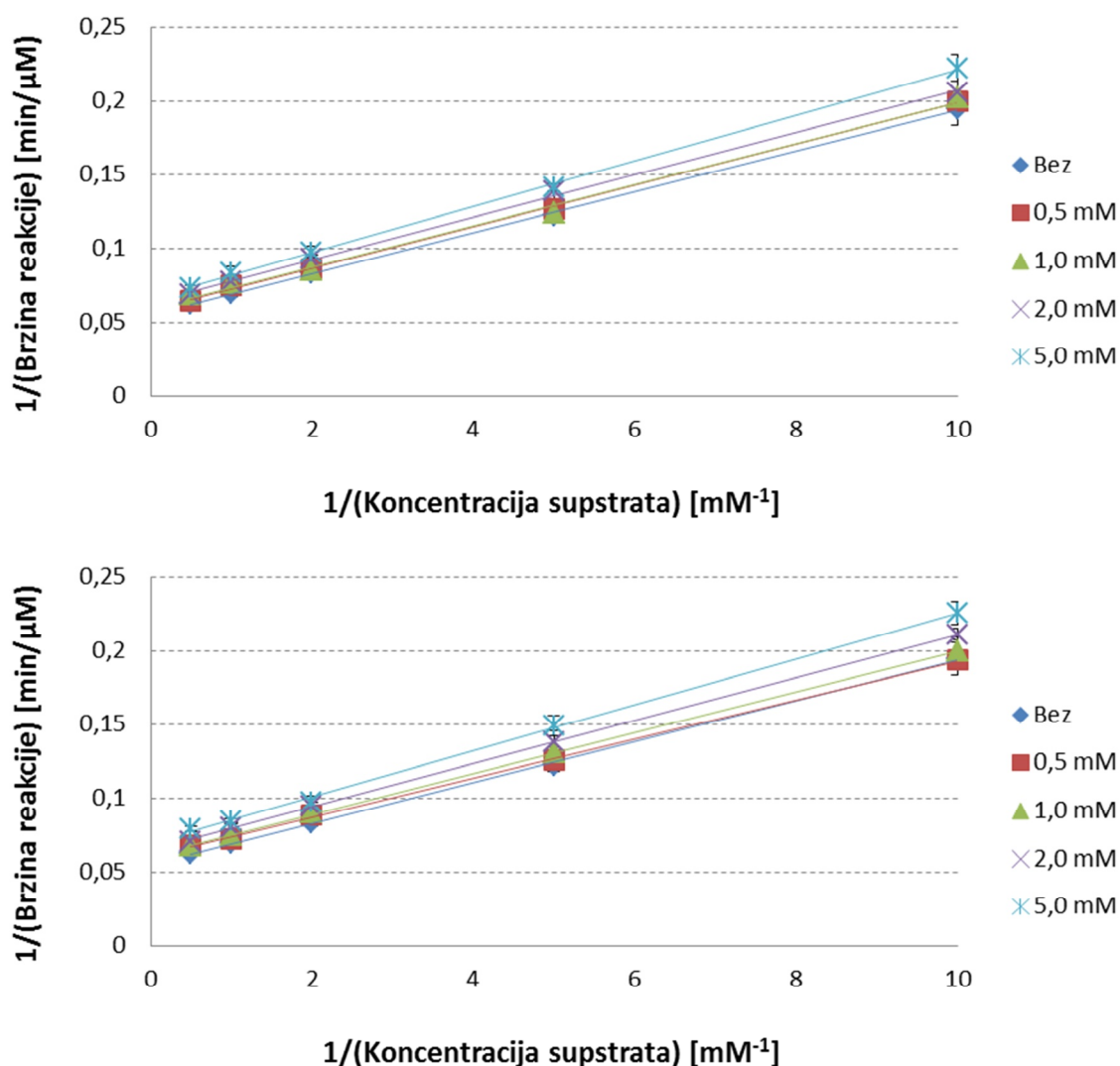
Slika 28. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji fenilboronične kiseline (gore) i 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim tirozinazu.



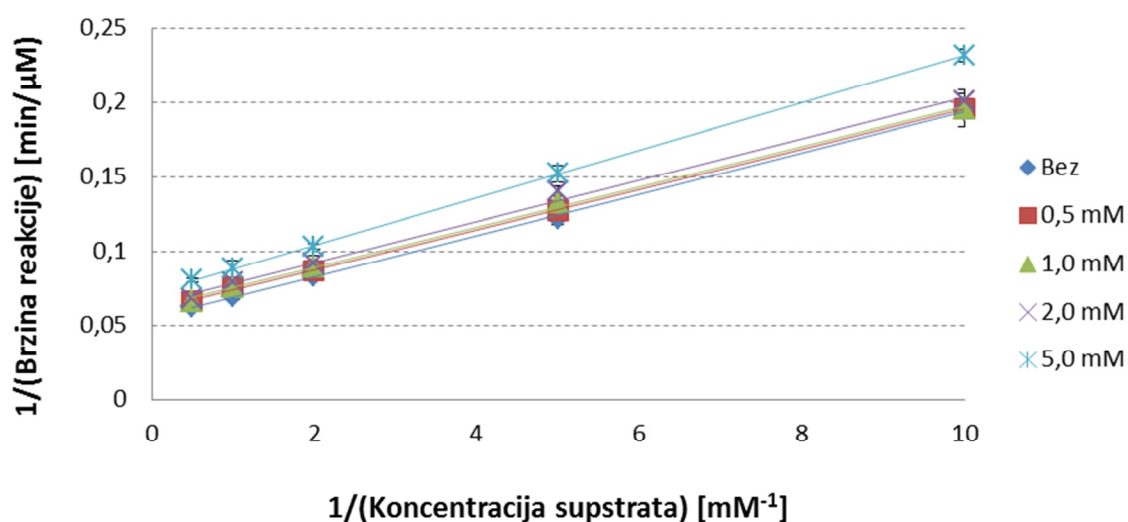
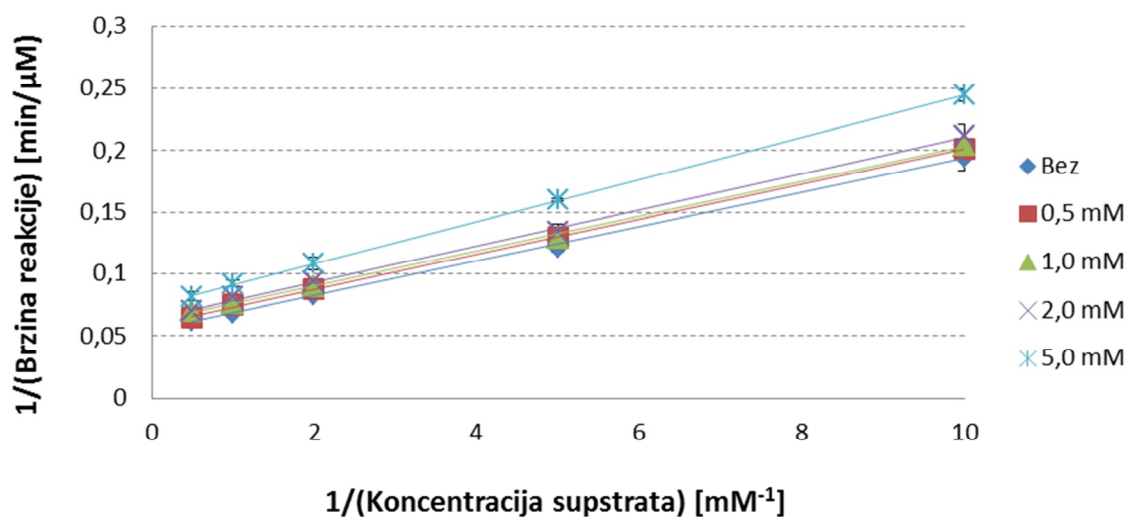
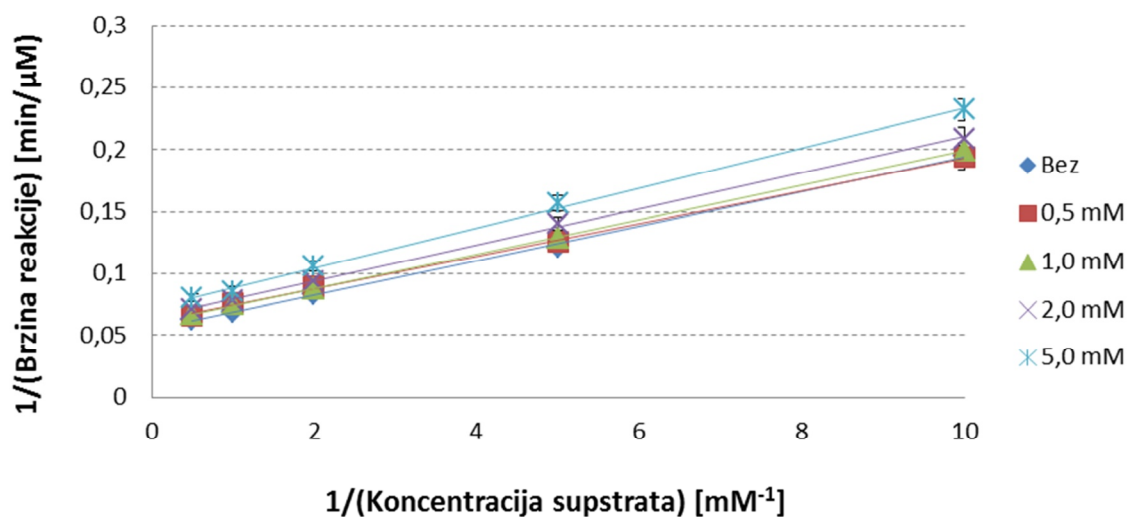
Slika 29. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji trimetil boroksina (gore), trimetoksi boroksina (sredina) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluoroborata (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim tirozinazu.

4.2.3. Ispitivanje inhibicije enzima heksokinaze

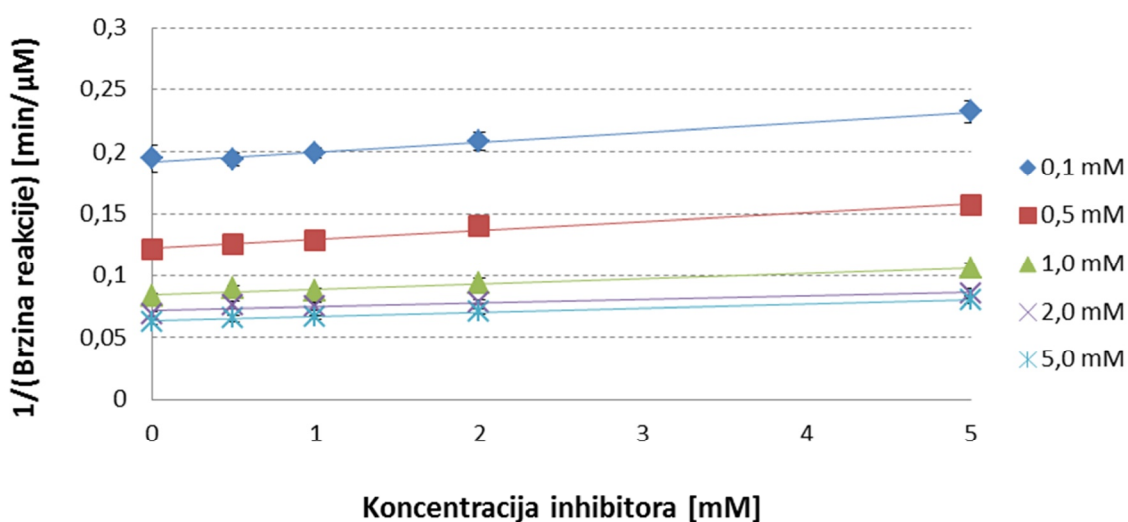
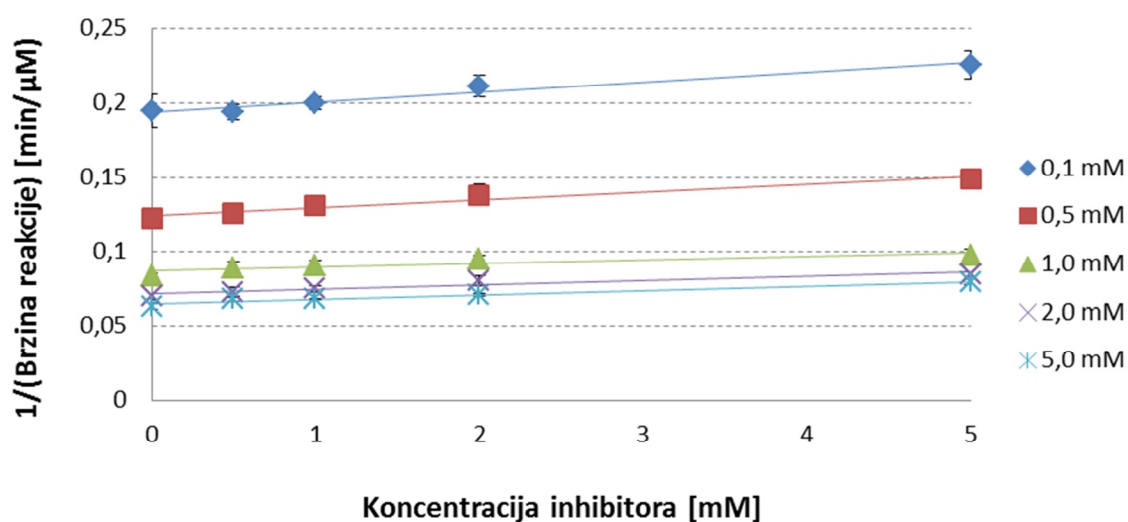
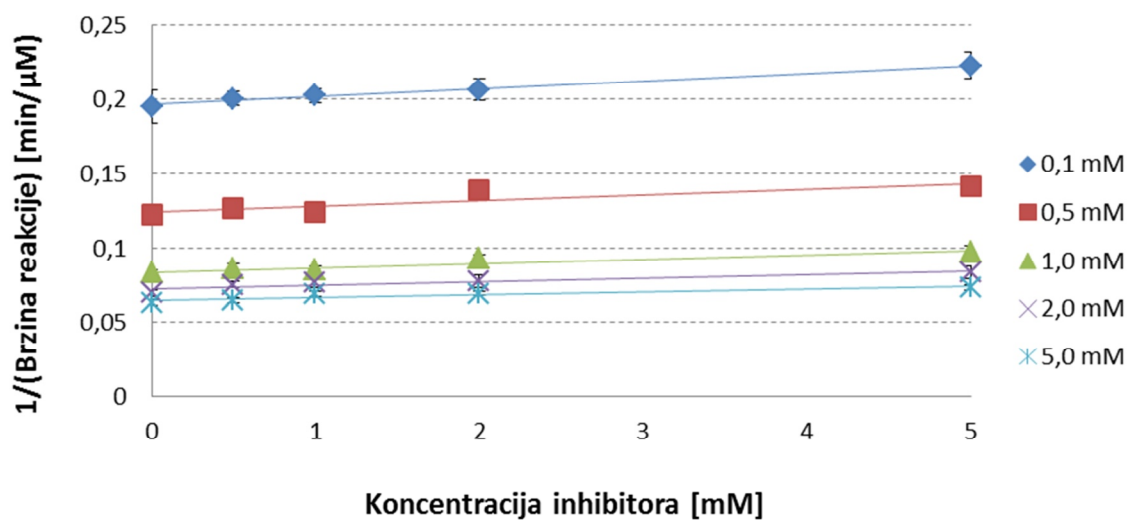
Na slikama 30 – 33 prikazani su rezultati ispitivanja inhibicijskog učinka spojeva fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) na aktivnost enzima heksokinaze, uz korištenje glukoze kao supstrata, pri pH 8,0 i sobnoj temperaturi, primjenom četiri različite koncentracije inhibitora: 0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 mM. U tablicama 6 i 8 dane su vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante (K_m), maksimalne brzine reakcije (V_{max}) i konstante inhibicije (K_i), procijenjene metodom linearne regresije iz mjerenih podataka.



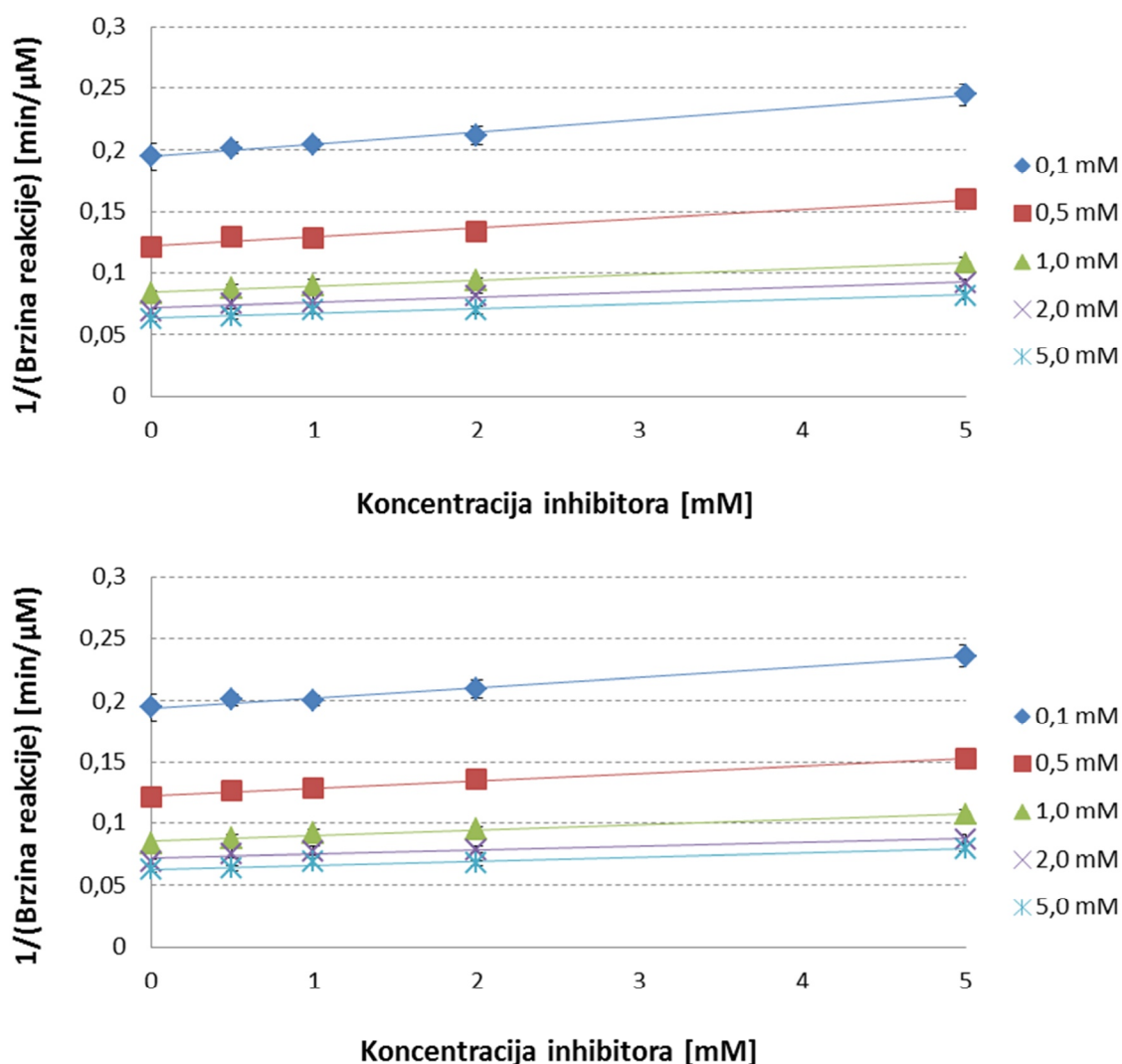
Slika 30. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim heksokinazu, pri različitim koncentracijama fenilboronične kiseline (gore) i 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (dolje).



Slika 31. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim heksokinazu, pri različitim koncentracijama trimetil boroksina (gore), trimetoksi boroksina (sredina) i dikalijevog-trioksohidroksitetrafluortriborata (dolje).



Slika 32. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji fenilboronične kiselina (gore), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (sredina) i trimetil boroksina (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim heksokinazu.



Slika 33. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji trimetoksi boroksina (gore) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim heksokinazu.

Svih pet ispitivanih spojeva pokazuje razmjerno slabo nekompetitivno inhibicijsko djelovanje. Najjaču sposobnost inhibicije od $25,7 (\pm 4,9, p = 0,006) \%$, na najvišoj koncentraciji, pokazao je spoj trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$). Tek neznatno slabiju sposobnost inhibicije, pri istoj koncentraciji, imali su trimetil boroksin ($C_3H_9B_3O_3$) i dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), koji su prema jačini djelovanja bili gotovo ujednačeni, s ostvarenim inhibicijskim učincima od $23,9 (\pm 5,2, p = 0,01) \%$ i $23,4 (\pm 7,0, p = 0,01) \%$, dok je nešto izraženije smanjenje uočeno kod 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) i fenilboronične ($C_6H_7BO_2$), koje su ostvarile inhibicijske učinke od

20,4 ($\pm 4,0$, $p = 0,015$) %, odnosno 16,4 ($\pm 4,3$, $p = 0,029$) %. Vidljivo je da je veća aktivnost ponovno zabilježena kod spojeva s boroksinskim prstenom u odnosu na ispitivane spojeve s benzenskim prstenom, premda u ovom slučaju, razlike među njima nisu izrazito naglašene.

Tablica 8. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za enzim heksokinazu

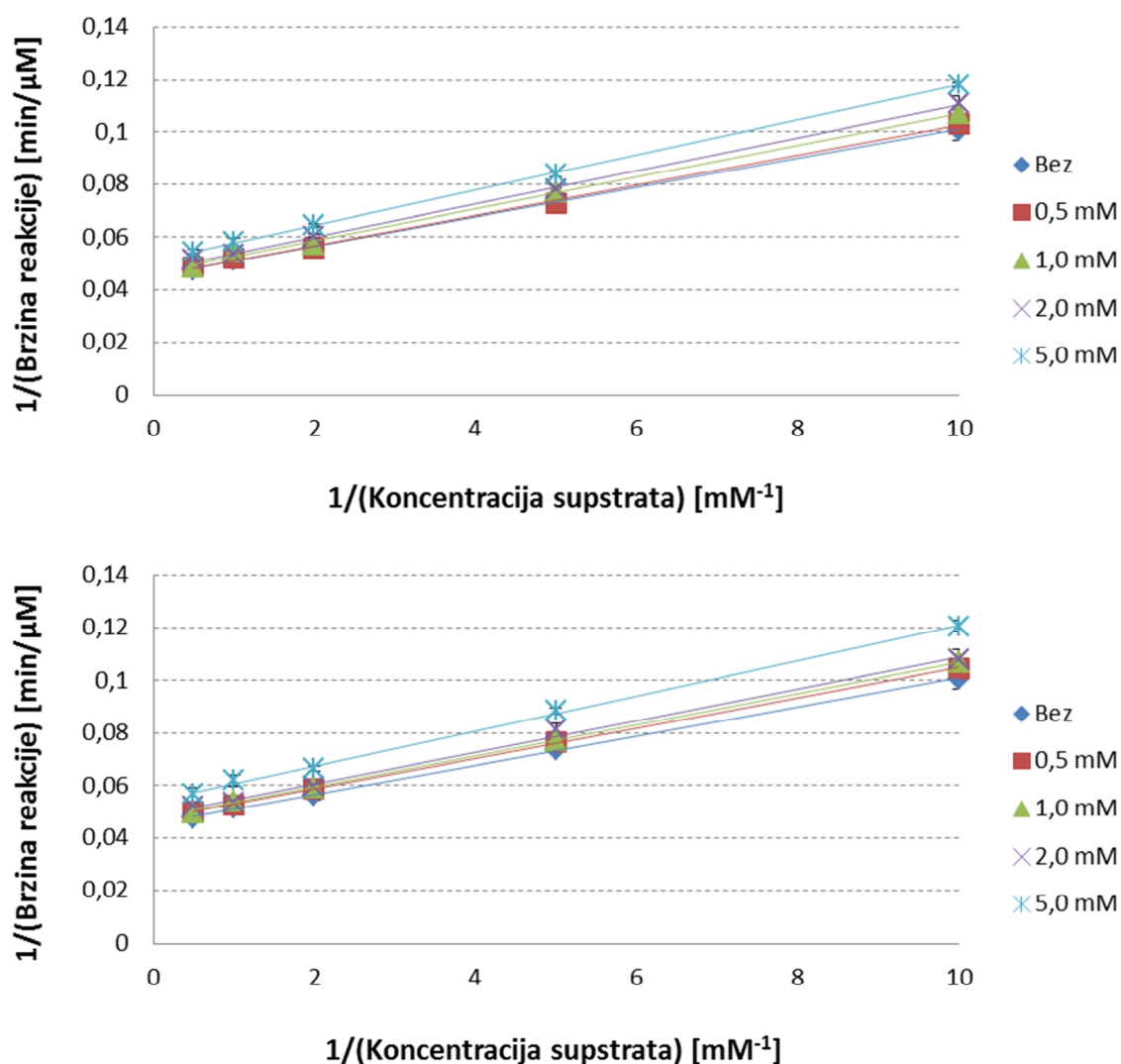
Spoj	Koncentracija [mM]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{M}/\text{min}$]
fenilboronična kiselina	Bez	$0,254 \pm 0,045$	$18,248 \pm 1,556$
	0,5	$0,243 \pm 0,016$	$17,250 \pm 0,614$
	1,0	$0,236 \pm 0,005$	$16,845 \pm 0,115$
	2,0	$0,227 \pm 0,020$	$15,774 \pm 0,697$
	5,0	$0,237 \pm 0,017$	$15,206 \pm 0,302$
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	Bez	$0,254 \pm 0,045$	$18,248 \pm 1,556$
	0,5	$0,221 \pm 0,016$	$16,620 \pm 0,345$
	1,0	$0,227 \pm 0,032$	$16,366 \pm 0,808$
	2,0	$0,228 \pm 0,007$	$15,521 \pm 0,605$
	5,0	$0,227 \pm 0,021$	$14,469 \pm 0,384$
trimetil boroksin	Bez	$0,254 \pm 0,045$	$18,248 \pm 1,556$
	0,5	$0,217 \pm 0,012$	$16,356 \pm 0,476$
	1,0	$0,232 \pm 0,015$	$16,685 \pm 0,525$
	2,0	$0,228 \pm 0,023$	$15,563 \pm 0,708$
	5,0	$0,222 \pm 0,020$	$13,782 \pm 0,583$
trimetoksi boroksin	Bez	$0,254 \pm 0,045$	$18,248 \pm 1,556$
	0,5	$0,241 \pm 0,010$	$16,916 \pm 0,190$
	1,0	$0,231 \pm 0,019$	$16,292 \pm 0,831$
	2,0	$0,230 \pm 0,023$	$15,623 \pm 0,658$
	5,0	$0,230 \pm 0,004$	$13,504 \pm 0,106$
dikalijevtrioksohidroksi- tetrafluoriborat	Bez	$0,254 \pm 0,045$	$18,248 \pm 1,556$
	0,5	$0,225 \pm 0,020$	$16,600 \pm 0,702$
	1,0	$0,220 \pm 0,010$	$16,233 \pm 0,367$
	2,0	$0,215 \pm 0,013$	$15,502 \pm 0,261$
	5,0	$0,222 \pm 0,014$	$13,889 \pm 0,465$

S obzirom na već ranije spomenuta istraživanja inhibicije aktivnosti karbon anhidraza, za što je objašnjenje pronađeno u interakciji sa cinkovim ionima u aktivnom mjestu enzima, očekivalo se da bi do slične interakcije moglo doći i u slučaju enzima heksokinaze, kod kojeg su kao kofaktori prisutni magnezijevi ioni. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je u prisutnosti

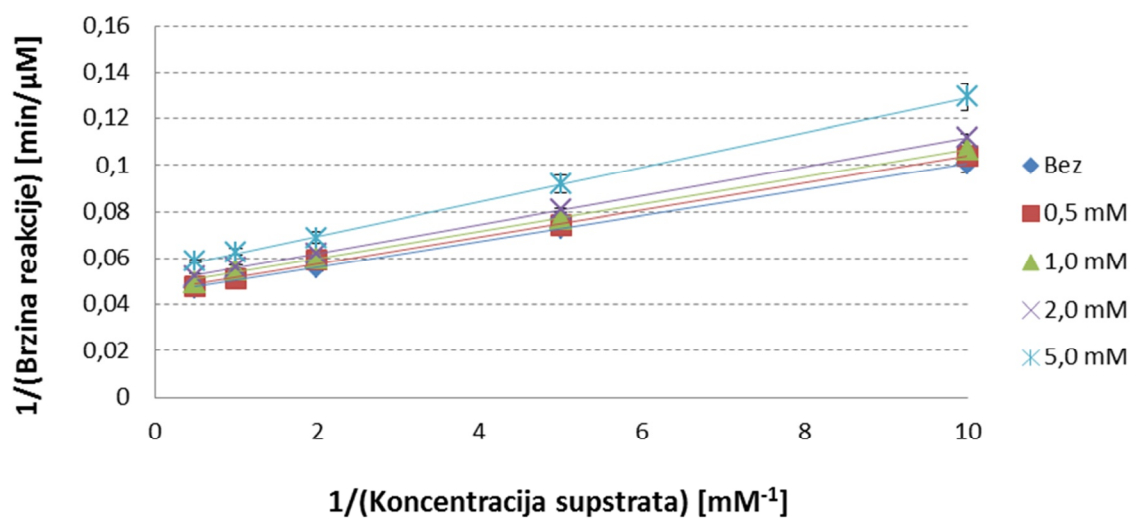
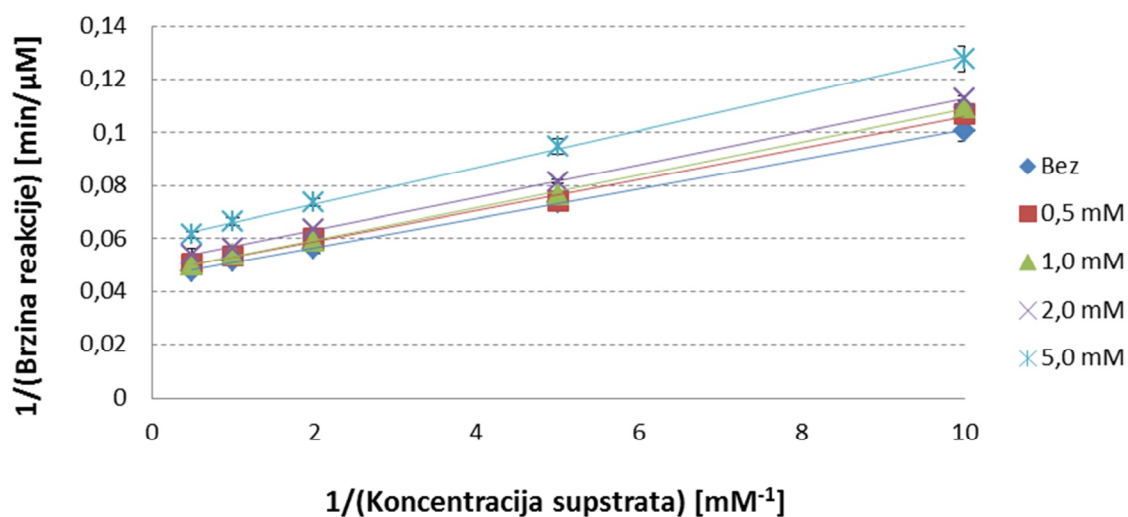
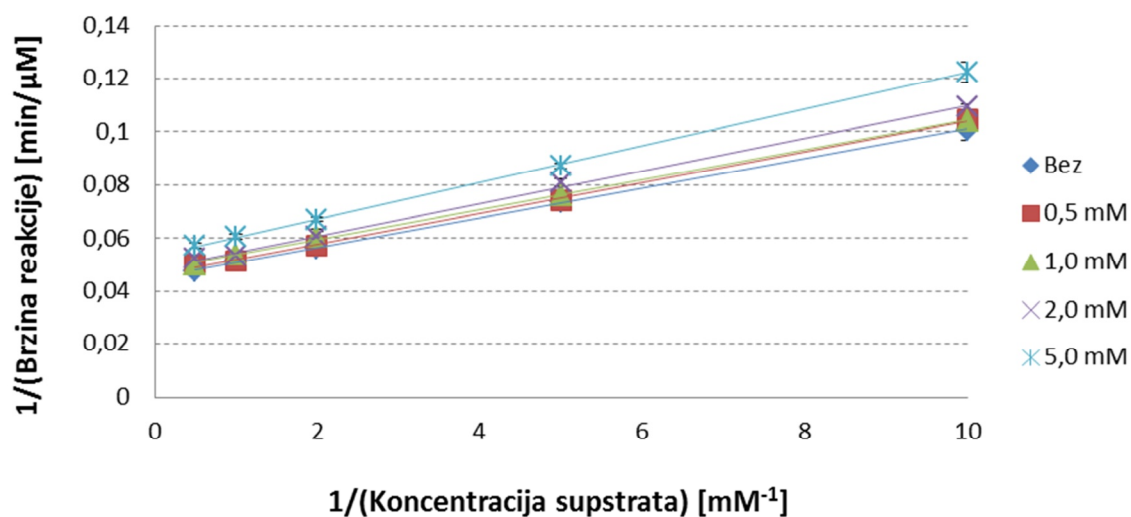
ispitivanih spojeva blago reducirana aktivnost enzima heksokinaze, te se može pretpostaviti da ometanje magnezijevih iona s ispitivanim spojevima nije bilo značajnije izraženo.

4.2.4. Ispitivanje inhibicije enzima laktat-dehidrogenaze

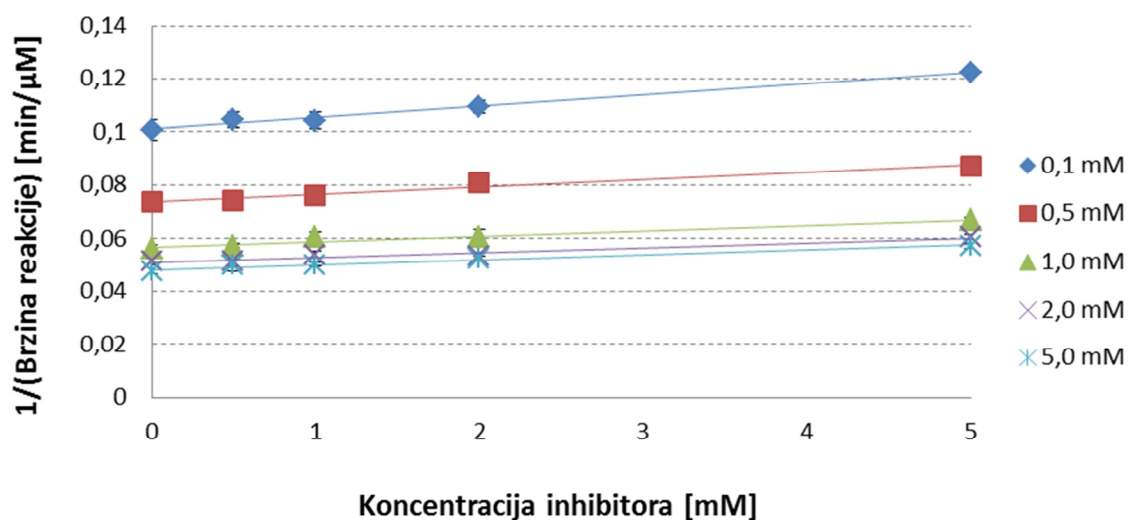
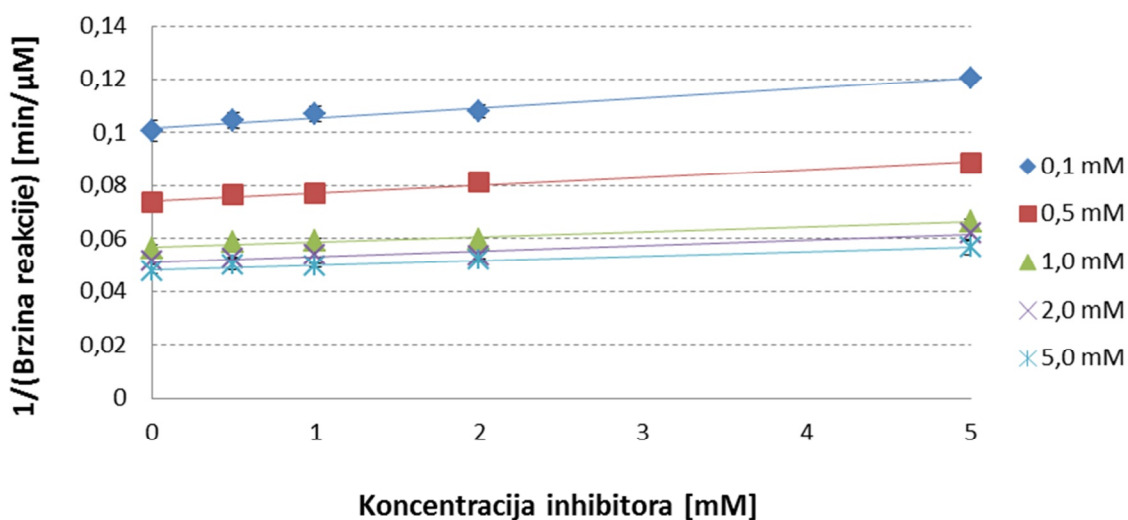
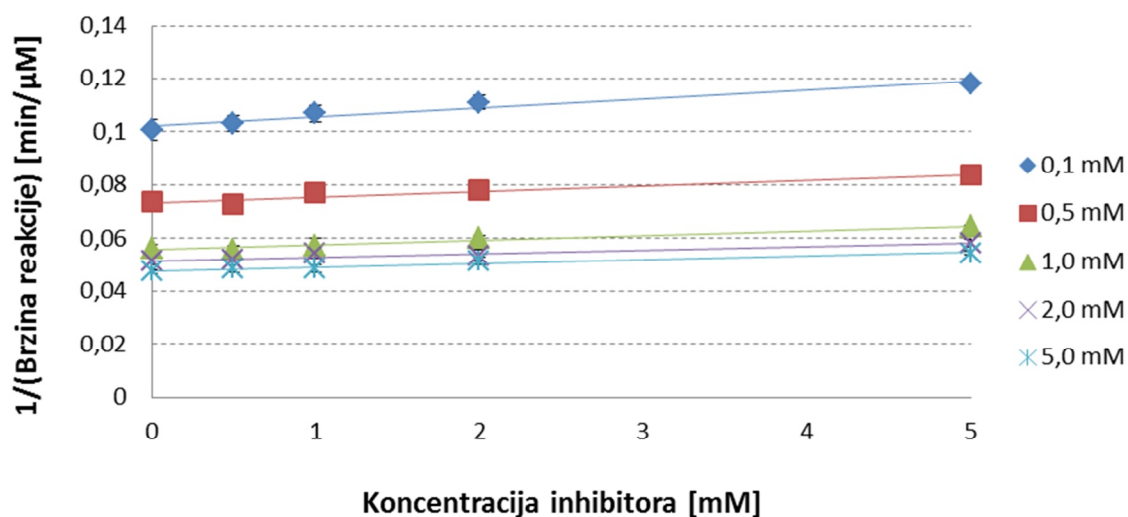
Inhibicijski učinak odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata na aktivnost enzima laktat-dehidrogenaze ispitan je uz korištenje piruvata kao supstrata, pri pH 7,3 i temperaturi od 37°C, primjenom četiri različite koncentracije inhibitora: 0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 mM. Rezultati ispitivanja i procijenjene vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante (K_m), maksimalne brzine reakcije (V_{max}) i konstante inhibicije (K_i), dani su na slikama 34 – 37 te u tablicama 6 i 9.



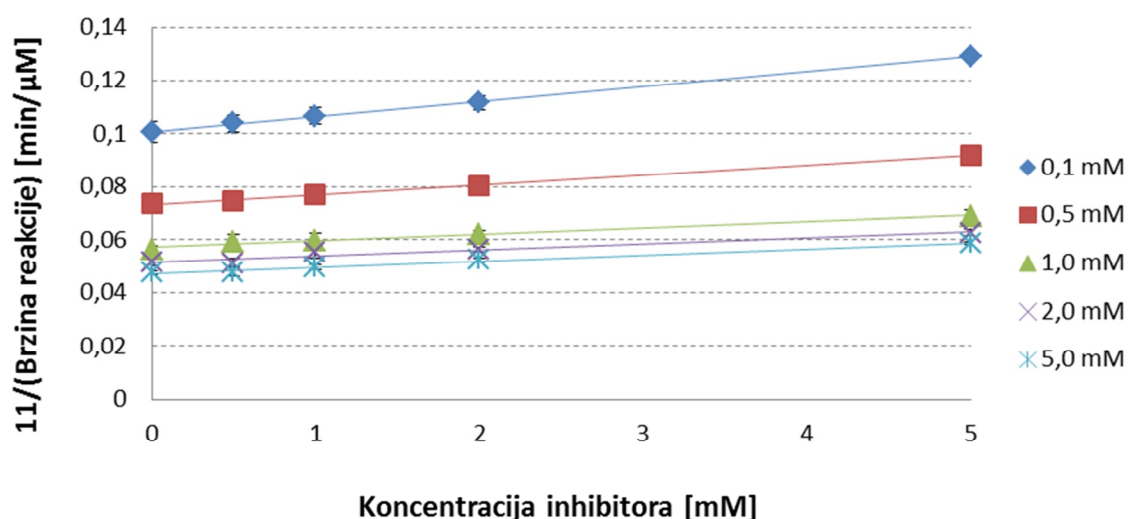
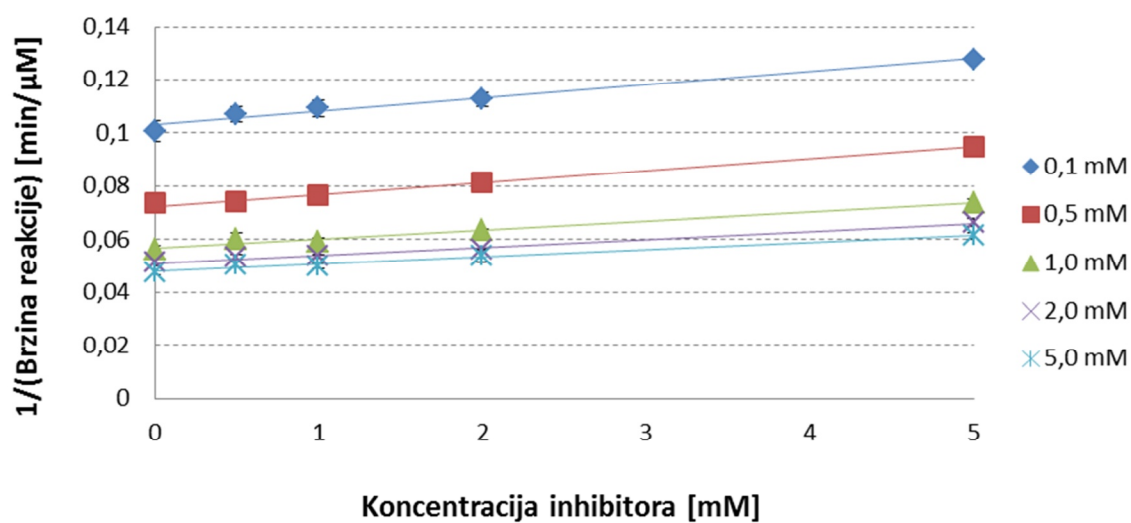
Slika 34. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim laktat-dehidrogenazu, pri različitim koncentracijama fenilboronične kiseline (gore) i 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (dolje).



Slika 35. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim laktat-dehidrogenazu, pri različitim koncentracijama trimetil boroksina (gore), trimetoksi boroksina (sredina) i dikalijevo-g-trioksohidroksitetrafluortriborata (dolje).



Slika 36. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji fenilboronične kiseline (gore), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (sredina) i trimetil boroksina (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim laktat-dehidrogenazu.



Slika 37. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji trimetoksi boroksina (gore) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim laktat-dehidrogenazu.

Najjači inhibicijski učinak, pri najvišoj testiranoj koncentraciji, opažen je kod spoja trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$, $p < 0,001$). Nekoliko postotaka slabije inhibicijsko djelovanje utvrđeno je kod spojeva dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$, $p < 0,001$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$, $p < 0,001$) i trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$, $p < 0,001$), dok je utjecaj fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$) na smanjenje aktivnosti enzima laktat-dehidrogenaze bio minimalan, ali ipak statistički značajan ($p < 0,001$). Sveukupno gledano, izuzimajući fenilboroničnu kiselinu ($C_6H_7BO_2$) čiji se utjecaj gotovo pa može u potpunosti zanemariti, u ostvarenim postotcima inhibicije uočava se pojava

smanjene djelotvornosti u odnosu na ostale ispitivane enzime, pri čemu je jedino spoj trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) u koncentraciji od 5 mM pokazao sposobnost inhibicije veću od 20 %.

Tablica 9. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za enzim laktat-dehidrogenazu

Spoj	Koncentracija [mM]	K_m [mM]	V_{max} [μ M/min]
fenilboronična kiselina	Bez	$0,124 \pm 0,007$	$22,144 \pm 0,138$
	0,5	$0,127 \pm 0,001$	$22,126 \pm 0,570$
	1,0	$0,130 \pm 0,012$	$21,517 \pm 0,732$
	2,0	$0,132 \pm 0,006$	$21,029 \pm 0,134$
	5,0	$0,131 \pm 0,005$	$19,569 \pm 0,280$
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	Bez	$0,124 \pm 0,007$	$22,144 \pm 0,138$
	0,5	$0,122 \pm 0,006$	$21,208 \pm 0,453$
	1,0	$0,126 \pm 0,002$	$21,140 \pm 0,425$
	2,0	$0,125 \pm 0,006$	$20,630 \pm 0,148$
	5,0	$0,124 \pm 0,006$	$18,510 \pm 0,220$
trimetil boroksin	Bez	$0,124 \pm 0,007$	$22,144 \pm 0,138$
	0,5	$0,126 \pm 0,003$	$21,717 \pm 0,154$
	1,0	$0,116 \pm 0,012$	$20,702 \pm 0,583$
	2,0	$0,127 \pm 0,009$	$20,598 \pm 0,725$
	5,0	$0,129 \pm 0,008$	$18,694 \pm 0,232$
trimetoksi boroksin	Bez	$0,124 \pm 0,007$	$22,144 \pm 0,138$
	0,5	$0,124 \pm 0,003$	$21,149 \pm 0,312$
	1,0	$0,132 \pm 0,006$	$21,346 \pm 0,425$
	2,0	$0,122 \pm 0,006$	$19,715 \pm 0,359$
	5,0	$0,117 \pm 0,009$	$16,891 \pm 0,378$
dikalijevtrioksohidroksi- tetrafluortriborat	Bez	$0,124 \pm 0,007$	$22,144 \pm 0,138$
	0,5	$0,127 \pm 0,004$	$21,846 \pm 0,392$
	1,0	$0,122 \pm 0,003$	$20,855 \pm 0,388$
	2,0	$0,125 \pm 0,006$	$20,145 \pm 0,291$
	5,0	$0,136 \pm 0,015$	$18,245 \pm 0,367$

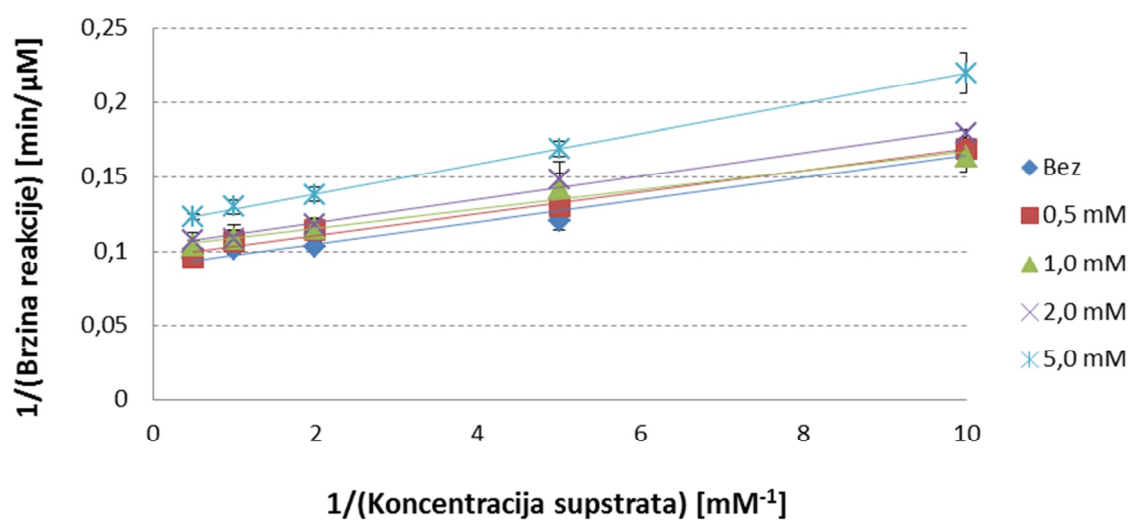
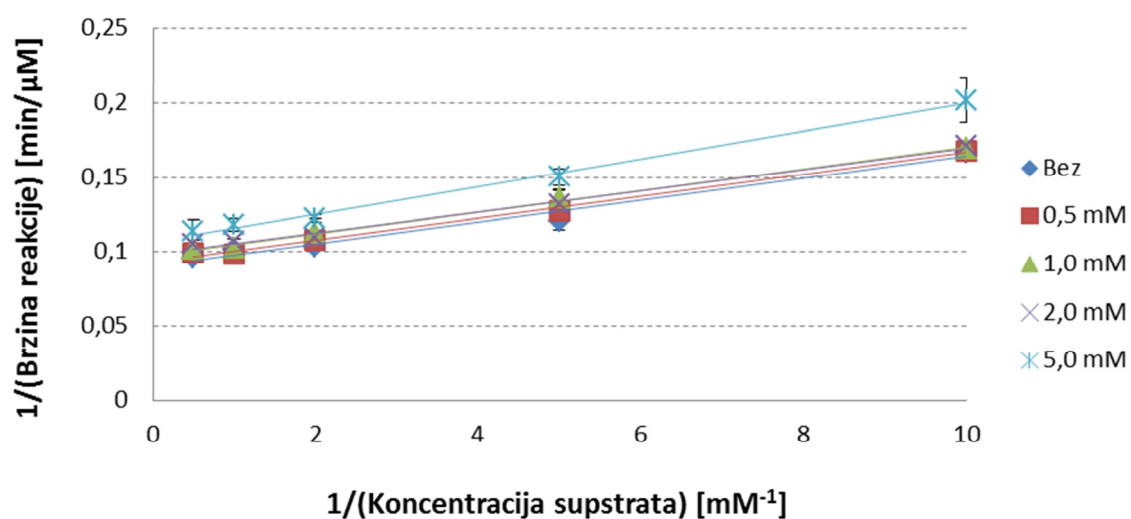
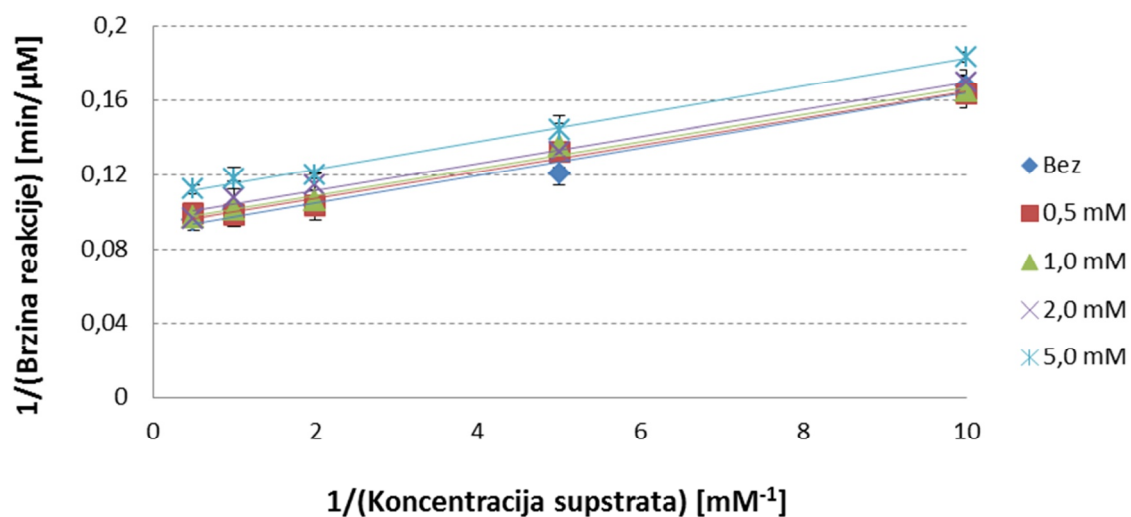
Budući da je poznato da laktat-dehidrogenaza u ljudskom tijelu katalizira pretvorbu hidroksikiselina u ketokiseline, očekivalo se da bi u slučaju ovog enzima derivati boroničnih kiselina s benzenovim prstenom, koji se i sami svrstavaju u skupinu hidrokiseline, mogli po inhibicijskom učinku nadmašiti spojeve s boroksinskim prstenom. Ipak, suprotni rezultat ne iznenađuje u tolikoj mjeri, s obzirom da je reakcija katalizirana laktat-dehidrogenazom ovisna o NADH i transferu elektrona, a već spominjani boroksinski prsten, koji je vrlo sličan

aromatskom prstenu po postojanju delokaliziranih elektrona, ipak pokazuje veću aktivnost pri izmjeni elektrona. Ne čudi ni činjenica da pritom 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$) pokazuje neznatno bolju sposobnost inhibicije od trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$), koji iako u strukturi ima boroksinski prsten, na njemu ima vezane slabo aktivne CH_3 skupine, dok u strukturi 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) postoje tri izrazito elektrofilna fluorova atoma.

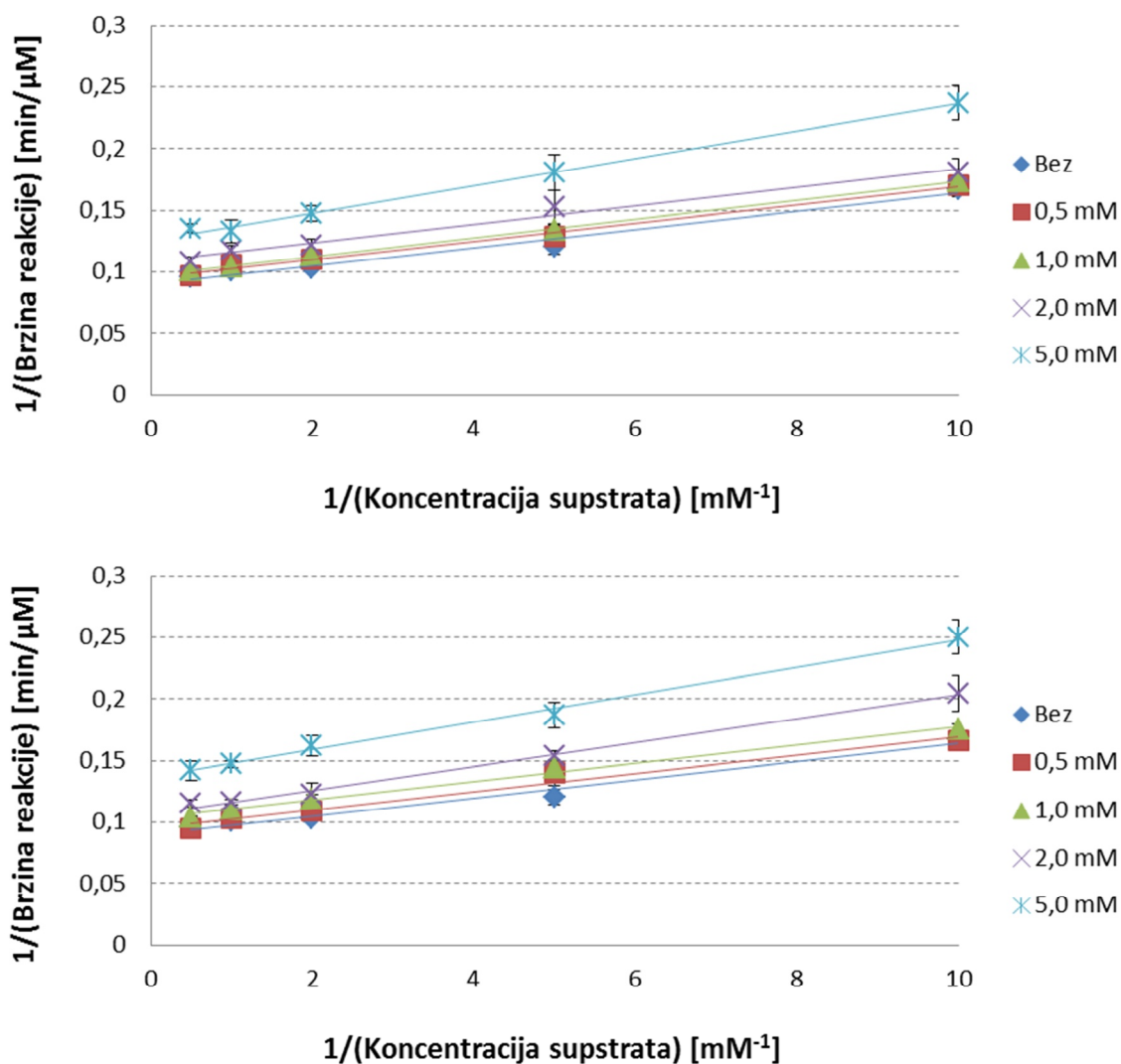
4.2.5. Ispitivanje inhibicije enzima piruvat-kinaze

Određivanje inhibicijskog učinka spojeva fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) na aktivnost enzima piruvat-kinaze provedeno je uz korištenje PEP-a kao supstrata, pri pH 7,6 i sobnoj temperaturi, primjenom četiri različite koncentracije inhibitora: 0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 mM. Na slikama 38 – 41 različitim markerima označeni su rezultati provedenih ispitivanja, dok su u tablicama 6 i 10 dani iznosi procijenjenih vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante (K_m), maksimalne brzine reakcije (V_{max}) i konstante inhibicije (K_i).

Prema ostvarenim inhibicijskim učincima, još jednom je utvrđeno da spojevi s boroksinskim prstenom imaju jaču sposobnost inhibicije u usporedbi s boroničnim kiselinama s benzenovim prstenom. Svi ispitivani spojevi ponašaju se kao nekompetitivni inhibitori. Za razliku od rezultata ispitivanja inhibicije enzima tirozinaze, heksokinaze i laktat dehidrogenaze, gdje se najboljim inhibitorom pokazao spoj trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$), u ovom je slučaju pri najvišoj testiranoj koncentraciji naizraženiji inhibicijski učinak, u iznosu od $33,9 (\pm 1,0, p < 0,001)$ %, zabilježen kod spoja dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). Preostala dva spoja s boroksinskim prstenom, trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$) i trimetil boroksin ($C_3H_9B_3O_3$), pri istoj koncentraciji također su pokazala značajnije inhibicijske učinke u iznosu od $28,3 (\pm 0,3, p < 0,001)$ % i $23,7 (\pm 0,3, p < 0,001)$ %. S druge strane, fenilboronična ($C_6H_7BO_2$) i 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$), pri koncentraciji od 5 mM, pokazale su vrlo blago inhibicijsko djelovanje, u iznosu od $16,2 (\pm 2,4, p < 0,001)$ %, odnosno $15,4 (\pm 2,4, p < 0,001)$ %.



Slika 38. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim piruvat-kinazu, pri različitim koncentracijama fenilboronične kiseline (gore), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (sredina) i trimetil boroksina (dolje).



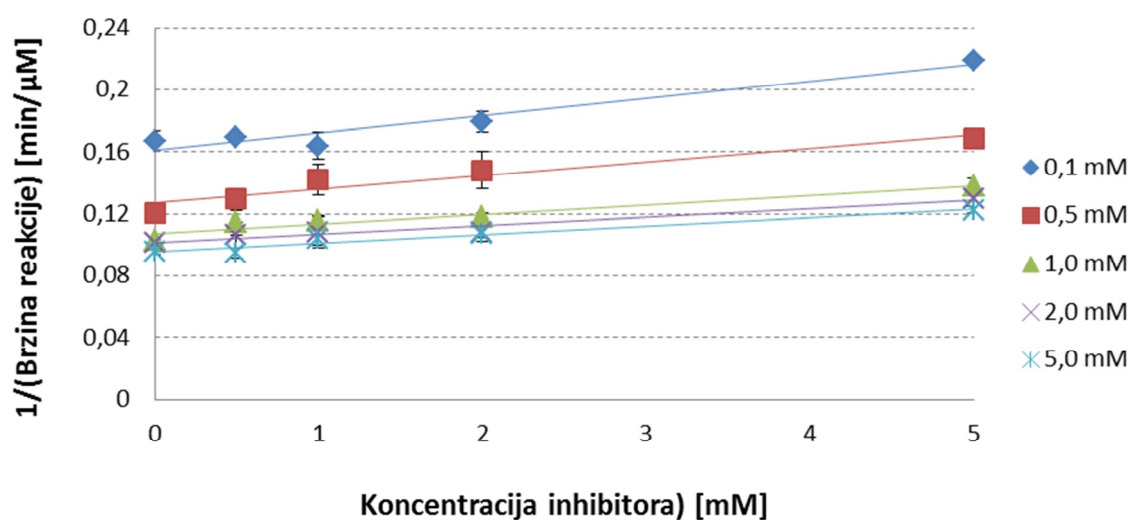
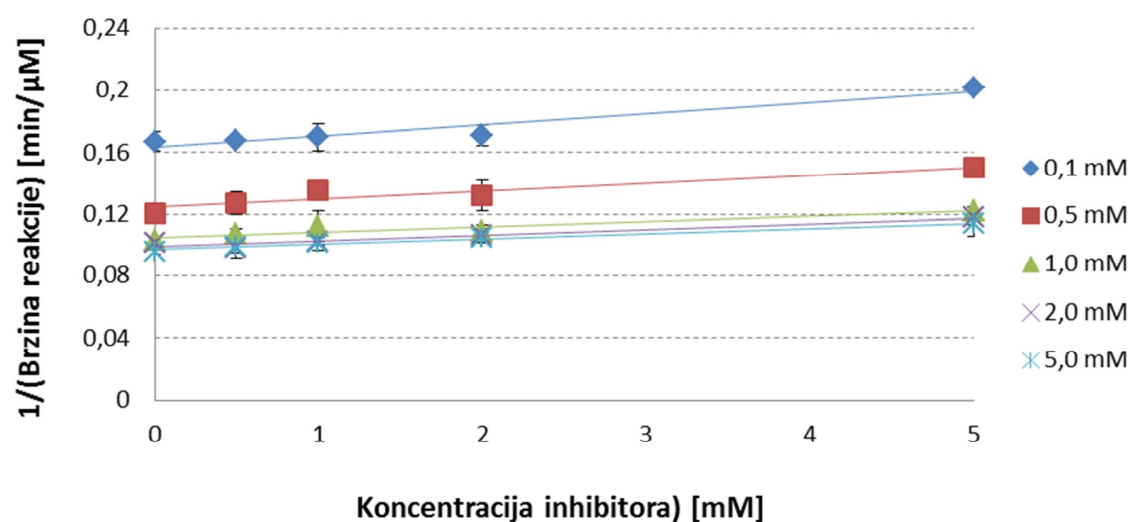
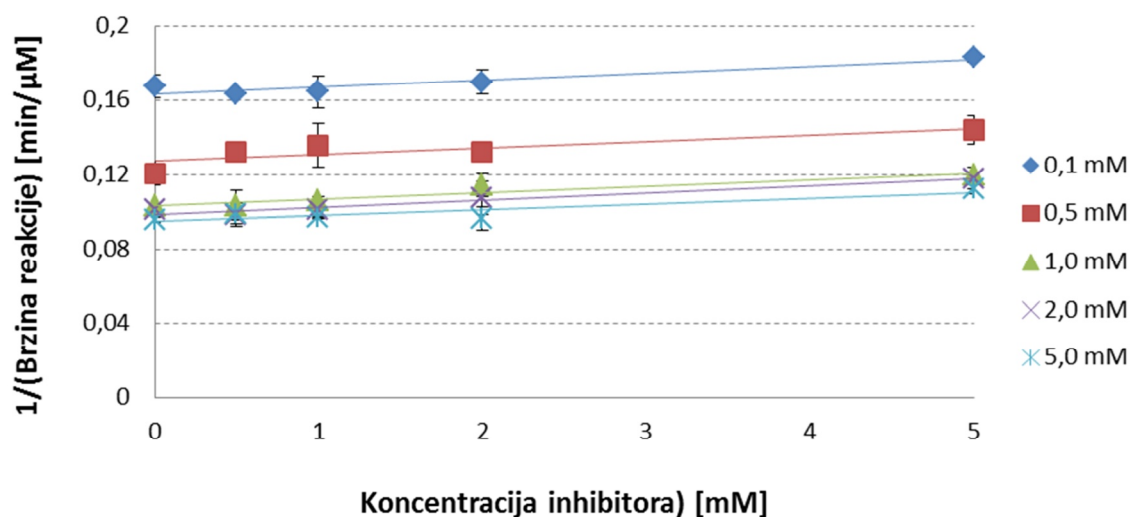
Slika 39. Lineweaver-Burkovi dijagrami za enzim piruvat-kinazu, pri različitim koncentracijama trimetoksi boroksina (gore) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata (dolje).

Dva su razloga kojima je moguće objasniti pojačanu sposobnost inhibicije dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$) u odnosu na ostale ispitivane spojeve. Kao prvo, budući da enzim piruvat-kinaze ima tetramerski oblik, koji omogućava vezivanje K^+ i Mg^{2+} iona na sve jedinice, prisutnost kalijevih iona u molekuli dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$) može utjecati na aktivnost ovog enzima. Pored toga, poznato je da djelovanje enzima piruvat-kinaze, baš kao i enzima butirilkolinesteraze, sterički ometa prisustvo negativno nabijenih supstrata, odnosno negativnih iona, te je moguće

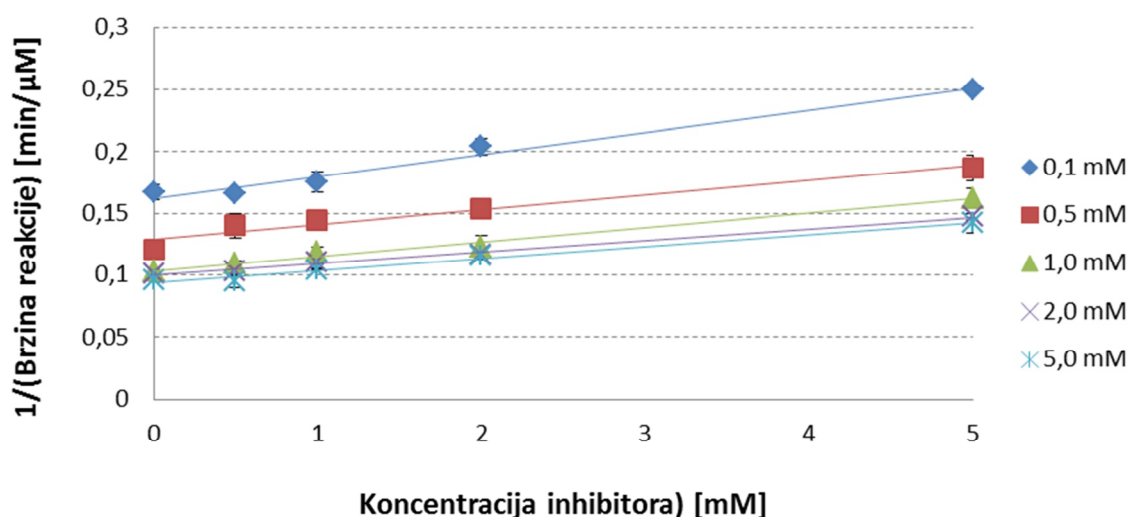
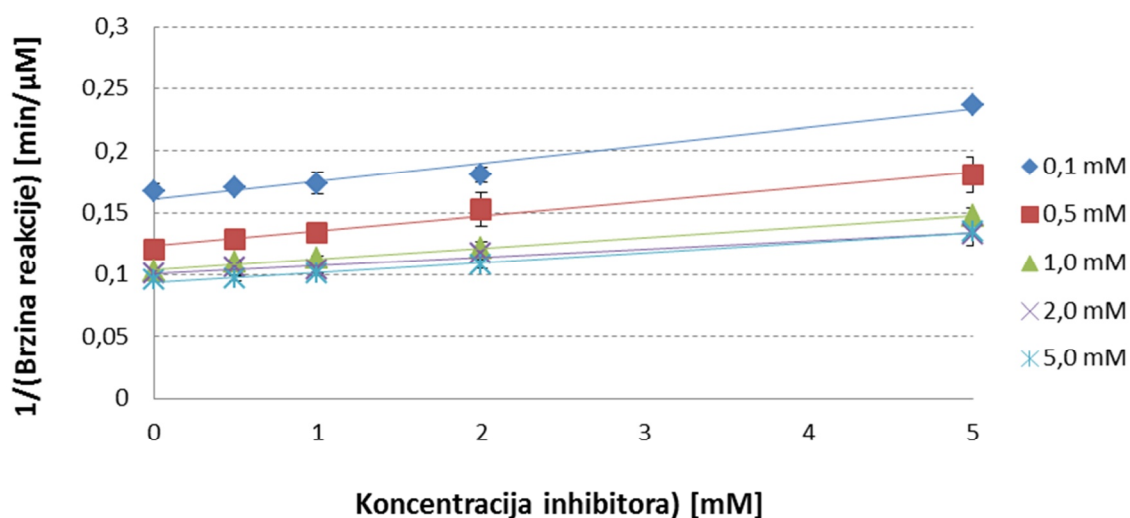
pretpostaviti da boratni anion, prisutan u strukturi dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortri-borata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), vrši takav utjecaj.

Tablica 10. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za enzim piruvat-kinazu

Spoj	Koncentracija [mM]	K_m [mM]	V_{max} [μ M/min]
fenilboronična kiselina	Bez	$0,082 \pm 0,006$	$11,093 \pm 0,175$
	0,5	$0,077 \pm 0,004$	$10,782 \pm 0,268$
	1,0	$0,078 \pm 0,006$	$10,649 \pm 0,132$
	2,0	$0,075 \pm 0,012$	$10,309 \pm 0,398$
	5,0	$0,070 \pm 0,008$	$9,296 \pm 0,220$
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	Bez	$0,082 \pm 0,006$	$11,093 \pm 0,175$
	0,5	$0,081 \pm 0,006$	$10,822 \pm 0,381$
	1,0	$0,076 \pm 0,007$	$10,331 \pm 0,600$
	2,0	$0,073 \pm 0,004$	$10,189 \pm 0,102$
	5,0	$0,087 \pm 0,009$	$9,381 \pm 0,209$
trimetil boroksin	Bez	$0,082 \pm 0,006$	$11,093 \pm 0,175$
	0,5	$0,075 \pm 0,003$	$10,399 \pm 0,276$
	1,0	$0,064 \pm 0,020$	$9,769 \pm 0,794$
	2,0	$0,076 \pm 0,002$	$9,689 \pm 0,264$
	5,0	$0,086 \pm 0,014$	$8,463 \pm 0,146$
trimetoksi boroksin	Bez	$0,082 \pm 0,006$	$11,093 \pm 0,175$
	0,5	$0,078 \pm 0,004$	$10,534 \pm 0,287$
	1,0	$0,079 \pm 0,002$	$10,315 \pm 0,164$
	2,0	$0,070 \pm 0,009$	$9,224 \pm 0,266$
	5,0	$0,088 \pm 0,015$	$7,957 \pm 0,086$
dikalijevtrioksohidroksi- tetrafluortriborat	Bez	$0,082 \pm 0,006$	$11,093 \pm 0,175$
	0,5	$0,079 \pm 0,006$	$10,530 \pm 0,153$
	1,0	$0,072 \pm 0,006$	$9,710 \pm 0,253$
	2,0	$0,090 \pm 0,020$	$9,367 \pm 0,390$
	5,0	$0,082 \pm 0,013$	$7,337 \pm 0,258$



Slika 40. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji fenilboronične kiseline (gore), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (sredina) i trimetil boroksina (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim piruvat-kinazu.



Slika 41. Ovisnost recipročne vrijednosti brzine reakcije o koncentraciji trimetoksi boroksina (gore) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluoroborata (dolje), pri različitim koncentracijama supstrata, za enzim piruvat-kinazu.

Nakon svih provedenih istraživanja enzimske aktivnosti, prema jakosti utvrđenog inhibicijskog djelovanja ispitivanih spojeva, slijedi niz: butilkolinesteraza > piruvat-kinaza > tirozinaza > heksokinaza > laktat-dehidrogenaza. Kod svih enzima primjetno je da su najveći postotci inhibicije ostvareni pri najvišim testiranim koncentracijama inhibitora. Također, razvidno je da svi ispitivani spojevi pokazuju nekompeticijsko inhibicijsko djelovanje, koje je kod nekih jače, a kod nekih slabije izraženo. S obzirom da ni jedan od njih nema strukturnih sličnosti sa enzimskim supstratima korištenim u ispitivanjima, takvo ponašanje potvrđuje očekivanja. Budući da *in vitro* modeli imaju stanovita ograničenja, za dobivanje cjelovite slike potrebno je provesti daljnja ispitivanja toksičnosti, lipofilnosti, odnosno permeabilnosti

kroz stanične membrane, koje dovode do veće tkivne zastupljenosti, te biorazgradnje sa što manje međuprodukata.

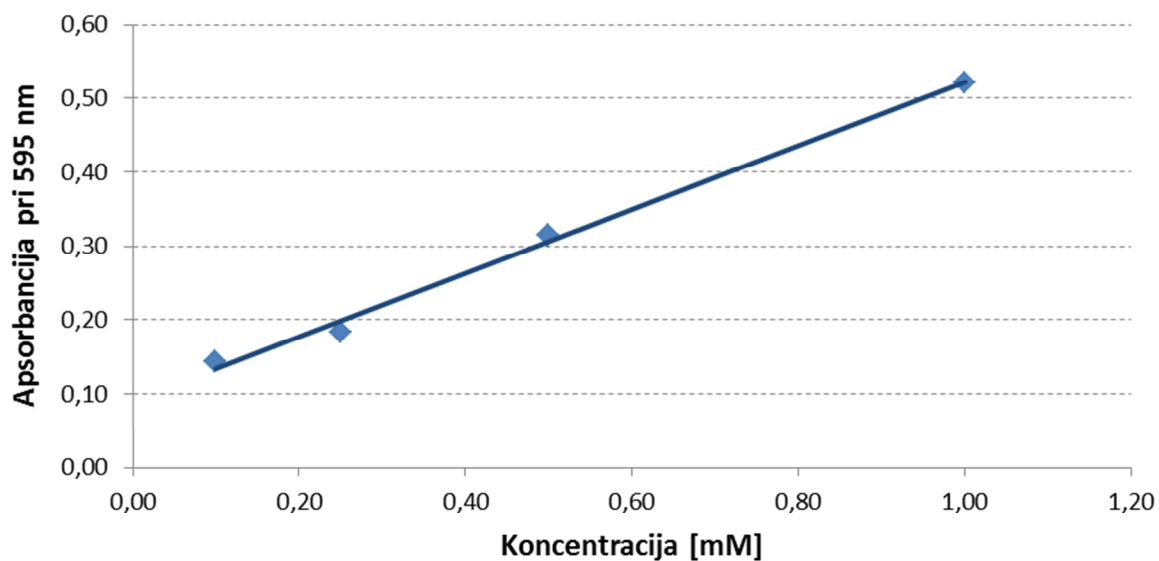
4.3. Ispitivanje antioksidacijskog potencijala

4.3.1. FRAP metoda

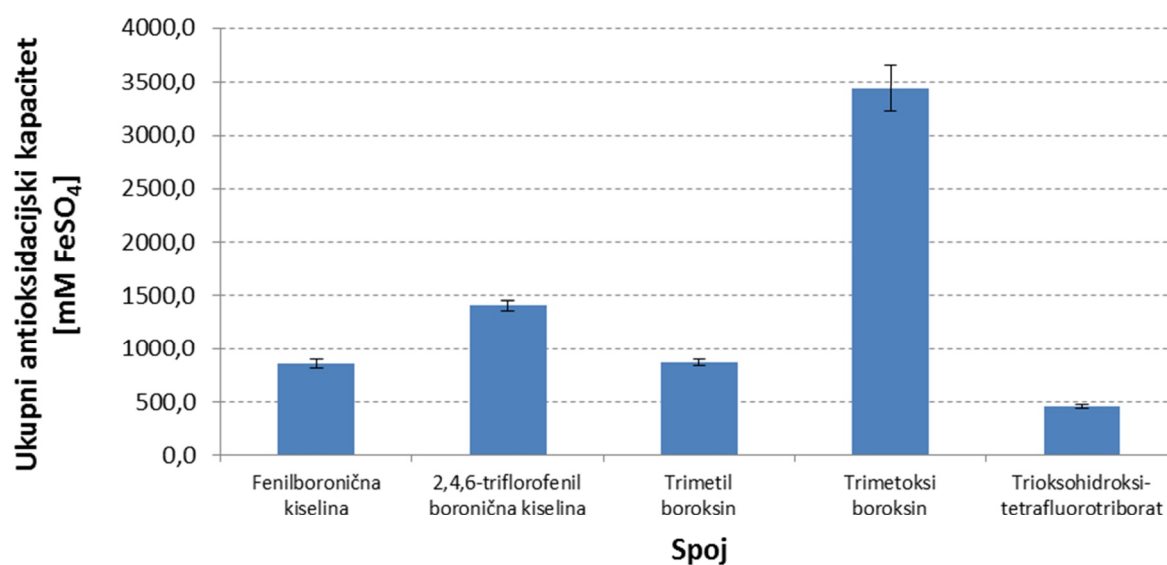
Ukupni antioksidacijski kapacitet odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata određen je primjenom tzv. FRAP metode, temeljene na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} oblik pri kiselom pH i nastanku plavo obojenog produkta s maksimumom apsorpcije na 595 nm. Sposobnost redukcije ovisi o koncentraciji antioksidansa u otopini i proporcionalna je intenzitetu obojenja. Pri višim koncentracijama antioksidansa, reducira se veći broj iona željeza(III) i ispitivana otopina pokazuje izrazitiju plavu boju. Smanjenjem koncentracije antioksidansa, intezitet plave boje postaje slabiji, dok je u nedostatku antioksidansa ispitivana otopina žute boje, budući da ne dolazi do formiranja kompleksa željezovog(II)-tripiridiltriazina. Tijekom ispitivanja, u rasponu koncentracija od 0,1 do 1 mM postignuta je dobra linearnost ($R^2 = 0,9955$) standardne krivulje željezovog(II)-sulfat-heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Regresijska jednadžba koja opisuje promjenu apsorbancije standardne otopine željezovog(II)-sulfat-heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) u ovisnosti o koncentraciji glasi:

$$y = 0,4321x + 0,0909 \quad (23)$$

Standardna krivulja spoja željezovog(II)-sulfat-heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) prikazana je na slici 42, a rezultati određivanja sposobnosti redukcije ispitivanih spojeva dani su u tablici 11. Na slici 43 prikazane se odgovarajuće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, izračunate iz izmjerenih apsorbancija i izražene pomoću jednadžbe (23) kao ekvivalenti željezovog(II)-sulfata (FeSO_4).



Slika 42. Standardna krivulja za određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta



Slika 43. Ukupni antioksidacijski kapacitet ispitivanih spojeva, izražen kao mM ekvivalenta željezovog(II)-sulfata

Tablica 11. Sposobnost redukcije Fe^{3+} iona (apsorbancija) ispitivanih spojeva pri različitim koncentracijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju triju neovisnih ispitivanja. Sve vrijednosti množe se s faktorom 10^{-2} .

Spoj	Koncentracija [mM]				
	0,10	0,50	1,00	5,00	10,00
fenilboronična kiselina	$8,25 \pm 0,39$	$8,30 \pm 0,05$	$8,34 \pm 0,60$	$8,70 \pm 0,50$	$9,16 \pm 0,67$
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	$8,25 \pm 0,05$	$8,27 \pm 0,82$	$8,30 \pm 0,14$	$8,49 \pm 0,46$	$8,73 \pm 0,82$
trimetil boroksin	$8,25 \pm 0,52$	$8,27 \pm 0,57$	$8,30 \pm 0,37$	$8,49 \pm 0,13$	$8,73 \pm 0,13$
trimetoksi boroksin	$8,24 \pm 0,74$	$8,25 \pm 0,55$	$8,25 \pm 0,36$	$8,30 \pm 0,55$	$8,37 \pm 0,36$
dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat	$8,24 \pm 0,21$	$8,25 \pm 0,52$	$8,27 \pm 0,42$	$8,39 \pm 0,22$	$8,55 \pm 0,16$

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da su svi ispitivani spojevi ostvarili zanemarive učinke u usporedbi sa korištenim standardom. Dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$) pokazao je najveći ukupni antioksidacijski kapacitet, ostvarivši učinak ekvivalentan djelovanju 1 mM željezovog(II)-sulfata (FeSO_4) pri koncentraciji od 464 mM. Gotovo dvostruko manji antioksidacijski kapacitet u iznosu od 864 mM i 870 mM ekvivalenta željezovog(II)-sulfata (FeSO_4) polučili su spojevi fenilboronična kiselina ($\text{C}_6\text{H}_7\text{BO}_2$) i trimetil boroksin ($\text{C}_3\text{H}_9\text{B}_3\text{O}_3$). Među navedenim spojevima prema jačini djelovanja nije uočena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($\text{C}_6\text{H}_4\text{BF}_3\text{O}_2$) pokazala je znatno ($p < 0,001$) slabiji antioksidacijski kapacitet u odnosu na spoj dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$), ali i spojeve fenilboronične kiseline ($\text{C}_6\text{H}_7\text{BO}_2$) te trimetil boroksina ($\text{C}_3\text{H}_9\text{B}_3\text{O}_3$), dok je najslabiji antioksidacijski kapacitet s izračunatom vrijednosti od 3442 mM ekvivalenta željezovog(II)-sulfata (FeSO_4) zabilježen kod spoja trimetoksi boroksina ($\text{C}_3\text{H}_9\text{B}_3\text{O}_6$). Tablica 12 donosi prikaz rezultata statističke analize utvrđenih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

Tablica 12. Statistička analiza vrijednosti ukupnog antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih spojeva izraženih putem ekvivalenta koncentracije željezovog(II)-sulfata. $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu razliku. FBK – fenilboronična kiselina; 3FFBK – 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina; 3MILB – trimetil boroksin; 3MOXB – trimetoksi boroksin; 3OH4F3B – dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat

Spoj	FBK	3FFBK	3MILB	3MOXB	3OH4F3B
FBK	/	$p < 0,001$	$p = 0,322$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
3FFBK		/	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
3MILB			/	$p < 0,001$	$p < 0,001$
3MOXB				/	$p < 0,001$
3OH4F3B					/

4.3.2. DPPH metoda

Određivanje antiradikalne aktivnosti ispitivanih boroničnih kiselina i njihovih derivata provedeno je primjenom DPPH metode, koja se temelji na redukciji slobodnih DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala antioksidansom koji služi kao donor atoma vodika ili elektrona. DPPH je stabilni slobodni radikal koji je vrlo pogodan za *in vitro* ispitivanja antiradikalne aktivnosti, budući da na njega ne utječu sporedne reakcije poput kelacije metalnih iona i enzimске inhibicije, za razliku od hidroksilnog radikala i superoksid aniona. Zbog postojanja nesparenih elektrona, otopina DPPH jako apsorbira u vidljivom dijelu spektra. Prilikom redukcije radikala antioksidansom dolazi do promjene boje otopine slobodnih radikala, od izrazito ljubičaste do bezbojne, zbog nastanka produkta 2,2-difenil-1-pikrilhidrazina, što se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 520 nm. Veći pad apsorbancije označava veću antiradikalnu aktivnost (Amarowicz i sur., 2004). Nakon mjerenja apsorbancija na spomenutoj valnoj duljini, izračunate su vrijednosti inhibicije radikala, izražene u postocima u odnosu na čistu otopinu DPPH radikala. Rezultati ispitivanja antiradikalne sposobnosti izdvojenih derivata boroničnih kiselina prikazani su u tablici 13 i na slici 44.

Tablica 13. Sposobnost redukcije DPPH radikala (apsorbancija) ispitivanih spojeva pri različitim koncentracijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju triju neovisnih ispitivanja. Sve vrijednosti množe se s faktorom 10^{-1} .

Spoj	Koncentracija [mM]				
	0,10	0,50	1,00	5,00	10,00
fenilboronična kiselina	7,04 $\pm$ 0,21	7,01 $\pm$ 0,24	6,98 $\pm$ 0,17	6,71 $\pm$ 0,29	6,45 $\pm$ 0,20
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	7,00 $\pm$ 0,25	6,94 $\pm$ 0,16	6,87 $\pm$ 0,19	6,38 $\pm$ 0,16	5,81 $\pm$ 0,29
trimetil boroksin	7,03 $\pm$ 0,15	7,03 $\pm$ 0,18	6,97 $\pm$ 0,23	6,69 $\pm$ 0,27	6,43 $\pm$ 0,25
trimetoksi boroksin	7,05 $\pm$ 0,13	7,01 $\pm$ 0,11	6,98 $\pm$ 0,17	6,77 $\pm$ 0,17	6,51 $\pm$ 0,15
dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat	6,98 $\pm$ 0,18	6,83 $\pm$ 0,28	6,72 $\pm$ 0,31	6,06 $\pm$ 0,30	5,36 $\pm$ 0,36

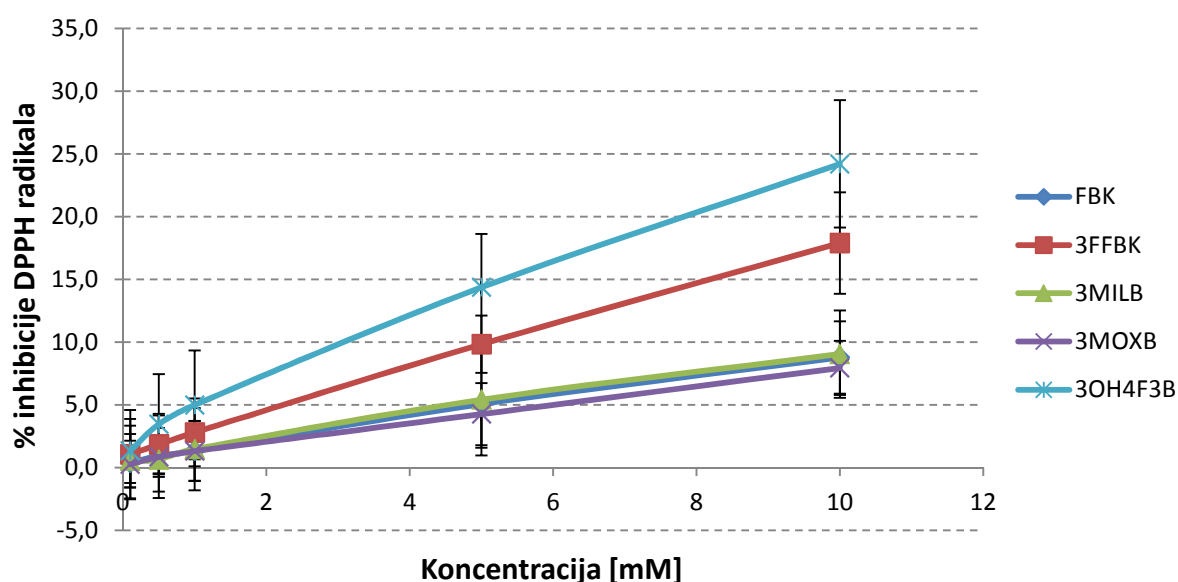
Svi ispitivani spojevi pokazali su vrlo slabu ili gotovo nikakvu antiradikalnu aktivnost, pri čemu niti jedan od njih, niti pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, nije uspio ni približno doseći 50 %-tnu inhibiciju DPPH radikala. U usporedbi s ostalim ispitivanim spojevima, najboljim hvatačem slobodnih radikala pokazao se spoj dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), neutraliziravši $24,20 \pm 5,08$ % radikala pri koncentraciji od 10 mM. Nešto slabije djelovanje utvrđeno je kod spoja 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), dok su najslabiji učinci zabilježeni za spojeve fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$) te trimetil ($C_3H_9B_3O_3$) i trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$), koji su pokazali zanemarivu djelotvornost u testiranim koncentracijama. Slika 45 donosi usporedni prikaz IC_{50} vrijednosti ispitivanih spojeva. Statističkom analizom ovih vrijednosti (tablica 14) dolazimo do zaključka kako ne postoje značajnije ($p > 0,05$) razlike u antiradikalnoj aktivnosti između spojeva fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$) i trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$).

Navedena opažanja nisu u potpunosti u skladu s očekivanjima. Pretpostavlja se kako se u molekulama spojeva trimetil ($C_3H_9B_3O_3$) i trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) atomi bora u prstenu povezuju preko tri valentna elektrona iz vanjske ljuske (tzv. sp^2 hibridizacija). Ovi spojevi ne sadrže $-OH$ skupine, koje mogu neizravno predati elektrone slobodnim radikalima. Ugljik u sastavu $-CH_3$ skupine ima manju elektronegativnost od kisika te stoga postoji mala mogućnost da bi ova skupina mogla najprije otpustiti proton, a zatim elektron. Iz tog se razloga moglo očekivati da će spojevi trimetil ($C_3H_9B_3O_3$) i trimetoksi boroksina

($C_3H_9B_3O_6$) ostvariti zanemarive antiradikalne učinke, iako rezultati nekih novijih istraživanja sugeriraju da i atomi bora, poput atoma ugljika, mogu stvarati pojedinačne ione te da možda mogu izmjenjivati prstenove s radikalima, i tako neutralizirati i one najreaktivnije među njima. S druge strane, budući da spojevi fenilboronična ($C_6H_7BO_2$) i 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina ($C_6H_4BF_3O_2$) u svojoj strukturi posjeduju aromatske prstenove s delokaliziranim elektronima te dvije –OH skupine, moglo se pretpostaviti kako će oni pokazati bolju sposobnost hvatanja slobodnih radikala od ostalih ispitivanih spojeva – što je donekle, premda ne u cijelosti, potvrđeno jedino u slučaju 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$). Spoj dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) ima dva borova atoma u prstenu, koja uspostavljaju četiri veze. Ovakav raspored omogućava borovim atomima povezivanje putem elektrona iz unutarnje ljuske, na koje – naročito kod malenih atoma, poput atoma bora – vrlo snažno utječe privlačna sila atomske jezgre, zbog čega ovi atomi prelaze u sp^3 hibridizirani oblik. Pobuđivanje elektrona iz unutarnje ljuske otvara teoretsku mogućnost za otpuštanje, ali i primanje elektrona. Povrh toga, molekula dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) sadrži i jednu –OH skupinu, koja može donirati vodik. Predstavljani rezultati istraživanja pokazali su antiradikalno djelovanje ovog spoja pri nižim koncentracijama, iako slabije od očekivanog.

Spomenute razlike u antiradikalnoj aktivnosti među ispitivanim spojevima mogu se povezati s prisustvom fluorovih atoma u njihovim molekulama. Najbolju sposobnost „gašenja“ DPPH radikala pokazali su spojevi dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) i 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) koji u svojoj strukturi posjeduju četiri, odnosno tri atoma fluora. Elektrofilni atomi fluora aktiviraju prsten te svojim djelovanjem očito uvelike doprinose povećanju antiradikalne sposobnosti. Valja istaknuti i kako je u preliminarnim istraživanjima antiradikalnih učinaka pri visokim koncentracijama (> 100 mM), kod spojeva trimetil ($C_3H_9B_3O_3$) i trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) te dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), umjesto smanjenja, uočen porast obojenja otopine DPPH radikala. Ova neuobičajena pojava bila je naročito izražena kod spoja dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), za kojega je pri koncentraciji od 1 M zabilježeno povećanje obojenja od $33,55 \pm 1,90$ %. I dok se za spojeve trimetil ($C_3H_9B_3O_3$) i trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) ovakvo ponašanje može pripisati možebitnom utjecaju organskog otapala (metanol) korištenog za pripremu njihovih otopina, u slučaju dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) nikako ne može biti

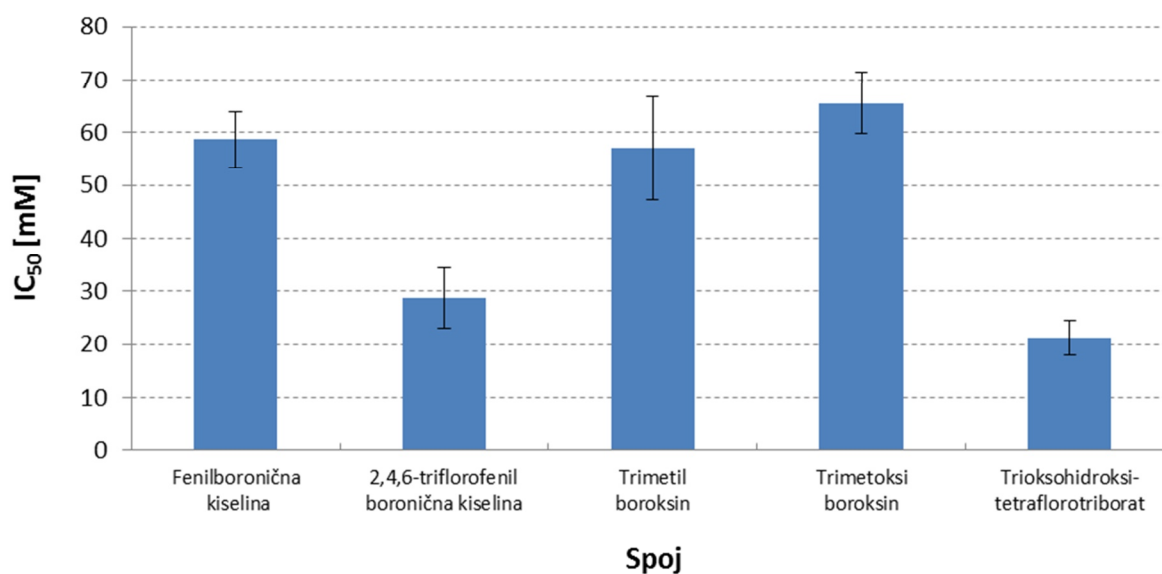
riječ o tome, budući da je za pripremu njegove otopine, baš kao i otopine DPPH radikala, kao otapalo korištena destilirana voda. Opaženo povećanje inteziteta obojenja otopine moglo bi se protumačiti kao odraz prooksidacijskog djelovanja, pri kojem atomi bora u molekulama navedenih spojeva, ponajviše dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), „grabe“ elektrone te tako posljedično, umjesto da ih neutraliziraju, potiču stvaranje slobodnih radikala. Prema novijim literaturnim izvorima (Chen i sur., 2008; Leon-Gonzalez i sur., 2015; Hong i sur., 2018), prooksidacijsko djelovanje moglo bi imati važnu ulogu u borbi protiv raka, budući da su tumorske stanice naročite osjetljive na nakupljanje slobodnih radikala u njihovoj citoplazmi. Iz tog su razloga spojevi koji pokazuju prooksidacijske učinke citotoksični za stanice raka, ali ne i za zdrave stanice. Međutim, istraživanja prooksidacijskih svojstava su još u začecima te u ovom trenutku nema dovoljno znanstvenih dokaza koji bi potkrijepili ove pretpostavke.



Slika 44. Antiradikalna aktivnost ispitivanih spojeva, pri različitim koncentracijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju triju neovisnih ispitivanja. FBK – fenilboronična kiselina; 3FFBK – 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina; 3MILB – trimetil boroksin; 3MOXB – trimetoksi boroksin; 3OH4F3B – dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat

Tablica 14. Statistička analiza IC₅₀ vrijednosti za antiradikalnu aktivnost ispitivanih spojeva. $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu razliku. FBK – fenilboronična kiselina; 3FFBK – 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina; 3MILB – trimetil boroksin; 3MOXB – trimetoksi boroksin; 3OH4F3B – dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat

Spoj	FBK	3FFBK	3MILB	3MOXB	3OH4F3B
FBK	/	$p = 0,002$	$p = 0,811$	$p = 0,017$	$p = 0,001$
3FFBK		/	$p = 0,026$	$p < 0,001$	$p = 0,032$
3MILB			/	$p = 0,024$	$p = 0,019$
3MOXB				/	$p = 0,001$
3OH4F3B					/

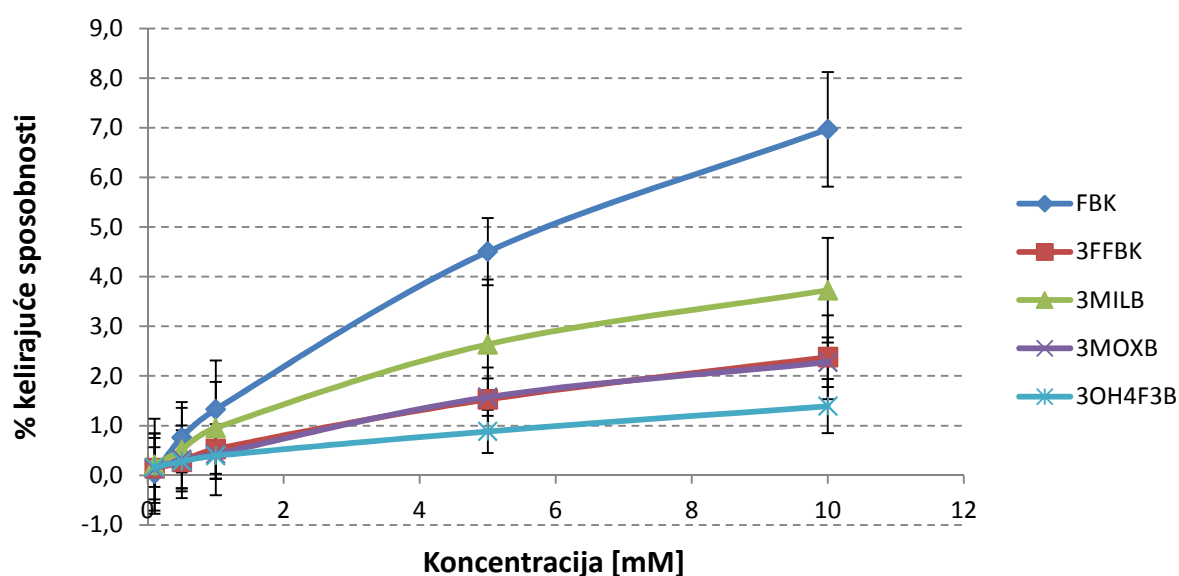


Slika 45. Usporedba IC₅₀ vrijednosti za antiradikalnu aktivnost ispitivanih spojeva

4.3.3. Kelirajuća aktivnost

Ispitivanje kelirajućeg učinka potencijalno aktivnih spojeva značajno je, jer prisutnost prijelaznih metala može pokrenuti različite oksidacijske procese u organizmu. Među prijelaznim metalima željezo je, zbog svoje visoke reaktivnosti, poznato kao najvažniji prooksidans lipidne oksidacije. Divalentni ioni željeza (Fe^{2+}) mogu pokrenuti lipidnu

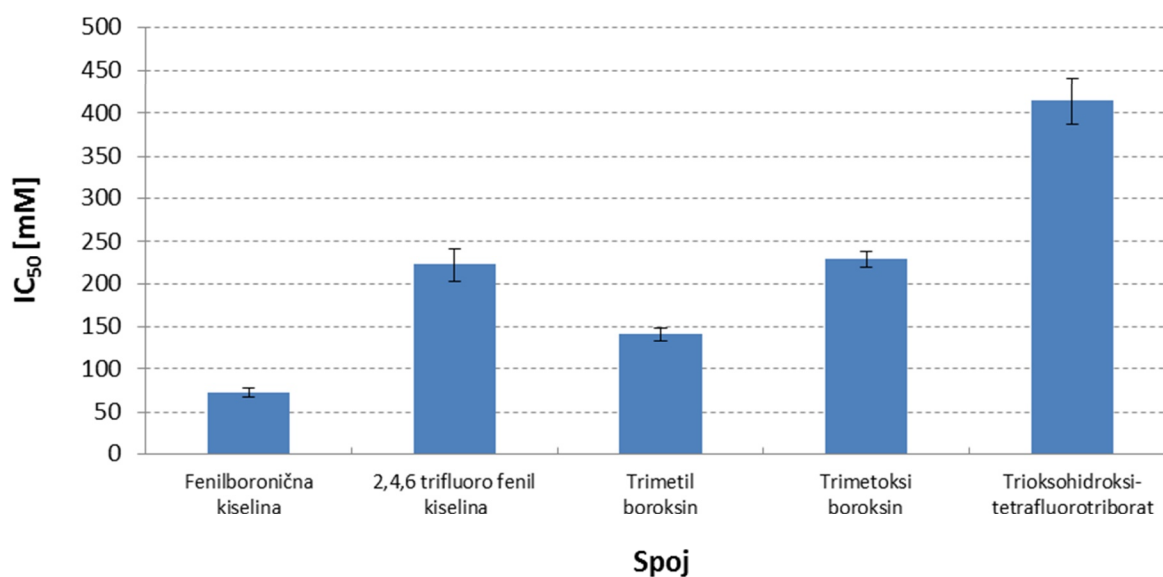
peroksidaciju, ubrzavanjem disocijacije vodikovih i lipidnih peroksida na reaktivne peroksi i alkoksi slobodne radikale prema Fentonovoj reakciji – $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH} \cdot$ (Diaz i sur., 2012; Gioti i sur., 2009). Postupak ispitivanja sposobnosti kelacije temelji se na keliranju iona Fe^{2+} s ferozinom u kompleks koji apsorbira pri valnoj duljini od 562 nm. Prisutnost kelirajućih agensa u otopini remeti nastanak kompleksa, uslijed čega dolazi do smanjenja apsorbancije. Shodno tome, sposobnost kelacije ispitivanog spoja izražava se postotkom promjene apsorbancije u odnosu na negativnu kontrolu, koja sadrži sve osim spoja i stoga ima maksimalnu apsorbanciju, budući da cijela količina Fe^{2+} ulazi u kompleks s ferozinom u otopini. Rezultati ispitivanja kelirajuće aktivnosti izdvojenih spojeva boroničnih kiselina i boroksina prikazani su na slici 46 i u tablici 15 te su ujedno iskazani i putem IC_{50} vrijednosti – odnosno koncentracije koja izaziva uklanjanje 50 % iona Fe^{2+} iz kompleksa s ferozinom i uzrokuje smanjenje apsorbancije otopine za polovinu – danih na slici 47 i u tablici 16. Detaljna statistička analiza dobivenih rezultata prikazana je u tablici 17.



Slika 46. Sposobnost kelacije ispitivanih spojeva, pri različitim koncentracijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju triju neovisnih ispitivanja. FBK – fenilboronična kiselina; 3FFBK – 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina; 3MILB – trimetil boroksin; 3MOXB – trimetoksi boroksin; 3OH4F3B – dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat

Tablica 15. Spособnost kelacije Fe^{2+} iona (apsorbancija) ispitivanih spojeva pri različitim koncentracijama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardnu devijaciju triju neovisnih ispitivanja. Sve vrijednosti množe se s faktorom 10^{-1} .

Spoj	Koncentracija [mM]				
	0,10	0,50	1,00	5,00	10,00
fenilboronična kiselina	$9,01 \pm 0,07$	$8,94 \pm 0,06$	$8,89 \pm 0,05$	$8,61 \pm 0,06$	$8,39 \pm 0,10$
2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina	$9,00 \pm 0,06$	$8,99 \pm 0,07$	$8,97 \pm 0,05$	$8,88 \pm 0,06$	$8,80 \pm 0,08$
trimetil boroksin	$8,99 \pm 0,04$	$8,97 \pm 0,04$	$8,93 \pm 0,06$	$8,78 \pm 0,06$	$8,68 \pm 0,05$
trimetoksi boroksin	$9,00 \pm 0,06$	$8,98 \pm 0,05$	$8,98 \pm 0,05$	$8,87 \pm 0,04$	$8,81 \pm 0,05$
dikalijevtriokso-hidroksitetrafluorotriborat	$9,00 \pm 0,04$	$8,99 \pm 0,05$	$8,98 \pm 0,04$	$8,93 \pm 0,04$	$8,89 \pm 0,05$



Slika 47. Usporedba IC_{50} vrijednosti za sposobnost kelacije ispitivanih spojeva.

Tablica 16. Statistička analiza IC₅₀ vrijednosti za sposobnost kelacije ispitivanih spojeva. $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu razliku. FBK – fenilboronična kiselina; 3FFBK – 2,4,6-trifluorofenil boronična kiselina; 3MILB – trimetil boroksin; 3MOXB – trimetoksi boroksin; 3OH4F3B – dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat

Spoj	FBK	3FFBK	3MILB	3MOXB	3OH4F3B
FBK	/	$p = 0,003$	$p = 0,001$	$p = 0,003$	$p = 0,001$
3FFBK		/	$p = 0,010$	$p = 0,747$	$p < 0,001$
3MILB			/	$p = 0,011$	$p = 0,002$
3MOXB				/	$p = 0,013$
3OH4F3B					/

Iz prikazanih rezultata razvidno je da svi ispitivani spojevi pokazuju zanemarivu kelirajuću aktivnost u usporedbi sa spojem EDTA koji je izrazito jak kelator Fe²⁺. Najbolje kelirajuće djelovanje, odnosno postotak inhibicije formiranja kompleksa željeza(II) s ferozinom, uočeno je kod spoja fenilboronične kiseline (C₆H₇BO₂, IC₅₀ = 72,51 mM). Postotak inhibicije čak i pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 10 mM iznosio je svega 6,97 %, dok pri koncentracijama nižim od 1 mM niti jedan od ispitivanih spojeva nije pokazao nikakvu sposobnost kelacije. Prema IC₅₀ vrijednostima, prikazanim u tablici 16, vidljivo je nadalje da nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$) između kelirajuće aktivnosti spojeva 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline (C₆H₄BF₃O₂, 222,18 mM) i trimetoksi boroksina (C₃H₉B₃O₆, 228,36 mM), ali su njihove vrijednosti gotovo dvostroko više od onih za spoj trimetil boroksina (C₃H₉B₃O₃, 141,31 mM). Zanimljivo je da je spoj dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata (K₂[B₃O₃F₄OH]), koji je ostvario najbolje učinke u prethodnim ispitivanjima antioksidacijskog djelovanja drugim spektrofotometrijskim metodama, u ovom ispitivanju pokazao uvjerljivo najmanju aktivnost, iz čega se da zaključiti da svoju antioksidacijsku moć temelji na drugim mehanizmima.

Tablica 17. Usporedba IC₅₀ vrijednosti za antiradikalnu aktivnost i sposobnost keliranja te ukupnog antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih spojeva. Vrijednosti označene različitim slovima unutar stupca međusobno se značajno statistički razlikuju (p<0,05).

Spoj	Antioksidacijski kapacitet [mM] FeSO₄	Antiradikalna aktivnost IC₅₀ [mM]	Sposobnost keliranja IC₅₀ [mM]
FBK	864,35 ± 41,88 ^a	58,69 ± 5,35 ^a	72,51 ± 5,20 ^a
3FFBK	1406,82 ± 51,59 ^b	28,79 ± 5,70 ^b	222,18 ± 19,24 ^b
3MILB	870,51 ± 31,48 ^a	57,08 ± 9,80 ^a	141,31 ± 7,10 ^c
3MOXB	3442,25 ± 214,21 ^c	65,61 ± 5,85 ^c	228,36 ± 9,74 ^b
3OH4F3B	464,27 ± 20,61 ^d	21,23 ± 3,33 ^d	414,57 ± 27,14 ^d

5. ZAKLJUČAK

Zbog izražene bioaktivnosti, u posljednjih nekoliko godina raste zanimanje za boroničnim kiselinama i njihovim derivatima te mogućim novim načinima njihove primjene. U ovoj doktorskoj disertaciji predstavljeni su rezultati sustavnog usporednog *in vitro* i *in vivo* istraživanja bioloških učinaka dosada nedovoljno istraženih, derivata boroničnih kiselina: fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenilboronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$), trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$), trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$) te dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). U okviru provedenih istraživanja ispitana su njihova citotoksična, antitumorska i antioksidacijska aktivnost te njihovo inhibicijsko djelovanje na odabrane enzime: tirozinazu, butirilkolinesterazu, heksokinazu, laktat-dehidrogenazu i piruvat-kinazu.

Citotoksični učinci

Citotoksično djelovanje odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata ispitano je na staničnim kulturama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, B16F10 mišjeg melanoma i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože te L929 mišjeg fibroblasta primjenom Crystal violet metode. U najvišim primijenjenim koncentracijama, svi ispitivani spojevi značajno su smanjili vijabilnost stanica kod svih testiranih staničnih linija, osim spoja 2,4,6-trifluorofenilboronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) kod kojeg niti na jednoj primijenjenoj koncentraciji nije dokazano citotoksično djelovanje na stanice L929 mišjeg fibroblasta. Snažna inhibicija rasta stanica B16F10 mišjeg melanoma, SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože i L929 mišjeg fibroblasta uzrokovana je niskim koncentracijama dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$, preživljavanje stanica 20 – 52 %) i trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$, preživljavanje stanica 35 – 59 %), dok su kod 4T1 stanica u navedenim koncentracijama blagi citotoksični učinci zabilježeni jedino kod spojeva trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$, preživljavanje stanica 77 %) i trimetil boroksina ($C_3H_9B_3O_3$, preživljavanje stanica 80 %).

Antitumorski učinci

Antitumorska aktivnost spojeva fenilboronične kiseline ($C_6H_7BO_2$), 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) i dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) u *in vivo* uvjetima testirana je određivanjem inhibicije rasta tumora kod eksperimentalnih miševa, s injektiranim istim tumorskim staničnim linijama koje su korištene prilikom ispitivanja citotoksičnih učinaka. Fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$) primijenjena intraperitonealno pokazala je dobro do izrazito dobro antitumorsko djelovanje na svim ispitivanim staničnim linijama (34 – 57 %), a sličan učinak (33 %) zabilježen je i mjerenjem antitumorske aktivnosti na SCCVII stanicama peroralnim načinom primjene. Tretiranje životinja nositelja spojem dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) dovelo je do 30 – 42 postotnog usporavanja rasta tumora – neovisno o načinu primjene. S druge strane, za spoj 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline ($C_6H_4BF_3O_2$) antitumorska aktivnost dokazana je jedino kod intratumoralnog načina primjene na eksperimentalnim životinjama kojima su inokulirane 4T1 tumorske stanice.

Enzimski inhibicija

U okviru ovog rada provedena je validacija inhibicijskog djelovanja odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata na aktivnost enzima butirilkolinesteraze, tirozinaze, heksokinaze, laktat-dehidrogenaze i piruvat-kinaze. Općenito, derivati s boroksinskim prstenom većinom su pokazali bolja inhibicijska svojstva u odnosu na ispitivane spojeve boroničnih kiselina. Svojim učincima posebice su se istaknuli spojevi dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) i trimetoksi boroksin ($C_3H_9B_3O_6$), za koje su u svim provedenim ispitivanjima zabilježeni najveći postotci inhibicije enzimskih aktivnosti.

Prema jakosti utvrđenog inhibicijskog djelovanja, butirilkolinesteraza je bila najosjetljivija na inhibicijsko djelovanje boroničnih kiselina i njihovih derivata te su kod nje, pri koncentraciji inhibitora 5 mM, uočeni i najizraženiji inhibicijski učinci u iznosu od 41 – 60 %. Nasuprot tome, istraživani spojevi najslabije su ometali aktivnost enzima laktat-dehidrogenaze, kod kojeg su blagi inhibicijski učinci utvrđeni jedino kod spoja trimetoksi boroksina ($C_3H_9B_3O_6$, postotak inhibicije 24 %), dok su ostali spojevi pokazali zanemarivu inhibicijsku aktivnost. U ispitivanjima je ustanovljeno i kako sve izdvojene boronične kiseline i njihovi derivati

iskazuju nekompetitivne inhibicijske učinke, što pretjerano ne iznenađuje s obzirom da nemaju nikakvih strukturnih sličnosti s korištenim supstratima.

Antioksidacijski učinci

Antioksidacijska svojstva odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata ispitana su primjenom tri različite spektrofotometrijske metode te su uspoređena sa svojstvima referentnih antioksidansa. U primijenjenim koncentracijama (0,1 – 10 mM), za niti jedan od ispitivanih spojeva nije dokazano izrazito antioksidacijsko djelovanje, niti su općenito primijećene uočljivije razlike u navedenom djelovanju između spojeva iz skupine boroničnih kiselina u odnosu na spojeve s boroksinskim prstenom.

Među ispitanim spojevima, dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) pokazao je najveći antioksidacijski kapacitet, ostvarivši pri koncentraciji 464 mM djelovanje ekvivalentno djelovanju 1 mM željezovog(II)-sulfata ($FeSO_4$). Utvrđene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kod ostalih spojeva bile su nekoliko puta niže i kretale su se u rasponu koncentracija 864 – 3442 mM ekvivalenata željezovog(II)-sulfata ($FeSO_4$).

Dikalijevtrioksohidroksitetrafluortriborat ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) pokazao je ujedno i najbolju sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala ($IC_{50} = 21,23$ mM), ali istodobno i najlošiju sposobnost keliranja Fe(II) iona ($IC_{50} = 414,57$ mM). Dobru antioksidacijsku aktivnost, usporedivu s onom dikalijevogtrioksohidroksitetrafluortriborata ($K_2[B_3O_3F_4OH]$), pokazala je 2,4,6-trifluorofenilboronična kiselina ($IC_{50} = 28,79$ mM), dok su kod preostala tri spoja zabilježeni znatno slabiji učinci ($IC_{50} = 57,08 – 65,61$ mM).

Ustanovljeno je i da, od svih ispitivanih spojeva, fenilboronična kiselina ($C_6H_7BO_2$) najsnažnije inhibira stvaranje kompleksa željeza(II) s ferozinom, uz ostvarenu IC_{50} vrijednost 72,51 mM pri najvišoj testiranoj koncentraciji.

U osvrtu na sva istraživanja provedena u ovom radu može se zaključiti da su gotovo svi istraživani spojevi pokazali dobre ili vrlo dobre rezultate u ispitivanjima citotoksičnog i antitumorskog djelovanja. Donekle su se pokazali kao dobri inhibitori istraživanih enzima, ali su pokazali relativno slabu antioksidacijsku aktivnost. Premda u ispitivanjima antioksidacijskih svojstava, korištenim metodama nije dokazano djelovanje putem mehanizma transfera elektrona, uočena je stanovita aktivnost u odnosu na slobodni DPPH

radikal. Ta činjenica upućuje na potrebu daljnjih istraživanja drugim metodama i traženje mogućih alternativnih mehanizama antioksidacijskog djelovanja. Pored toga, u svrhu pokazivanja i objašnjenja načina na koji boronične kiseline i njihovi derivati utječu na metabolizam i rast tumorskih stanica, može biti zanimljivo i korisno nastaviti istraživanja sa specifičnim podtipovima osnovnih enzima, koji su korišteni u ovom radu.

6. LITERATURA

- Abu-Hamad S., Zaid H., Israelson A., Nahon E. i Shoshan-Barmatz V. (2008) Hexokinase-I Protection against Apoptotic Cell Death Is Mediated via Interaction with the Voltage-dependent Anion Channel-1: Mapping the Site of Binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(19), str. 13482-13490. doi: 10.1074/jbc.M708216200.
- Alam M., Bristi N. i Rafiquzzaman M. (2013) Review on *in vivo* and *in vitro* Methods Evaluation of Antioxidant Activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21(2), str. 143-52. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.
- Aleshin A. E., Zeng C., Bourenkov G. P., Bartunik H. D., Fromm H. J. i Honzatko R. B. (1998) The Mechanism of Regulation of Hexokinase: New Insights from the Crystal Structure of Recombinant Human Brain Hexokinase Complexed with Glucose and Glucose-6-phosphate. *Structure*. 6(1), str. 39–50. doi:10.1016/s0969-2126(98)00006-9
- Ali A., Ashraf Z., Kumar N., Rafiq M., Jabeen F., Park J., Choi K., Lee S., Seo S., Choi E. i Attri P. (2016) Influence of Plasma-activated Compounds on Melanogenesis and Tyrosinase Activity. *Scientific Reports*. 6, str. 21779. doi: 10.1038/srep21779.
- Allison S., Knight J., Granchi C., Rani R., Minutolo F., Milner J. i Phillips R. (2014) Identification of LDH-A as a Therapeutic Target for Cancer Cell Killing via (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent Pathways. *Oncogenesis*. 3, str. e102. doi: 10.1038/oncsis.2014.16.
- Amarowicz R., Pegg R., Rahimi-Moghaddam P., Barld B. i Weil J. (2004) Free-Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of Selected Plant Species from the Canadian Prairies. *Food Chemistry*. 84(4), str. 551-562. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00278-4.
- An S., Koh J. i Boo Y. (2009) Inhibition of Melanogenesis by Tyrosinase siRNA in Human Melanocytes. *BMB Reports*. 42(3), str. 178-183.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M. i Çelik S. E. (2007) Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay. *Microchimica Acta*. 160(4), str. 413–419. doi:10.1007/s00604-007-0777-0
- Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K., Özyürek M. i Güçlü K. (2013) Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC

- Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 85(5), str. 957-998. doi: 10.1351/PAC-REP-12-07-15.
- Ardehali H., Printz R. L., Whitesell R. R., May J. M. i Granner D. K. (1999). Functional Interaction between the N- and C-terminal Halves of Human Hexokinase II. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(23), str. 15986–15989. doi: 10.1074/jbc.274.23.15986.
- Atterwill C.K. (1995) Alternative Method of Assessing Toxicity. U: S. O 'Hare, C. K. Atterwill, ur., *In Vitro Toxicity Testing Protocols*. 1. izd., Humana Press, Totowa/New Jersey, str.
- Badarinath A., Mallikarjuna Rao K., Madhu S., Chetty C., Ramkanth S., Rajan T. i Gnanaprakash K. (2010) A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*. 2(2), str. 1276-1285.
- Baker S., Ding C., Akama T., Zhang Y., Hernandez V. i Xia Y. (2009) Therapeutic Potential of Boron-containing Compounds. *Future Medicinal Chemistry*. 1(7), str. 1275-1288. doi: 10.4155/fmc.09.71.
- Bakirdere S., Örenay S. i Korkmaz M. (2010) Effect of Boron on Human Health. *The Open Mineral Processing Journal*, 3, str. 54-59. doi: 10.2174/1874841401003010054.
- Balcos M. C., Kim S. Y., Jeong H., Yun H., Baek K. J., Kwon N. S., Park K. i Kim D. (2014) Docosahexaenoic acid inhibits melanin synthesis in murine melanoma cells in vitro through increasing tyrosinase degradation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(4), 489–495. doi:10.1038/aps.2013.174
- Bell G., Froguel P., Nishi S., Pilkis S.J., Stoffel M., Takeda J., Vionnet N. i Yasuda K. (1993) Mutations of the human glucokinase gene and diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 4(3), str. 86-90. doi: 10.1016/1043-2760(93)90084-R
- Benford D.J. (1992) The use of animal cells as replacements for whole animals in the toxicity testing of chemicals and pharmaceuticals. U: *Animal Cell Technology* (Spier, R.E., Griffiths, J.B., ur.), Academic Press, London, 97-121.
- Benzie I. i Strain J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power“: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1), str. 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- Benzie I. i Strain J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous

- measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. 299, str. 15-27. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99005-5
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto Jr. G. J. i Stryer L. (2015) *Biochemistry*. 8. izd., San Francisko: W. H. Freeman and Co.
- Bernardi C., Ribeiro E., Cavalli I., Chautard-Freire-Maia E. i Souza R. (2010) Amplification and deletion of the ACHE and BCHE cholinesterase genes in sporadic breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 197(2), str. 158-65. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2009.10.011.
- Bhattacharya S. (2015) Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. U: V. Rani, U. Yadav, ur., *Free Radicals in Human Health and Disease*. 1. izd., New Delhi: Springer., str. 17–29. doi: 10.1007/978-81-322-2035-0_2
- Bortner C., Scoltock A., Cain D. i Cidlowski J. (2016) T-cell Development of Resistance to Apoptosis Is Driven by a Metabolic Shift in Carbon Source and Altered Activation of Death Pathways. *Cell Death and Differentiation*. 23(5), str. 889-902. doi: 10.1038/cdd.2015.156.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. i Berset C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT – Food and Science Technology*. 28(1), str. 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Burns J.S.. i Manda G. (2017): Metabolic Pathways of the Warburg Effect in Health and Disease: Perspectives of Choice, Chain or Chance. *International Journal of Molecular Sciences*.18(12). pii: E2755. doi: 10.3390/ijms18122755.
- Butterworth, P. J. (1972) The use of dixon plots to study enzyme inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 289(2), str. 251–253. doi:10.1016/0005-2744(72)90074-5
- BWell (2017) *How does oxidative stress affect you?* [blog] Dostupno na: <https://www.bwellbhealthy.com/blog/2017/3/4/x9b5e3icboxwcyo2kfl4fzr9k7pov3>
Pristupljeno: 3. veljače. 2019.
- Cambre J.N. i Sumerlin B.S.(2011) Biomedical applications of boronic acid polymers. *Polymer*. 52(21), str. 4631-4643. doi: 10.1016/j.polymer.2011.07.057
- Chang T.S. (2009) An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(6), str. 2440–2475. doi:10.3390/ijms10062440
- Chang T. (2012) Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors. *Journal of Biocatalysis and Biotransformation*. 1(2), str. 1-2. doi:10.4172/2324-9099.1000e106.

- Chatonnet A. i Lockridge O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*. 260(3), str. 625–634.
- Chen J., Xie J., Jiang Z., Wang B., Wang Y. i Hu X. (2011) Shikonin and Its Analogs Inhibit Cancer Cell Glycolysis by Targeting Tumor Pyruvate Kinase-M2. *Oncogene*. 30(42), str. 4297-4306. doi: 10.1038/onc.2011.137.
- Chen Q., Espey M., Sun A., Pooput C., Kirk K., Krishna M., Khosh D., Drisko J. i Levine M. (2008) Pharmacologic Doses of Ascorbate Act as a Prooxidant and Decrease Growth of Aggressive Tumor Xenografts in Mice. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*. 105(32), str. 11105-11109. doi: 10.1073/pnas.0804226105.
- Chen Z., Wang Z., Guo W., Zhang Z., Zhao F., Zhao Y., Jia D., Ding J., Wang H., Yao M. i He X. (2015) TRIM35 Interacts with Pyruvate Kinase Isoform M2 to Suppress the Warburg Effect and Tumorigenicity in Hepatocellular Carcinoma. *Oncogene*. 34(30), str. 3946-3956. doi: 10.1038/onc.2014.325.
- Cheong H., Lu C., Lindsten T. i Thompson C. (2012) Therapeutic Targets in Cancer Cell Metabolism and Autophagy. *Nature Biotechnology*. 30(7), str. 671-678. doi: 10.1038/nbt.2285.
- Christofk H., Vander Heiden M., Harris M., Ramanathan A., Gerszten R., Wei R., Fleming M., Schreiber S. i Cantley L. (2008) The M2 Splice Isoform of Pyruvate Kinase Is Important for Cancer Metabolism and Tumour Growth. *Nature*. 452(7184), str. 230-233. doi: 10.1038/nature06734.
- Cohen M. S., Shaw G. M., McMichael A. J. i Haynes, B. F. (2011) Acute HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*. 364(20), str. 1943–1954. doi:10.1056/nejmra1011874
- Colowick S. P. and Kalckar H. M. (1945) The Role of Myokinase in TransPhosphorylations. *Journal of Biological Chemistry*. 148, str. 117-126.
- Colowick S.P. (1973) The Hexokinases. U: Boyer, P., ur., *The Enzymes IX*, 1. izd., New York: Academic Press, str. 1-48. doi: 10.1016/S1874-6047(08)60113-4
- De Cock K., Xueying Z., Bugallo M. i Djuric P. (2004) Stochastic Simulation and Parameter Estimation of First Order Chemical Reactions. U: *The 2004 European Signal Processing Conference*. [online] Vienna: Robidruck, str. 1111-1114. Dostupno na: <http://www.eurasip.org/Proceedings/Eusipco/Eusipco2004/defevent/papers/cr1869.pdf> Pristupljeno: 30. rujna. 2018.

- de Grey A. (1999) *The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging*. Austin: R. G. Landes Company.
- de Grey A. (2006) Free radicals in Aging: Causal Complexity and Its Biomedical Implications. *Free Radical Research*. 40(12), str. 1244–1249. doi:10.1080/10715760600913176.
- DeBerardinis R. (2008) Is Cancer a Disease of Abnormal Cellular Metabolism? New Angles on an Old Idea. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. 10(11), str. 767-777. doi: 10.1097/GIM.0b013e31818b0d9b.
- DeBerardinis R., Sayed N., Ditsworth D., Thompson C.B. (2008): Brick by Brick: Metabolism and Tumor Cell Growth. *Current Opinion in Genetics and Development*. 18(1), str. 54-61. doi: 10.1016/j.gde.2008.02.003
- Dexter D., Kowalski H., Blazar B., Fligiel Z., Vogel R. i Heppner G. (1978) Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor. *Cancer Research*. 38(10), str. 3174-3181.
- Diaz P., Jeong S., Lee S., Khoo C. i Koyyalamudi S. (2012) Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Selected Medicinal Plants and Fungi Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. *Chinese Medicine*. 7(1), str. 26. doi: 10.1186/1749-8546-7-26.
- Djanashvili K., Frullano L. i Peters J. (2005) Molecular Recognition of Sialic Acid End Groups by Phenylboronates. *Chemistry*. 11(13), str. 4010-4018.
- Doherty J. i Cleveland J. (2013) Targeting Lactate Metabolism for Cancer Therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*. 123(9), str. 3685-3692. doi:10.1172/JCI69741.
- Dreher D. i Junod A. F. (1996) Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. *European Journal of Cancer*. 32(1), str. 30–38. doi:10.1016/0959-8049(95)00531-5.
- Drent M., Cobben N., Henderson R., Wouters E. i van Dieijen-Visser M. (1996) Usefulness of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes as Indicators of Lung Damage or Inflammation. *The European Respiratory Journal*. 9(8), str. 1736-1742. doi: 10.1183/09031936.96.09081736.
- Dronfield S., Egan K., Marsden C. A. i Green A. R. (2000) Comparison of Donepezil-, Tacrine-, Rivastigmine- and Metrifonate-Induced Central and Peripheral Cholinergically Mediated Responses in the Rat. *Journal of Psychopharmacology*. 14(3), str. 275–279. doi:10.1177/026988110001400301

- Egawa Y., Miki R. i Seki T. (2014) Colorimetric Sugar Sensing Using Boronic Acid-Substituted Azobenzenes. *Materials*. 7(2), str. 1201-1220. doi: 10.3390/ma7021201.
- Ekwall B. (1995) The Basal Cytotoxicity Concept. U: *1st World congress, Alternatives and animal use in the life sciences: education, arch, testing*, New York: Mary Ann Libert, str. 721-725.
- Ellman G., Courtney K., Andres V. Jr. i Feather-Stone R. (1961) A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, str. 88-95.
- Engstrom L., Ekman P., Humble E. i Zetterqvist Ö. (1987) Pyruvate Kinase. U: Boyer, P., Krebs E., ur., *The Enzymes XVIII*, New York: Academic Press, str. 47-76. doi:10.1016/s1874-6047(08)60253-x
- Erhardt J. (2012) Uvod u znanost o laboratorijskim životinjama. U: S. Blažević, J. Erhardt, ur., *Osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama*. 1. izd. [pdf]. Dostupno na: http://www.labanim.hr/wp-content/uploads/2013/01/LabAnim-3_Osposobljavanje-za-rad-sa-laboratorijskim-%C5%BEivotinjama.pdf Pristupljeno: 2. veljače. 2019.
- Erickson M. C. (2002) Lipid Oxidation of Muscle Foods. U: C. C. Akoh, D. B. Min, ur., *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2. izd., Boca Raton: CRC Press. doi: 10.1201/9780203908815.
- Eventoff W., Rossmann M. G., Taylor S. S., Torff H. J., Meyer H., Keil W. i Kiltz H. H. (1977) Structural Adaptations of Lactate Dehydrogenase Isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (7), str. 2677–2681. doi:10.1073/pnas.74.7.2677. PMC 431242.
- Farabegoli F., Vettraino M., Manerba M., Fiume L., Roberti M. i Di Stefano G. (2012) Galloflavin, a New Lactate Dehydrogenase Inhibitor, Induces the Death of Human Breast Cancer Cells with Different Glycolytic Attitude by Affecting Distinct Signaling Pathways. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 47(4), str. 729–738. doi:10.1016/j.ejps.2012.08.012
- Fent K. (2001) Fish Cell Lines as Versatile Tools in Ecotoxicology: Assesement of Cytotoxicity, Cytochrome P4501A Induction Potential and Estrogenic Activity of Chemicals and Enviromental Samples. *Toxicology in Vitro*. 15(4-5), str. 477-488.
- Ferlat S. i Favier A. (1993) Tumor Necrosis Factor (TNF) and Oxygen Free Radicals: Potential Effects for Immunity. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*. 187(3), str. 296–307.

- Fidler I. (1970) Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *Journal of National Cancer Institute*. 45(4), str. 773-782.
- Finney D. (1952) *Probit Analysis*. England: Cambridge University Press.
- Fox J. i MacFarlane M. (2016) Targeting Cell Death Signalling in Cancer: Minimising 'Collateral Damage'. *British Journal of Cancer*. 115(1), str. 5-11. doi: 10.1038/bjc.2016.111.
- Freshney R.I. (2000) *Animal Cell Culture*. 2. izd., New York: Oxford University Press.
- Galić B. (2012) *Boroxine Composition for Removal of Skin Changes*. US8278289.
- Galić B. (2013) *Removal of Skin Changes*. EP1996514.
- Galov A. (2012) Alternativni pristupi korištenju laboratorijskih životinja. U: S. Blažević, J. Erhardt, ur., *Osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama*. 1. izd. [pdf]. Dostupno na: http://www.labanim.hr/wp-content/uploads/2013/01/LabAnim-3_Osposobljavanje-za-rad-sa-laboratorijskim-%C5%BEivotinjama.pdf Pristupljeno: 2. veljače. 2019.
- Gershon T., Crowther A., Tikunov A., Garcia I., Annis R., Yuan H., Miller C., Macdonald J., Olson J. and Deshmukh M. (2013) Hexokinase-2-mediated Aerobic Glycolysis Is Integral to Cerebellar Neurogenesis and Pathogenesis of Medulloblastoma. *Cancer & Metabolism*. 1(1), str. 2-19. doi: 10.1186/2049-3002-1-2.
- Giotia E., Fiamegosa Y., Skalkosb D. i Stalikasa C. (2009) Antioxidant Activity and Bioactive Components of the Aerial Parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chemistry*. 117(3), str. 398-404. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.016.
- Granchi C., Roy S., Giacomelli C., Macchia M., Tuccinardi T., Martinelli A., Lanza M., Betti L., Giannaccini G., Lucacchini A., Funel N., León L. G., Giovannetti E., Peters G. J., Palchaudhuri R., Calvaresi E. C., Hergenrother P. J. i Minutolo F. (2011) Discovery of N-Hydroxyindole-Based Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenase Isoform A (LDH-A) as Starvation Agents against Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54(6), str. 1599–1612. doi:10.1021/jm101007q.
- Greig N.H., Lahiri D.K., Sambamurti K. (2002) Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*. 14 Suppl 1. str.77-91.
- Groner E., Ashani Y., Schorer-Apelbaum D., Sterling J., Herzig Y. i Weinstock M. (2007) The Kinetics of Inhibition of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by

- Two Series of Novel Carbamates. *Molecular Pharmacology*. 71 (6), str. 1610-1617. doi: 10.1124/mol.107.033928.
- Guan Y. i Zhang Y. (2013) Boronic Acid-Containing Hydrogels: Synthesis and Their Applications. *Chemical Society Reviews*. 42(20), str. 8106–8121. doi:10.1039/c3cs60152h.
- Gumienna-Kontecka E., Pyrkosz-Bulska M., Szebesczyk A. i Ostrowska M. (2014.) Iron Chelating Strategies in Systemic Metal Overload, Neurodegeneration and Cancer. *Current Medicinal Chemistry*. 21(33), str. 3741–3767. doi: 10.2174/0929867321666140706143402.
- Hagen H., Marzenell P., Jentzsch E., Wenz F., Veldwijk M. i Mokhir A. (2012) Aminoferrocene-Based Prodrugs Activated by Reactive Oxygen Species. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55 (2), str. 924–934. doi: 10.1021/jm2014937.
- Haghnazari L., Vaisi-Raygani A., Keshvarzi F., Ferdowsi F., Goodarzi M., Rahimi Z., Baniamerian H., Tavilani H., Vaisi-Raygani H., Vaisi-Raygani H. i Pourmotabbed T. (2016) Effect of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase on Intrauterine Insemination, Contribution to Inflammations, Oxidative Stress and Antioxidant Status; A Preliminary Report. *Journal of Reproduction & Infertility*. 17(3), str. 157-162.
- Hall D. (2011) Structure, Properties and Preparation Of Boronic Acid Derivatives. Overview of Their Reactions and Applications. U: Hall, D., ur., *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis Medicine and Materials 1&2*, 2. izd., Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. doi:10.1002/9783527639328
- Haverić S., Haverić A., Bajrović K, Galić B. i Maksimović M. (2011) Effects of Dipotassium Trioxohydroxytetrafluorotriborate ($K_2[B_3O_3F_4OH]$) on Genetic Material and Inhibition of Cell Division in Human Cell Cultures. *Drug and Chemical Toxicology*. 34 (3), str. 250-254.
- Hearing V. i Jimenez M. (1987) Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *International Journal of Biochemistry*. 19(12), str. 1141-1147.
- Heppner G., Dexter D., DeNucci T., Miller F. i Calabresi P. (1978) Heterogeneity in Drug Sensitivity among Tumor Cell Subpopulations of a Single Mammary Tumor. *Cancer Research*. 38(11), str. 3758-3763.
- Heppner G., Miller F. i Malathy Shekhar P. (2000) Nontransgenic Models of Breast Cancer. *Breast Cancer Research*. 2(5), str. 331-334. doi: 10.1186/bcr77.

- Holbrook J., Liljas A., Steindel S. i Rossmann M. (1975) Lactate Dehydrogenase. U: Boyer, P., ur., *The Enzymes XI*, 1. izd., New York: Academic Press, str. 191-293.
- Hong C., Chau K. i Schapira A. (2016) Meclizine-induced Enhanced Glycolysis is Neuroprotective in Parkinson Disease Cell Models. *Scientific Reports*. 6, str. 25344. doi: 10.1038/srep25344.
- Hong E., Lee D., Kang H., Kim Y.-C. i Shim M. (2018) Cancer-Specific Pro-Oxidant Therapy Using Low-Toxic Polypeptide Micelles Encapsulating Piperlongumine. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 63(25), str. 57-64. doi: 10.1016/j.jiec.2018.01.040.
- Hranilović D. (2012) Glodavci kao modeli za istraživanje neurobiološke podloge ponašanja. U: S. Blažević, J. Erhardt, ur., *Osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama*. 1. izd. [pdf]. Dostupno na: http://www.labanim.hr/wp-content/uploads/2013/01/LabAnim-3_Osposobljavanje-za-rad-sa-laboratorijskim-%C5%BEivotinjama.pdf Pristupljeno: 2. veljače. 2019.
- Hsu P. i Sabatini D. (2008) Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*. 134(5), str. 703-707. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021.
- Huang D., Ou B. i Prior R. (2005) The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6), str. 1841-1856. doi: 10.1021/jf030723c.
- Huang L., Yu Z., Zhang Z., Ma W., Song S. i Huang G. (2016) Interaction with Pyruvate Kinase M2 Destabilizes Tristetraprolin by Proteasome Degradation and Regulates Cell Proliferation in Breast Cancer. *Scientific Reports*. 6, str. 22449. doi:10.1038/srep22449.
- Ionita P. (2005) Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species. *Chemical Papers*. 59(1), str. 11-16.
- Iqbal M.A., Siddiqui F.A., Gupta V., Chattopadhyay S., Gopinath P., Kumar B., Manvati S., Chaman N., Bamezai R.N. (2013) Insulin enhances metabolic capacities of cancer cells by dual regulation of glycolytic enzyme pyruvate kinase M2. *Molecular Cancer* 2013, 12, str. 72–83. doi: 10.1186/1476-4598-12-72.
- Islamović S., Galić B. i Miloš M. (2014) A Study of the Inhibition of Catalase by Dipotassium Trioxohydroxytetrafluorotriborate $K_2[B_3O_3F_4OH]$. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 29(5), str. 744-748. doi: 10.3109/14756366.2013.8482034-359.

- Ivanković S., Stojković R., Galić Z., Galić B., Ostojić J., Marasović M. i Miloš M. (2014) *In vitro* and *in vivo* Antitumor Activity of the Halogenated Boroxine Dipotassium Trioxohydroxytetrafluorotriborate ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 30(3), str. 354-359. doi: 10.3109/14756366.2014.926344.
- Jang M., Kim S. i Lee J. (2013) Cancer Cell Metabolism: Implications for Therapeutic Targets. *Experimental and Molecular Medicine*. 45(10), str. e45. doi: 10.1038/emm.2013.85.
- Jomova K. i Valko M. (2011) Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 17(31), str. 3460–3473. doi: 10.2174/138161211798072463.
- Jurica M., Mesecar A., Heath P., Shi W., Nowak T. i Stoddard B. (1998) The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase by Fructose-1,6-bisphosphate. *Structures*. 6(2), str. 195-210. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00021-5.
- Kadenbach B. (2012) Introduction to Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. u: Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 748, str. 1-11. doi: 10.1007/978-1-4614-3573-0_1
- Kim S., Bae S. i Hahn J. (2016) Redirection of Pyruvate Flux Toward Desired Metabolic Pathways Through Substrate Channeling Between Pyruvate Kinase and Pyruvate-converting Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*. 6, str. 24145. doi: 10.1038/srep24145.
- Kniewald J., Kmetič I., Gaurina Srček V., Kniewald Z. (2005) Alternative Models for Toxicity Testing of Xenobiotics. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 56(2), str. 195-204.
- Koshland D. (1995) The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angewandte Chemie International Edition*. 33(23-24), str. 2375-2378. doi: 10.1002/anie.199423751
- Kuang Y., Balakrishnan K., Gandhi V. i Peng X. (2011) Hydrogen Peroxide Inducible DNA Cross-Linking Agents: Targeted Anticancer Prodrugs. *Journal of American Chemical Society*. 133(48), str. 19278–19281. doi: 10.1021/ja2073824.
- Kuivila H. i Armour A. (1957) Electrophilic Displacement Reactions. IX. Effects of Substituents on Rates of Reactions between Hydrogen Peroxide and Benzenboronic Acid. *Journal of American Chemical Society*. 79(21), str. 5659–5662. doi: 10.1021/ja01578a020.
- LaBerge M. (2008) *Biochemistry. Essential Chemistry*. Langhorne: Chelsea House.

- Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., ... Dang, C. V. (2010) Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2037–2042. doi:10.1073/pnas.0914433107
- Lee C.-Y. G., Moon Y. S., Yuan J. H. i Chen A. F. (1982) Enzyme Inactivation and Inhibition by Gossypol. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 47(2), str. 65–70. doi:10.1007/bf00234406
- Lehman D. S. (1963) Some Principles of Chelation Chemistry. *Soil Science Society of America Journal*. 27(2), str. 167–170. doi: 10.2136/sssaj1963.03615995002700020024x
- León-González A., Auger C. i Schini-Kerth V. (2015) Pro-Oxidant Activity of Polyphenols and Its Implication on Cancer Chemoprevention and Chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*. 98(3), str. 371-380. doi: 10.1016/j.bcp.2015.07.017.
- Leskovac V. (2004) *Comprehensive enzyme kinetics*. New York: Springer US.
- Liu X., Wang X., Zhang J., Lam E., Shin V., Cheng A., Yu J., Chan F., Sung J. i Jin H. (2010) Warburg Effect Revisited: An Epigenetic Link Between Glycolysis and Gastric Carcinogenesis. *Oncogene*. 29(3), str. 442-450. doi: 10.1038/onc.2009.332.
- López-Lázaro M. (2008) The Warburg Effect: Why and How Do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen? *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. 8(3), str. 305-312.
- Lu W., Logsdon C. i Abbruzzese J. (2013) Cancer Metabolism and Its Therapeutic Implications. *Journal of Cell Science & Therapy*. 4, str. 143-152. doi: 10.4172/2157-7013.1000143.
- Ma Y., Yu C., Mohamed E., Shao H., Wang L., Sundaresan G., Zweit J., Idowu M. i Fang X. (2016) A Causal Link from ALK to Hexokinase II Overexpression and Hyperactive Glycolysis in EML4-ALK-positive Lung Cancer. *Oncogene*. 35(47), str. 6132-6142. doi: 10.1038/onc.2016.
- Madern D., Ebel C., Dale H.A., Lien T., Steen I.H., Birkeland N.K. i Zaccai G. (2001) Differences in the oligomeric states of the LDH-like L-MalDH from the hyperthermophilic archaea *Methanococcus jannaschii* and *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry*, 40 (34), str. 10310–10316. doi: 10.1021/bi010168c
- Marangoni A. (2003) *Enzyme kinetics: A modern approach*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

- Martin D., Stolfi R., Sawyer R., Spiegelman S. i Young C. (1982) High-dose 5-fluorouracil with Delayed Uridine “Rescue” in Mice. *Cancer Research*. 42(10), str. 3964-3970.
- Matschinsky F. M. (2002) Regulation of Pancreatic β -Cell Glucokinase: From Basics to Therapeutics. *Diabetes*. 51(suppl 3): str. S394–S404. doi: 10.2337/diabetes.51.2007.S394.
- Meyerhof O. (1935) Über umkehrbare Reaktionen im Verlauf der biologischen Zuckerspaltung. *Naturwissenschaften*. 23, str. 490.
- Michaelis L. i M. L. Menten M.L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochemische Zeitschrift*. 49, str. 333-369.
- Miyatake S.I., Kawabata S., Hiramatsu R., Kuroiwa T., Suzuki M., Kondo N., Ono K. (2016) Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors. *Neurologia medico-chirurgica*. 56(7), str. 361–371. doi: 10.2176/nmc.ra.2015-0297
- Miyatake S.I., Kawabata S., Hiramatsu R., Kuroiwa T., Suzuki M., Ono K. (2018) Boron Neutron Capture Therapy of Malignant Gliomas. *Progress in Neurological Surgery*. 32, str. 48-56. doi: 10.1159/000469679. Epub 10.07.2018.
- Molyneux P. (2004) The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2), str. 211-219.
- Monteith G., Davis F. i Roberts-Thomson S. (2012) Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(38), str. 31666–31673. doi: 10.1074/jbc.R112.343061.
- Morecki S., Yacovlev L. i Slavin S. (1998) Effect of Indomethacin on Tumorigenicity and Immunity Induction in a Murine Model of Mammary Carcinoma. *International Journal of Cancer*. 75(6), str. 894-899.
- Muñoz-Pinedo C., El Mjiyad N. i Ricci J.-E. (2012) Cancer Metabolism: Current Perspectives and Future Directions. *Cell Death and Disease*. 3(1), str. e248. doi: 10.1038/cddis.2011.123.
- Nelson D. i Cox M. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: WH Freeman and Co. str. 521-559.
- Nema R. i Khare S. (2012) Animal Cell Culture: Advance Technology for Modern Research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3(3), str. 219-226. doi: 10.4236/abb.2012.33030

- Niki E. (2010) Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 48(1), str. 3–7. doi: 10.3164/jcbrn.11-007FR.
- Nimse S. B. i Pal D. (2015) Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanisms. *RSC Advances*. 5(35), str. 27986–28006. doi:10.1039/c4ra13315c
- Núñez M. T. i Chana-Cuevas P. (2018) New Perspectives in Iron Chelation Therapy for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 11(4), str. 1–22. doi: 10.3390/ph11040109
- Oberley T. i Oberley L. (1997) Antioxidant Enzyme Levels in Cancer. *Histology and Histopathology*. 12(2), str. 525-535.
- Oršolić N. (2012) Životinjski modeli. U: S. Blažević, J. Erhardt, ur., *Osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama*. 1. izd. [pdf]. Dostupno na: http://www.labanim.hr/wp-content/uploads/2013/01/LabAnim-3_Osposobljavanje-za-rad-sa-laboratorijskim-%C5%BEivotinjama.pdf Pristupljeno: 2. veljače. 2019.
- Paramore A. i Frantz S. (2003) Bortezomib. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2(8), str. 611-612. doi:10.1038/nrd1159.
- Patočka J, Kuča K. i Jun D. (2004) Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase - Important Enzymes of Human Body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 47(4), str. 215–228. doi: 10.14712/18059694.2018.95.
- Pecorino L. (2012) *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics*. Oxford: University Press. str. 1-20.
- Pelicano H., Martin D., Xu R. i Huang P. (2006) Glycolysis Inhibition for Anticancer Treatment. *Oncogene*. 25(34), str. 4633-4646. doi: 10.1038/sj.onc.1209597.
- Peng X. i Gandhi V. (2012) ROS-Activated Anticancer Prodrugs: A New Strategy for Tumor-Specific Damage. *Therapeutic Delivery*. 3(7), str. 823-833. doi: 10.4155/tde.12.61
- Pimentel C., Batista-Nascimento L., Rodrigues-Pousada C. i Menezes R. A. (2012) Oxidative Stress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Insights from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012, str. 1–9. doi:10.1155/2012/132146.
- Pine S. H. (1994) *Organska kemija*. 3. izd., Zagreb: Školska knjiga.
- Pisoschi A. M. i Negulescu G. P. (2012) Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 1(1), str. 1–10. doi:10.4172/2161-1009.1000106

- Pohanka M. (2011) Cholinesterases, a Target of Pharmacology and Toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*. 155(3), str. 219–229. doi: 10.5507/bp.2011.036.
- Pohanka M. (2014) Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(6), str. 9809-9825. doi: 10.3390/ijms15069809.
- Prior R., Wu X. i Schaich K. (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10), str. 4290-302. doi: 10.1021/jf0502698.
- Pulaski B., Clements V., Pipeling M. i Ostrand-Rosenberg S. (2000) Immunotherapy with Vaccines Combining MHC Class II/CD80+ Tumor Cells with Interleukin-12 Reduces Established Metastatic Disease and Stimulates Immune Effectors and Monokine Induced by Interferon Gamma. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 49(1), str. 34-45. doi: 10.1007/s002620050024
- Rabeta M. i Nur Faraniza R. (2013) Total Phenolic Content and Ferric Reducing Antioxidant Power of the Leaves and Fruits of *Garcinia Atroviridis* and *Cynometra Cauliflora*. *International Food Research Journal*. 20(4), str. 1691-1696.
- Racker E. (1947) Spectrophotometric Measurement of Hexokinase and Phosphokinase Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 167(3), str. 843-855.
- Radojčić Redovniković I., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srček V. i Radošević K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 11 (3-4), str. 169-175.
- Ramachandran P. (2013) Focusing on Boron in Medicinal Chemistry. *Future Medicinal Chemistry*. 5(6), str. 611-612. doi: 10.4155/fmc.13.60.
- Ramos A., Neves A., Ventura R., Maycock C., López P. i Santos H. (2004) Effect of Pyruvate Kinase Overproduction on Glucose Metabolism of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. 150(4):1103-1111. doi: 10.1099/mic.0.26695-0.
- Renaud P., Beauseigneur A., Brecht-Forster A., Becattini B., Darmency V., Kandhasamy S., Montermini F., Ollivier C., Panchaud P., Pozzi D., Scanlan E., Schaffner A.-P. i Weber V. (2007) Boron: A Key Element in Radical Reactions. *Pure and Applied Chemistry*. 79(2), str. 223-233. doi:10.1351/pac200779020223.
- Rice-Evans C., Diplock A. i Symons M. (1991) *Techniques in free radical research*. Amsterdam: Elsevier Science. str. 101–124.

- Robey R. i Hay N. (2006) Mitochondrial Hexokinases, Novel Mediators of the Antiapoptotic Effects of Growth Factors and Akt. *Oncogene*. 25(34), str. 4683-4696. doi: 10.1038/sj.onc.1209595.
- Ryss I.G. i Slutskaya M.M. (1951) Report on the platinum sector. *Akad Nauk SSSR*. 26, str. 216-218.
- Sanchez W., McGee S., Connor T., Mottram B., Wilkinson A., Whitehead J., Vuckovic S. i Catley L. (2013) Dichloroacetate Inhibits Aerobic Glycolysis in Multiple Myeloma Cells and Increases Sensitivity to Bortezomib. *British Journal of Cancer*. 108(8), str. 1624-1633. doi: 10.1038/bjc.2013.120.
- Santa Cruz Biotechnology. (2009a) *Trimethylboroxine*. [online] Dostupno na: <http://datasheets.scbt.com/sc-253764.pdf> Pristupljeno: 30. rujna 2016.
- Santa Cruz Biotechnology. (2009b) *Trimethoxyboroxine*. [online] Dostupno na: <http://datasheets.scbt.com/sc-229585.pdf> Pristupljeno: 30. rujna 2016.
- Sanz C., Roncero I., Alvarez E., Hurtado V. i Blazquez E. (2011) Glucokinase as a Glucose Sensor in Hypothalamus - Regulation by Orexigenic and Anorexigenic Peptides. U: G. Aimaretti, ur., *Update on Mechanisms of Hormone Action - Focus on Metabolism, Growth and Reproduction*. 1. izd., Rijeka: InTech Europe, str. 33–58. doi:10.5772/20826
- Scorei R. (2011) Boron Compounds in the Breast Cancer Cells, Chemoprevention and Chemotherapy. In E. Gunduz, M. Gunduz, ur., *Breast Cancer – Current and Alternative Therapeutic Modalities*, 1. izd., Rijeka: InTech Open, str. 91-114.
- Scorei R. i Popa Jr. R. (2010) Boron-containing Compounds as Preventive and Chemotherapeutic Agents for Cancer. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. 10(4), str. 346-351.
- Scott D., Richardson A., Filipp F., Knutzen C., Chiang C., Ronai Z., Osterman A. i Smith J. (2011) Comparative Metabolic Flux Profiling of Melanoma Cell Lines: Beyond the Warburg Effect. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(49), str. 42626-42634. doi: 10.1074/jbc.M111.282046.
- Seeger P. i Wolz S. (1990) *Successful biological control of cancer by combat against the causes*. Neuweid: Neuwieder Verlagsgesellschaft.
- Sharma R. (2012) Enzyme inhibition: Mechanism and scope. In R. Sharma, ur., *Enzyme Inhibition and Bioapplications*, 1. izd., Rijeka: InTech Open, str. 3-38.

- Shi Y. i Pinto B. (2014) Human Lactate Dehydrogenase A Inhibitors: A Molecular Dynamics Investigation. *PLOS ONE*. 9(1), str. e86365. doi: 10.1371/journal.pone.0086365.
- Shikata F., Tokumitsu H., Ichikawa H. i Fukumori Y. (2002) In Vitro Cellular Accumulation of Gadolinium Incorporated into Chitosan Nanoparticles Designed for Neutron-Capture Therapy of Cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 53(1), str. 57-63.
- Song Y., Xu Y., Deng J., Chen M., Lu Y., Wang Y., Yao H., Zhou L., Liu Z., Lai L. i Li Z. (2017) CRISPR/Cas9-Mediated Mutation of Tyrosinase (Tyr) 3' UTR Induce Graying in Rabbit. *Scientific Reports*. 7(1), str. 1–8. doi: 10.1038/s41598-017-01727-y.
- Soriano-Ursúa M., Farfán-García E., López-Cabrera Y., Querejeta E. i Trujillo-Ferrara J. (2014) Boron-Containing Acids: Preliminary Evaluation of Acute Toxicity and Access to the Brain Determined by Raman Scattering Spectroscopy. *Neurotoxicology*. 1(40), 8-15. doi: 10.1016/j.neuro.2013.10.005.
- Spriet L. L., Howlett R. A. i Heigenhauser G. J. F. (2000) An Enzymatic Approach to Lactate Production in Human Skeletal Muscle During Exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 32(4), str. 756–763. doi:10.1097/00005768-200004000-00007
- Stolfi R., Martin D., Sawyer R. i Spiegelman S. (1983) Modulation of 5-Fluorouracil-Induced Toxicity in Mice with Interferon or with the Interferon Inducer Polyinosinic-Polycytidylic Acid. *Cancer Research*. 43(2), str. 561-566.
- Stryer L. (1991) *Biokemija*, 2. izd., Zagreb: Školska knjiga.
- Stubbs M. i Griffiths J.R. (2010): The Altered Metabolism of Tumors: HIF-1 and Its Role in the Warburg Effect, *Advances in Enzyme Regulation*, 50, str. 44-55.
- Štraus B. (2009) Enzimi, U: Čvorišćec, D., Čepelak, I., ur., *Štrausova medicinska biokemija*, 3. izd., Zagreb: Medicinska naklada. str. 245-313.
- Štraus B., Stavljenić-Rukavina A. i Plavšić F. (1997) *Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju*, Zagreb: Medicinska naklada.
- Talaiezhadeh A., Shahriari A., Tabandeh M., Fathizadeh P. i Mansouri S. (2015) Kinetic Characterization of Lactate Dehydrogenase in Normal and Malignant Human Breast Tissues. *Cancer Cell International*. 15, str. 19. doi: 10.1186/s12935-015-0171-7.
- Trippier P. i McGuigana C. (2010) Boronic Acids in Medicinal Chemistry: Anticancer, Antibacterial and Antiviral Applications. *Medicinal Chemical Communications*. 1(3), str. 183-198. doi: 10.1039/c0md00119h.

- Twomey J. J., O'Neal F. B., Alfrey C. P. i Moser R. H. (1967) ATP Metabolism in Pyruvate Kinase Deficient Erythrocytes. *Blood*. 30(5), str. 576–586.
- Uchida R., Ishikawa S. i Tomoda H. (2014) Inhibition of Tyrosinase Activity and Melanine Pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 4(2), str. 141-145. doi: 10.1016/j.apsb.2013.12.008.
- Vancoillie G. i Hoogenboom R. (2016) Responsive Boronic Acid-Decorated (Co)polymers: From Glucose Sensors to Autonomous Drug Delivery. *Sensors (Basel)*. 16(10), str. 1736. doi:10.3390/s16101736
- Vander Heiden M., Cantley L. i Thompson C. (2009) Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 324(5930), str. 1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.
- Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71(1), str. 230-235. doi: 10.1016/j.talanta.2006.03.050.
- Voet J. G., Pratt C. W. i Voet D. (2011) *Fundamentals of Biochemistry (Life at the Molecular Level)*, 3. izd., Hoboken: Wiley.
- von Morze C., Bok R. A., Ohliger M. A., Zhu Z., Vigneron D. B. i Kurhanewicz J. (2015) Hyperpolarized $[^{13}\text{C}]$ ketobutyrate, a Molecular Analog of Pyruvate with Modified Specificity for LDH Isoforms. *Magnetic Resonance in Medicine*. 75(5), str. 1894–1900. doi:10.1002/mrm.25716.
- Vullo D., Miloš M., Galić B., Scozzafava A. i Supuran C. (2014) Dipotassium-trioxohydroxytetrafluorotriborate, $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$ Is a Potent Inhibitor of Human Carbonic Anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 30(2), str. 341-344. doi: 10.3109/14756366.2014.918610.
- Wang X., Li X., Zeng Y.-N., He F., Yang X.-M. i Guan F. (2016) Enhanced Expression of Polysialic Acid Correlates with Malignant Phenotype in Breast Cancer Cell Lines and Clinical Tissue Samples. *International Journal of Molecular Medicine*. 37(1), str. 197-206. doi: 10.3892/ijmm.2015.2395.
- Warburg O. (1956) On the Origin of Cancer Cells, *Science*. 123, str. 309-314.
- Warburg O., Wind F., Negelein E. (1927): The Metabolism of Tumors In The Body. *Journal of General Physiology*. 8(6), str.p 519–530.
- Warren J. J. i Mayer J. M. (2010) Tuning of the Thermochemical and Kinetic Properties of Ascorbate by Its Local Environment: Solution Chemistry and Biochemical Implications.

- Journal of the American Chemical Society.* 132(22), str. 7784–7793. doi:10.1021/ja102337n
- Weinberg S. i Chandel N. (2015) Targeting Mitochondria Metabolism for Cancer Therapy. *Nature Chemical Biology.* 11(1), str. 9-15. doi: 10.1038/nchembio.1712.
- Wilkinson J. H. (1970) Enzyme Kinetics and Its Relevance to Enzyme Assay. *Journal of Clinical Pathology.* 4(1), str. 14–21. doi:10.1136/jcp.s1-4.1.14
- Wilson J. E. (1997) An Introduction to the Isoenzymes of Mammalian Hexokinase Types I-III. *Biochemical Society Transactions.* 25(1), str. 103-108. doi: 10.1042/bst0250103.
- Wilson J. E. (2003) Isozymes of Mammalian Hexokinase: Structure, Subcellular Localization and Metabolic Function. *Journal of Experimental Biology.* 206(12), str. 2049–2057. doi:10.1242/jeb.00241
- Winder A. J. i Harris H. (1991) New Assays for the Tyrosine Hydroxylase and Dopa Oxidase Activities of Tyrosinase. *European Journal of Biochemistry.* 198(2), str. 317–326.
- Wong M., Krycer J., Burchfield J., James D. i Kuncic Z. (2015) A Generalised Enzyme Kinetic Model for Predicting the Behaviour of Complex Biochemical Systems. *FEBS Open Bio.* 5, str. 226-239. doi: 10.1016/j.fob.2015.03.002.
- Worek F., Mast U., Kiderlen D., Diepold C. i Eyer P. (1999) Improved Determination of Acetylcholinesterase Activity in Human Whole Blood. *Clinical Chimica Acta.* 288(1-2), str. 73-90. doi:10.1016/s0009-8981(99)00144-8
- Workman P., Aboagye E., Balkwill F., Balmain A., Bruder G., Chaplin D., Double J., Everitt J., Farningham D., Glennie M., Kelland L., Robinson V., Stratford I., Tozer G., Watson S., Wedge S. and Eccles S. (2010) Guidelines for the Welfare and Use of Animals in Cancer Research. *British Journal of Cancer.* 102(11), str. 1555-1577. doi: 10.1038/sj.bjc.6605642.
- Wyatt E., Wu R., Rabeh W., Park H.-W., Ghanefar M. i Ardehali H. (2010) Regulation and Cytoprotective Role of Hexokinase III. *PLOS ONE.* 5(11), str. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0013823
- Xu Y., Zhao X., Glass D., Absalan F., Perlman D., Broach J. i Rabinowitz J. (2012) Regulation of Yeast Pyruvate Kinase by Ultrasensitive Allosteric Independent of Phosphorylation. *Molecular Cell.* 48(1), str. 52-62. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.013.
- Yang W., Gao X. i Wang B. (2003) Boronic Acid Compounds as Potential Pharmaceutical Agents. *Medicinal Research Reviews.* 23(3), str. 346-368. doi: 10.1002/med.10043.

- Yang W., Zheng Y., Xia Y., Ji H., Chen X., Guo F., Lyssiotis C., Aldape K., Cantley L. and, Lu Z. (2012) ERK1/2-dependent Phosphorylation and Nuclear Translocation of PKM2 Promotes the Warburg Effect. *Nature Cell Biology*. 14(12), str. 1295-1304. doi: 10.1038/ncb2629.
- Yang X., Long G., Zhao H. i Liao F. (2012) Kinetic Analyses of Enzyme Reaction Curves with New Integrated Rate Equations and Applications. U: K. Varmuza, ur., *Chemometrics in Practical Applications*, 1. izd., Rijeka: InTech Open, str. 157-184.
- Yen G.C., Duh P.D. i Chuang D.Y. (2000) Antioxidant Activity of Anthraquinones and Anthrone. *Food Chemistry*. 70(4), str. 437-441. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00108-4.
- Young H., Baum R., Cremerius U., Herholz K., Hoekstra O., Lammertsma A.A., Pruim J. i Price P. (1999) Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group. *European Journal of Cancer*. 35 (13): str. 1773–1782. doi: 10.1016/S0959-8049(99)00229-4.
- Zelent, D., Najafi, H., Odili, S., Buettger, C., Weik-Collins, H., Li, C., Matschinsky, F. M. (2005) Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), str. 306–310. doi:10.1042/bst0330306
- Zhang C., Liu J., Liang Y., Wu R., Zhao Y., Hong X., Lin M., Yu H., Liu L., Levine A., Hu W. i Feng Z. (2013) Tumour-associated Mutant p53 Drives the Warburg Effect. *Nature Communications*. 4, str. 2935. doi: 10.1038/ncomms3935.
- Zhao Y., Butler E. i Tan M. (2013) Targeting Cellular Metabolism to Improve Cancer Therapeutics. *Cell Death and Disease*. 4, str. e532. doi: 10.1038/cddis.2013.60.

7. ŽIVOTOPIS

Maja Marasović rođena je 18. rujna 1986. god. u Splitu, gdje je završila opću gimnaziju „Vladimir Nazor“. Na Kemijsko-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Splitu završila je preddiplomski studij Kemije 2008 godine te diplomski studije Kemije, smjer Organska kemija i biokemija 2010. godine.

Tijekom studija dobila je tri Rektorove nagrade, tri nagrade Fakultetskog vijeća i Top stipendiju Republike Hrvatske. Pobjedila je 2009. god. na FameLab natjecanjima (British Council), na regionalnom u Splitu, na državnom u Zagrebu (žiri i publika), na međunarodnom u Velikoj Britaniji osvojila je drugo mjesto od žirija i prvo mjesto od publike.

Od 2012. godine zaposlena je kao asistentica na Kemijsko-tehnološkom fakultetu (KTF) Sveučilišta u Splitu pri Zavodu za biokemiju. 2013. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij Farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Po zaposlenju na KFT-u surađivala je na projektu Ministarstva znanosti i obrazovanja „Antioksidacijski sastojci i inhibitori kolinesteraza iz aromatičnog bilja“ (šifra 011-2160547-1330) pod vodstvom prof.dr.sc. Mladena Miloša. Trenutno surađuje na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Istraživanje bioaktivnih spojeva iz dalmatinskog bilja: njihov antioksidacijski karakter i utjecaj na enzimsku inhibiciju i zdravlje“ (šifra 6897, BioActCom).

Održala je niz znanstveno-popularnih predavanja na Danima kreativnosti i inovativnosti u Zagrebu, na Festivalima znanosti u Splitu i Sinju. Popularizirala je kemiju radionicama u školama i na Znanstvenom pikniku u Zagrebu u sklopu projekata Hrvatskog kemijskog društva i projekta MZOS-a Znanstvena školica.

Članica je Hrvatskog kemijskog društva, Royal Society of Chemistry te Hrvatskog Farmaceutskog društva.

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova i kongresa. Autor je i koautor više znanstvenih i stručnih radova.

Popis znanstvenih i stručnih članaka:

- Marasović M., Ivanković S., Stojković R., Đermić D., Galić B., i Miloš M. (2017)
In vitro and in vivo antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32 (2017), str. 1299-1304, doi:10.1080/14756366.2017.1384823
- Marasović M., Marasović T., Galić B. i Miloš M. (2017). Quantum Chemical and Biochemical Study on Antioxidant Properties of Halogenated Boroxine $K_2[B_3O_3F_4OH]$. *Croatica chemica acta*, 90 (2017), 2; str.155-161, doi:10.5562/cca3140
- Marasović M., Marasović T., Miloš M. (2017). Robust Nonlinear Regression in Enzyme Kinetic Parameters Estimation. *Journal of Chemistry*, 2017 (2017), str. 1-12 doi:10.1155/2017/6560983
- Ivanković S., Stojković R., Galić Z., Galić B., Ostojić J., Marasović M. i Miloš M. (2015). In vitro and in vivo antitumor activity of the halogenated boroxine dipotassium-trioxohydroxytetrafluorotriborate ($K_2[B_3O_3F_4OH]$). *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 30 (2015), 3; str. 354-359, doi:10.3109/14756366.2014.926344
- Jerković I., Marasović M., Marijanović Z., Hazler Pilepić K., Maleš Ž. i Miloš M. (2013). Chemical Composition of *Hypericum richeri* subsp. *grisebachii* Essential Oil from Croatia. *Natural product communications*, 8 (2013), 2; str. 231-233.
- Marasović M., Roščić A., Galić B. i Miloš M. (2017). Determination of antioxidant capacity of selected Boroxines. U: Hájek P., ur., *Proc. of the CBU International Conference on Inovations and Education 2017*. Central Bohemia Univ, Prag, Češka, 2017. str. 1159-1163.
- Marasović M., Čorić Z., Miloš M. i Galić B. (2016). Study of kinetic parameters and possible inhibitory effect on the tyrosinase of the halogenated boroxine dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate $K_2[B_3O_3F_4OH]$. U: Hájek P., ur., *Proc. of the CBU*

International Conference on Inovations in Science and Education 2016. Central Bohemia Univ Prag, Češka, 2016. str. 679-804.

Jerković I., Marasović M., Marjanović Z., Hazler Pilepić K., Maleš Ž. i Miloš M. (2013) Analysis of *Hypericum richeri* VIII. subsp. *grisebachii* (Boiss.) Nyman Essential oil from Croatia. U: Hadžiev A. i Blažeković Z., ur., *XXIII Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera 2013 - Knjiga sažetaka (Book of Abstracts)*. Zagreb: HDKI/Kemija u industriji, 2013.

Modrić A., Burčul F., Marasović M., Ostojić J., Galić B. i Miloš M. (2014) A study of the inhibition of butyrylcholinesterase by dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate $K_2[B_3O_3F_4OH]$. U: Kakurinov V., ur., *7th Central European Congress on Food – CEFood*. Skopje: Consulting and Training Center KEY, 2014. str. 91-92.

Marasović M., Miloš M., Stojković R. i Ivanković S. (2018) Dietary intake and antitumour preventive properties of 2, 4, 6-trifluorophenylboronic acid in mice: Some results and prospects. U: *6th Food Safety Congress*. Istambul: 6th Food Safety Congress, 2018. 0096, 1

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorska disertacija

Biološka aktivnost odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata

MAJA MARASOVIĆ

Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, Hrvatska

SAŽETAK

Boronične kiseline su spojevi u kojima je trovalentni borov atom povezan s jednom alkilnom ili arilnom skupinom te dvije hidroksilne skupine. Zanimljive su za istraživanje zbog malih molekulskih masa, termičke stabilnosti, niske toksičnosti, blage kiselosti te inertnosti u doticaju s vodom i kisikom. Djeluju kao izvrsni reaktanti, ali pokazuju i jaku bioaktivnost, što im je posljednjih godina priskrbilo podosta pozornosti. Boronične kiseline stvaraju nekoliko derivata, čija su svojstva, unatoč povećanom interesu, do danas još razmjerno neistražena.

U okviru ove doktorske disertacije provedeno je prvo opsežno usporedno istraživanje bioloških učinaka odabranih boroničnih kiselina i njihovih derivata: fenilboronične kiseline, 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline, trimetil boroksina, trimetoksi boroksina i dikalijevotrioksotetrafluorotriborata, te validacija njihovog inhibitorynog djelovanja na izdvojene enzime: butirilkolinesterazu, tirozinazu, heksokinazu, laktat-dehidrogenazu i piruvat-kinazu. Citotoksični i antitumorski učinci ispitani su na tumorskim staničnim kulturama 4T1 mišjeg adenokarcinoma dojke, B16F10 mišjeg melanoma i SCCVII mišjeg karcinoma pločastih stanica kože. Svi ispitivani spojevi, s izuzetkom 2,4,6-trifluorofenil boronične kiseline, uzrokovali su značajno smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica u in vitro testovima, dok su u in vivo uvjetima znatno usporili njihov rast. U istraživanjima inhibitorynog djelovanja, bolje učinke polučili su derivati s boroksinim prstenom, posebice dikalijevotrioksotetrafluorotriborat i trimetoksi boroksin, u odnosu na ispitivane boronične kiseline. Antioksidacijska aktivnost ispitana je primjenom tri različite spektrofotometrijske metode, pri čemu su svi ispitivani spojevi pokazali zanemarivu djelotvornost.

Ostvareni rezultati upućuju na zaključak kako kod ispitivanih boroničnih kiselina i njihovih derivata postoji izvjesni biomedicinski potencijal te predstavljaju temelj za daljnja istraživanja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 168 stranica, 47 grafičkih prikaza, 17 tablica i 203 literaturnih navoda.
Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: boronične kiseline, boroksini, citotoksičnost, antitumorski učinci, enzimski inhibicija, antioksidacijska aktivnost

Mentori: **prof. dr. sc. Mladen Miloš**, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet
prof. dr. sc. Karmela Barišić, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ocjenjivači: **prof. dr. sc. Branka Zorc**, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
prof. dr. sc. József Petrik, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

Rad prihvaćen: 15. svibnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

Bioactivity of selected boronic acids and their derivatives

MAJA MARASOVIĆ

University of Split, Faculty of Chemistry and Technology, Split, Croatia

SUMMARY

Boronic acids are compounds in which trivalent boron atom is connected with one alkyl or aryl and two hydroxyl groups. They are interesting due to their low molecular masses, their thermal stability, low toxicity, mild acidity and inertness to water and oxygen. The fact that they act as excellent reactants and exhibit strong bioactivity brought them a great deal of attention in recent years. Boronic acids form several derivatives which, despite growing interest, still remain relatively unexplored.

This doctoral thesis represents the first comprehensive comparative study carried out to elucidate the biological effects of selected boronic acids and their derivatives: phenylboronic acid, 2,4,6-trifluorophenyl boronic acid, trimethylboroxine, trimethoxyboroxine and dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate, and to assess their inhibitory activity on isolated enzymes: butyrylcholinesterase, tyrosinase, hexokinase, lactate dehydrogenase and pyruvate kinase. Cytotoxic and antitumor effects were examined using 4T1 mammary carcinoma, B16F10 mouse melanoma and SCCVII squamous cell carcinoma cell lines. With exception of 2,4,6-trifluorophenyl boronic acid, all selected compounds have significantly reduced the tumor cell viability in vitro, and have greatly slowed their growth in vivo. When it comes to the inhibitory effects, better results were yielded by derivatives with the boroxine ring - particularly, dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate and trimethoxyboroxine - in comparison to the selected boronic acids. Antioxidant activity was studied using three different spectrophotometric methods where all of the selected compounds demonstrated negligible effectiveness.

Considering the results, it may be suggested that selected boronic acids and their derivatives possess certain biomedical potential that should be thoroughly investigated.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

Thesis includes: 168 pages, 47 figures, 17 tables and 203 references. Original is in Croatian language.

Keywords: boronic acids, boroxines, cytotoxicity, antitumor effects, enzyme inhibition, antioxidant activity

Supervisors: **Mladen Miloš, Ph.D.**, Full Professor, University of Split, Faculty of Chemistry and Technology.
Karmela Barišić, Ph.D., Full Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Branka Zorc, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
József Petrik, Ph.D., Full Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Melita Šalković-Petrišić, Ph.D., Full Professor, University of Zagreb, School of Medicine

The thesis was accepted: May 15th, 2019.

9. PRILOG

Prilog sadrži dva znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenim u bazi Current Contents koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

- Marasović M., Marasović T., Galić B. i Miloš M. (2017). Quantum Chemical and Biochemical Study on Antioxidant Properties of Halogenated Boroxine $K_2[B_3O_3F_4OH]$. *Croatica chemica acta*, 90 (2017), 2; str.155-161, doi:10.5562/cca3140
- Marasović M., Ivanković S., Stojković R., Dermić D., Galić B., i Miloš M. (2017) In vitro and in vivo antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32 (2017), str. 1299-1304, doi:10.1080/14756366.2017.1384823

Quantum Chemical and Biochemical Study on Antioxidant Properties of Halogenated Boroxine $K_2[B_3O_3F_4OH]$

Maja Marasović,¹ Tea Marasović,^{2,*} Borivoj Galić,³ Mladen Miloš¹

¹ Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

² Faculty of Electrical Engineering, Mechanical Engineering and Naval Architecture, University of Split, Ruđera Boškovića 32, 21000 Split, Croatia

³ Faculty of Science, University of Sarajevo, Zmaja od Bosne 33-35, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

* Corresponding author's e-mail address: tmarasov@fesb.hr

RECEIVED: April 14, 2017 * REVISED: June 5, 2017 * ACCEPTED: June 13, 2017

THIS PAPER IS DEDICATED TO PROF. MIRJANA METIKOŠ-HUKOVIĆ ON THE OCCASION OF HER 80TH BIRTHDAY

Abstract: The boron heterocyclic compound dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate, $K_2[B_3O_3F_4OH]$ has been listed as a promising new therapeutic for the epidermal changes treatment. In order to elucidate its free radical scavenging activity, several appropriate thermodynamic molecular descriptors were calculated with the help of quantum-chemistry methods and their values were compared with the data obtained for ascorbic acid, trimethylboroxine and trimethoxyboroxine. Considering the results, it may be suggested that the single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT) is more favourable reaction pathway than hydrogen atom transfer (HAT) for the halogenated boroxine $K_2[B_3O_3F_4OH]$. Experimental support is provided by evaluating the *in-vitro* antioxidant activity of the investigated compounds in terms of their ferric-reducing antioxidant power (FRAP). Our study reveals that all three examined boroxines are extremely weak antioxidants.

Keywords: halogenated boroxine, molecular modelling, antioxidant activity, reaction mechanism, FRAP.

INTRODUCTION

THE interest in boron-containing compounds has spurred over the last 20 years. Boron has an empty p-orbital, which makes it highly reactive toward nucleophiles, in the attempt to attain a stable octet configuration. Particularly, boronic acids have been studied due to their low molecular masses, their thermal stability, low toxicity, mild acidity and inertness to water and oxygen.^[1] They act as excellent reactants and exhibit strong bioactivity. Boronic acids form several derivatives that remain relatively unexplored. Boroxines are boronic acid anhydrides, consisting of 6-membered, heterocyclic compounds composed of alternating oxygen and singly hydrogenated boron atoms.^[2] Due to their unique electron configurations, boroxines react readily with Lewis basis and are potentially selective enzyme inhibitors. They have the ability to bind to the active sites of enzymes and thus, prevent the catalytic reactions.^[3] Previous *in vivo* and *in*

vitro studies have revealed that boronic acids and their derivatives possess anticancer, antibacterial and antiviral properties.^[4,5,6] It is known that modified dipeptidyl boronic acid is present as trimeric boroxine in a chemotherapeutic agent for treatment of multiple myeloma, bortezomib (Velcade®).

Recently, halogenated boroxine (dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate, $K_2[B_3O_3F_4OH]$) has attracted much attention as a promising novel therapeutic for prevention and/or treatment of benign and malignant skin lesions.^[7,8] Furthermore, this compound displays some interesting properties that open up the possibility of its application in future conventional, medical, dermatological and cosmetic formulations. Halogenated boroxine $K_2[B_3O_3F_4OH]$ is highly soluble in water, which could facilitate the production of pharmaceutical compositions. This solubility contributes to its high bioavailability, with effective absorption at the site of administration on the skin. Haverić *et al.* have examined the cytotoxic, genotoxic and

cytostatic effects of $K_2[B_3O_3F_4OH]$ on human lymphocyte cultures and antiproliferative effect on basal cell carcinoma culture.^[9] A different group of authors analysed the *in vivo* genotoxic effects of $K_2[B_3O_3F_4OH]$ on BALB/c mice – an inbred albino research mouse strain^[10] – by applying reticulocytes micronucleus assay.^[11] Both of these studies have confirmed that exposure to $K_2[B_3O_3F_4OH]$ in tested concentrations is not harmful to human or mammalian health. Few other studies addressed the impact of $K_2[B_3O_3F_4OH]$ on inhibition of enzymes associated with hypothesized anti-cancer properties.^[12] It has been reported that halogenated boroxine $K_2[B_3O_3F_4OH]$ inhibits catalase activity and human carbonic anhydrases.^[13,14] Ivanković *et al.* have determined that $K_2[B_3O_3F_4OH]$ has a strong *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity, comparable to that of well-known anti-cancer drug, 5-fluorouracil.^[15] In addition, Pojskić *et al.* observed that treatment with $K_2[B_3O_3F_4OH]$ induces a significant decrease of cell viability in melanoma cell line at concentrations of 0.1 and 1 mM and causes deregulation of more than 30 genes known as common antitumor drug targets.^[16]

This paper estimates the antioxidant activity of the halogen boroxine $K_2[B_3O_3F_4OH]$ (DPTFTB). To the best of our knowledge, this is the first study dealing with radical-scavenging potential of the specified compound. In the absence of knowledge about the action mechanism of $K_2[B_3O_3F_4OH]$ as free radical scavenger, we have decided to study it using both theoretical and experimental approach. The theoretical framework comprises several descriptors estimated with the help of quantum-chemical calculations. The computed values are compared with the data obtained for the well-known antioxidant – namely, the ascorbic acid (ASCAD) – and the two relatively simple, commercially available boroxines, trimethylboroxine (TMHYLB) and trimethoxyboroxine (TMOXYB). Based on the results of comparison, we draw conclusions about the radical scavenging / antioxidant activity of the halogenated boroxine $K_2[B_3O_3F_4OH]$ and relate them to the experimental results produced using ferri-reducing antioxidant potential (FRAP) assay.

EXPERIMENTAL

Theoretical Approach

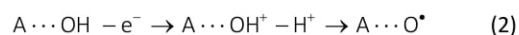
Antioxidants can deactivate free radicals through three main reaction mechanisms: direct hydrogen atom transfer (HAT), single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT or ET-PT) and sequential proton loss electron transfer (SPLET).^[17–19]

In the HAT mechanism, the hydrogen atom of OH group is transferred from antioxidant to active radical, which is neutralized, while the antioxidant itself becomes a

radical:

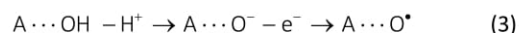


The SET-PT mechanism is a two-step reaction. The first step is the electron transfer from antioxidant to active radical, resulting in the formation of a radical cation and an anion. The electron transfer is followed by a proton transfer from radical cation to anion, producing the corresponding neutral radical:



The probability of SET-PT mechanism depends on the antioxidant reduction capability, which cannot be unambiguously determined on purely chemical basis.

The SPLET mechanism occurs when the antioxidant anion is formed upon losing the proton from neutral moiety. The second step is an electron transfer from the resulting anion to the active radical, producing a neutral molecule and an antioxidant radical:



The HAT and SPLET mechanism are only feasible when a dissociable hydrogen atom (or, respectively, a proton) is present. Note that all of the aforementioned mechanisms address only the formation of the stable radical intermediate, $A-O^{\bullet}$ and do not account for its later fate that can involve any number of subsequent transformations.

The ideal chemical structures to scavenge free radicals combine the tendency to donate a hydrogen atom or an electron from the hydroxyl groups of the compound with the expanded ring system to delocalize an unpaired

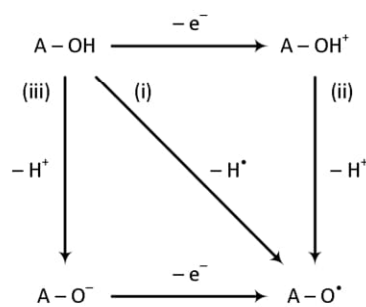


Figure 1. The main radical scavenging reaction mechanisms: (i) HAT, (ii) SET-PT and (iii) SPLET.

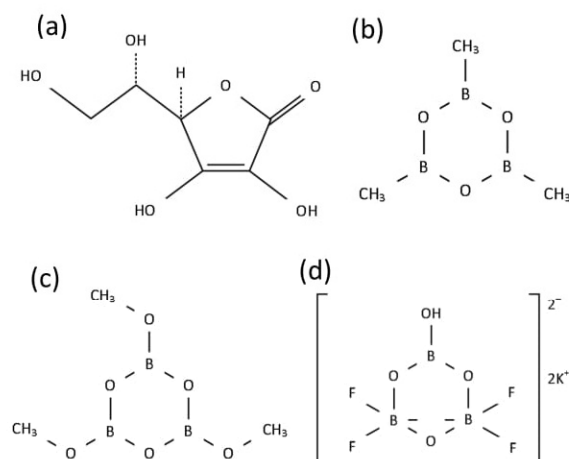


Figure 2. Molecular structures of tested compounds: (a) ascorbic acid, (b) trimethylboroxine, (c) trimethoxyboroxine, (d) dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate.

Table 1. Chemical and physical properties of the selected compounds.

Property	ASCACD	TMHYLB	tMOXYB	DPTFTB
Formula	C ₆ H ₈ O ₆	C ₃ H ₉ B ₃ O ₃	C ₃ H ₉ B ₃ O ₆	K ₂ [B ₃ O ₃ F ₄ OH]
Form	powder	liquid	liquid	powder
Colour	white	colourless	colourless	white
Molar mass / g mol ⁻¹	176.12	125.53	173.50	251.60
Density / g cm ⁻³	1.694	0.898	1.195	unknown
Melting point / °C	193	-38	10	unknown
Solubility	water, ethanol	water, ethanol	water, ethanol	water
Commercial available	yes	yes	yes	no

electron.^[20] Based on its structure, as shown in Figure 2, it is obvious that K₂[B₃O₃F₄OH] meets both of these demands, which leads us to assume that it might have a strong antioxidant potential. The other two boroxines included in this study - trimethylboroxine and trimethoxyboroxine - do not possess a hydroxyl group and in their case, providing that they do act as antioxidants, the reaction mechanism is most likely carried out through formation of the unstable carbanion intermediate. The boron atoms in these compounds form three single, stable, covalent bonds with three valence electrons and as such are not expected to participate in the electron transfer. Halogenated boroxine K₂[B₃O₃F₄OH] molecule displays some unique behaviour due to the existence of 4 severely electronegative fluorine atoms bounded to the two boron atoms. To form these bonds, boron atoms presumably need to activate their

valence electrons from the inner shell, close to the nucleus. This phenomenon affects the number and the delocalization of unpaired electrons over the entire molecule and results in the local bond configuration change from trigonal sp² to tetrahedral sp³ hybridization.

Energy requirement computations for each mechanism may help us identify which radical scavenging mechanism, responsible for the antioxidant reaction, is preferable under certain conditions. The HAT mechanism is characterized by the homolytic bond dissociation enthalpy (BDE) of the OH group. A lower BDE values is usually attributed to a greater ability of the hydroxyl group to donate a hydrogen atom which indicates better antioxidant properties. BDE can be calculated using the following equation:

$$\text{BDE} = H(\text{A} \cdots \text{O}^{\bullet}) + H(\text{H}^{\bullet}) - H(\text{A} \cdots \text{OH}) \quad (4)$$

where $H(\text{A} \cdots \text{O}^{\bullet})$ is the enthalpy of the radical, $H(\text{H}^{\bullet})$ is the enthalpy of the hydrogen atom and $H(\text{A} \cdots \text{OH})$ is the enthalpy of the neutral compound.

Thermodynamical parameters that describe SET-PT mechanism are adiabatic ionisation potential (AIP) in the first step and proton dissociation enthalpy (PDE) in the second step. The molecules with low AIP and PDE values are more susceptible to ionization and have stronger antioxidant properties. These parameters can be computed as follows:

$$\text{IP} = H(\text{A} \cdots \text{OH}^+) + H(\text{e}^-) - H(\text{A} \cdots \text{OH}) \quad (5)$$

where $H(\text{A} \cdots \text{OH}^+)$ is the enthalpy of the radical cation, $H(\text{e}^-)$ is the enthalpy of the electron and $H(\text{A} \cdots \text{OH})$ is the enthalpy of the neutral compound.

$$\text{PDE} = H(\text{A} \cdots \text{O}^{\bullet}) + H(\text{H}^+) - H(\text{A} \cdots \text{OH}^+) \quad (6)$$

where $H(\text{A} \cdots \text{O}^{\bullet})$ is the enthalpy of the radical, $H(\text{H}^+)$ is the enthalpy of the proton and $H(\text{A} \cdots \text{OH}^+)$ is the enthalpy of the radical cation.

Finally, proton affinity (PA) and electron transfer enthalpy (ETE) are quantitative descriptors related to SPLET mechanism:

$$\text{PA} = H(\text{A} \cdots \text{O}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{A} \cdots \text{OH}) \quad (7)$$

where $H(\text{A} \cdots \text{O}^-)$ is the enthalpy of the anion, $H(\text{H}^+)$ is the enthalpy of the proton and $H(\text{A} \cdots \text{OH})$ is the enthalpy of the neutral compound.

$$\text{ETE} = H(\text{A} \cdots \text{O}^{\bullet}) + H(\text{e}^{-}) - H(\text{A} \cdots \text{O}^{-}) \quad (8)$$

where $H(\text{A} \cdots \text{O}^{\bullet})$ is the enthalpy of the radical, $H(\text{e}^{-})$ is the enthalpy of the electron and $H(\text{A} \cdots \text{O}^{-})$ is the enthalpy of the anion.

Apart from these descriptors, the other informative quantities that are more closely associated with electron-donor capabilities of the molecule are HOMO and LUMO energies. E_{HOMO} is the energy of the highest occupied molecular orbital. It represents the initial energy required to release an electron from the compound. The compounds with higher HOMO energy values have better ability to donate an electron during interaction with free radicals.^[21,22] In other words, the compound has a positive relation with the antioxidant activity. E_{LUMO} is the ionization energy of the lowest unoccupied molecular orbital, *i.e.* the amount of energy launched when an electron is absorbed by a molecule. The energy difference between the HOMO and LUMO orbital determines the chemical reactivity of the molecule. The larger the gap between HOMO and LUMO orbital, the more kinetically stable and less chemically active antioxidant the compound is.

The theoretical values were obtained using the Spartan program package.^[23] All the examined compounds were drawn and pre-optimized by applying the molecular mechanic method using MM⁺ force field.^[24] The optimization of the geometry was adopted using the semi-empiric method AM1 (Austin Model 1).^[25] The options designated in the optimization process - such as total charge and multiplicity - were as follows: charge 0 and singlet for closed shell species, charge 0 and doublet for radical species, charge -1 and singlet for the anionic species and charge 1 and doublet for the cationic species.^[26] Due to its unique structure, the $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$ geometry was optimized using a special set of parameter values: charge -2 and triplet for closed shell species, charge -2 and quartet for radical species, charge -3 and triplet for the anionic species and charge -1 and quartet for the cationic species. The ground-state equilibrium geometries were optimized at the restricted Hartree-Fock level of theory and the optimization of the corresponding radical anion and radical cation geometries was performed with unrestricted open shell Hartree-Fock level of theory.^[27] For the species having more conformers, all conformers were investigated. The conformer with the lowest electronic energy was used in this work.

Experimental Setup

The *in vitro* antioxidant activity of the three examined boroxine compounds was evaluated in terms of their ferric-reducing antioxidant power (FRAP), which were compared with a standard antioxidant. FRAP assay is a simple, quick

and inexpensive test that is frequently used to measure total antioxidant capacity in the wide variety of biological samples and pure compounds. The principle is based on the reduction of ferric(III) tripyridyltriazine (TPTZ) complex to ferrous form that can be monitored by measuring the change of absorption at 593 nm. The reaction is reproducible and linearly related to the molar concentration of the electron-donating antioxidant present in the reaction mixture.

All commercially available chemicals and reagents were supplied by Sigma-Aldrich, Merck, Germany. The halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$ was synthesised in the Laboratory of Physical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Sarajevo, Bosnia and Hercegovina, through a simple reaction between potassium bifluoride KHF_2 and boric acid in the 2 : 3 ratio, as reported in literature.^[28] All the measurements were carried out on the Specord 200 Plus spectrophotometer.

FRAP assay was performed according to the method of Benzie and Strain with slight modifications.^[29] The stock solutions included 300 mM acetate buffer (3.1 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and 16 mL $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), pH 3.6, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) solution in 40 mM HCl and 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution. The FRAP working solution was freshly prepared each time by mixing 25 mL acetate buffer, 2.5 mL TPTZ and 2.5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. 0.075 mL of sample solutions at different concentrations (0.1, 0.5, 1, 5 and 10 mM) were added to 2.25 mL of FRAP reagent and mixed well. Each concentration was measured in three replicates and the mean values were calculated. The absorbance readings were taken at 595 nm at $t = 0$ and after 30 minute incubation at 37°C in darkness. Aqueous solutions of known Fe(II) concentration ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) were utilized to generate a calibration curve using a similar procedure. The FRAP values were expressed as the concentration of the compound having a ferric-reducing ability equivalent to that of 1 mM of iron(II) sulphate and compared with ascorbic acid. FRAP working solution instead of a sample was used as a blank.

RESULTS AND DISCUSSION

Quantum Chemical Studies

All the computed enthalpies for the four investigated compounds are presented in Table 2. In the calculations, the following vacuum enthalpy values of proton, electron and hydrogen atom were employed: $H(\text{H}^+) = 0.00236$ Ha (*i.e.* Hartree), $H(\text{e}) = 0.20043$ Ha and $H(\text{H}^{\bullet}) = -0.49764$ Ha.

The data in Table 2 reveals that BDE value of halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$ is lower than the corresponding BDE values of trimethylboroxine and

Table 2. Thermodynamical quantities relevant for anti-oxidant mechanisms of selected compounds, all in kJ mol^{-1} .

Compound	HAT	SET-PT		SPLET	
	BDE	IP	PDE	PA	ETE
ASCACD	304.30	924.33	-294.65	-213.44	762.61
TMHYLB	697.85	1139.49	-415.75	89.13	741.34
TMOXYB	628.35	1115.37	-408.24	116.75	731.22
DPTFTB	499.40	308.75	-367.56	762.36	1474.31

Calculated enthalpies regard to the most stable conformation of the corresponding radical.

trimethoxyboroxine by 198.45 and 128.95 kJ mol^{-1} , respectively. This can be explained by the fact that the C–H bonds present in trimethyl- and trimethoxyboroxine are weaker than O–H bond in $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$. Among the four examined compounds, ascorbic acid exhibited the lowest BDE value (304.3 kJ mol^{-1}), indicating that the HAT mechanism is the most favourable in this molecule. Generally, our results have shown that the BDE values of the currently studied species increase in the order $\text{ASCACD} < \text{TMOXYB} < \text{TMHYLB}$.

The IP values, characterising the first step in the SET-PT mechanism, have been found to increase in the order $\text{DPTFTB} < \text{ASCACD} < \text{TMOXYB} < \text{TMHYLB}$. From this ranking, it can be concluded that halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$ exhibits the greatest electron transfer capability, while trimethylboroxine shows the least electron transferability. The trend in the PDE values of the compounds studied is opposite to that of the IP values. Note that the PDE values for ascorbic acid ($-294.65 \text{ kJ mol}^{-1}$), trimethylboroxine ($-415.75 \text{ kJ mol}^{-1}$) and trimethoxyboroxine ($-408.24 \text{ kJ mol}^{-1}$) are all negative, which suggests that the proton transfer process of their cation radicals is exothermic.

The PA values, related to the SPLET mechanism, can be classified in the order $\text{ASCACD} < \text{TMHYLB} < \text{TMOXYB} < \text{DPTFTB}$. As a general observation, the PA values for the compounds studied are higher than their PDE values, which can be attributed to the high reactivity of the cationic radicals. The only exception to this trend is the ascorbic acid, which has roughly the same PA and PDE values. Table 2 also shows that, apart from the halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$, the ETE values of the examined compounds are significantly lower than their corresponding IP values.

Thermodynamical favourableness of the particular antioxidant mechanism can be estimated on the basis of enthalpy values describing the first step of each mechanism. More specifically, the lowest enthalpy value indicates the most probable reaction pathway. To facilitate the comparisons, BDE, IP and PA values for all the compounds studied in this paper were plotted on the same

Table 3. Energy levels (in eV) of the examined compounds.

Compound	E_{HOMO}	E_{LUMO}	ΔE
ASCACD	-10.54	-5.48	5.06
TMHYLB	-10.09	-0.76	9.33
TMOXYB	-9.58	5.39	14.97
DPTFTB	-3.11	7.78	10.45

axes, as illustrated in Figure 3. From this figure, it is evident that the preferred mechanism for the ascorbic acid, trimethyl- and trimethoxyboroxine is the SPLET, since each of these compounds exhibits notably lower PA than the BDE and IP values. These results are in agreement with those reported in literature, confirming that SPLET is the predominant mechanism of antioxidant activity for ascorbic acid.^[30] On the other hand, in case of the halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$, the most plausible mechanism of radical scavenging reaction is SET-PT, since its BDE, and particularly PA value, is considerably higher than IP, which undoubtedly rules out HAT and SPLET mechanisms. The second most favourable antioxidant mechanism for all the molecules studied is HAT.

The HOMO and LUMO energies are not antioxidant descriptors, but they can be connected to the antioxidant activity of the molecule. The molecular electron-donating ability is strictly correlated with the HOMO energy. Analysis of the computed HOMO orbital energy values in Table 3 reveals that halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$ is characterized with the highest value of this parameter in vacuum. This result is highly compatible with the computed IP values and proves that $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$ has a higher ability to interact with free radicals and scavenge them via SET-PT mechanism. However, all three examined boroxine derivatives exhibit very large HOMO-LUMO gaps (9.33 eV,

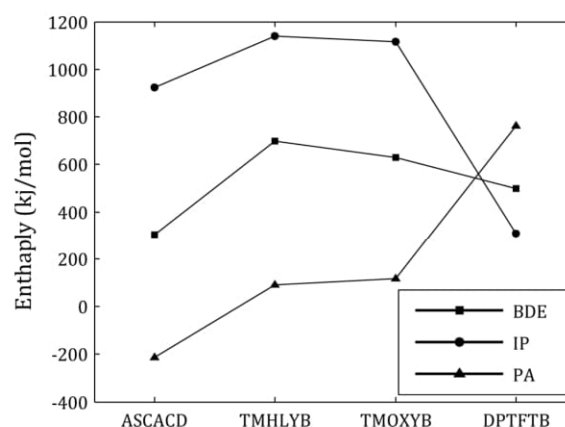
**Figure 3.** Superposition of BDE, IP and PA values for ascorbic acid, trimethylboroxine, trimethoxyboroxine and halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$.

Table 4. Energy levels (in eV) of the examined compounds.

Compound	Inhibition	
	Mean	Std.
ASCACD	201.5646	16.5117
TMHYLB	0.1130	0.0041
TMOXYB	0.0277	0.0007
DPTFTB	0.0680	0.0024

14.97 eV and 10.45 eV, respectively). According to this descriptor, all of these compounds show far less chemical activity against free radical scavenging than ascorbic acid.

Ferric-Reducing Antioxidant Power Assay

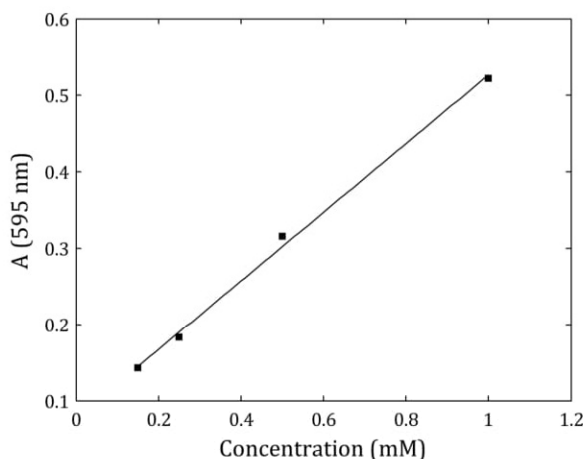
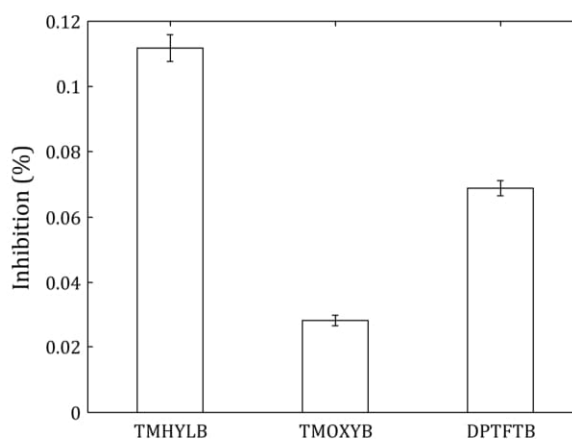
The FRAP assay was employed to estimate the reducing ability of the selected compounds *in vitro*. In this test, the results revealed that a good linearity of ferrous sulphate (FeSO_4) was obtained within the range of 0.15–1 mM ($R^2 = 0.9971$). The regression equation expressing the absorbance of ferrous sulphate standard solution as a function of concentration is:

$$y = 0.4493x + 0.0773 \quad (9)$$

Linearity of FRAP (dose-response curve) for FeSO_4 standard solution is shown in Figure 4. The respective FRAP assay values, calculated from the standard calibration curve using [Eq. (9)], are reported in Table 4.

As it can be seen, three boroxines studied exhibit negligible antioxidant activity, since their FRAP values are few orders of a magnitude lower than FRAP value for ascorbic acid and iron(II) sulphate. Among the three, trimethylboroxine is showing the highest antioxidant power (0.113 %), while trimethoxyboroxine and halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$ are having considerably lesser extent of free radical scavenging power (0.0277 and 0.068 %, respectively). One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test, at $\alpha = 0.05$ level of significance, confirms that there are statistically significant differences between antioxidant powers of the three boroxine compounds studied.

These results are in accordance with the findings of a previous study, conducted using DPPH methodology, which revealed that trimethyl- and trimethoxyboroxine do not scavenge free radicals via electron donation. The same study reported similar results for halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$, providing that at lower concentrations it exhibited slight antioxidant activity (from 0.38 to 0.92 %); whereas at higher concentrations, it showed no antioxidant activity whatsoever.^[31]

**Figure 4.** Ferrous sulphate (FeSO_4) standard curve].**Figure 5.** A comparison of selected boroxine compounds ferric-reducing ability power.

CONCLUSION

Radical scavenging potential is based on the capability of a neutral molecule to generate stable radicals. Quantum-chemical study based on the AM1 / Hartree-Fock method has been performed herein in order to determine the antioxidant activity of three different boroxine derivatives - halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$, trimethylboroxine and trimethoxyboroxine. The usual molecular descriptors BDE, IP, PDE, PA and ETE were used to assess thermodynamical favourableness of forming radicals via certain reaction pathway. Analysis of their values reveals that SPLET is the preferred mechanism of radical scavenging activity for trimethyl- and trimethoxyboroxine. However, in case of the halogenated boroxine $\text{K}_2[\text{B}_3\text{O}_3\text{F}_4\text{OH}]$, the low IP values - considerably lower than BDE and PA values - indicate that the interaction of this compound with active radical most likely follows the SET-

PT mechanism. The BDE values for all three investigated boroxines have been found to be mutually very similar, which shows that all of these compounds have similar ability to react via the HAT mechanism.

On the other hand, large HOMO-LUMO gap values speak in favour of distinctly low chemical reactivity of examined compounds. It should be pointed out that these results are in strong agreement with the corresponding experimental FRAP values, which clearly predict that these compounds are inactive antioxidants. Furthermore, the FRAP values of all three boroxine derivatives studied are few orders of a magnitude smaller than those for ascorbic acid.

Acknowledgment. The work reported in this paper was supported by Croatian Science Foundation research project "Investigation of bioactive compounds from Dalmatian plants: their antioxidant, enzyme inhibition and health properties" (IP 2014096897). The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- [1] D. G. Hall, *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materials*, Wiley, Hoboken, NJ, **2011**, pp. 1–2.
- [2] S. A. Westcott, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 9045.
- [3] A. L. Korich, P. M. Iovine, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1423.
- [4] O. Eidam, C. Romagnoli, E. Caselli, K. Babaoglu, D. T. Pohlhaus, J. Karpiak, R. Bonnet, B. K. Shoichet, F. Prati F, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7852.
- [5] P. C. Trippier, C. McGuigan, J. Balzarini, *Antivir. Chem. Chemother.* **2010**, *20*, 249.
- [6] P. C. Trippier, C. McGuigan, *MedChemComm.* **2010**, *1*, 183.
- [7] B. Galić, *Boroxine composition for removal of skin changes*. Patent US8278289 B2, Issued 2 October **2012**.
- [8] B. Galić, *Removal of skin changes*. Patent EP1996514 B1, Issued 31 July **2013**.
- [9] S. Haverić, A. Haverić, K. Bajrović, B. Galić, M. Maksimović, *Drug Chem. Toxicol.* **2011**, *34*, 250.
- [10] M. Potter in *The Balb/c Mouse: Genetics and Immunology*. Springer, New York, NY, **1985**, pp. 1–5.
- [11] S. Haverić, M. Hadžić, A. Haverić, M. Mijanović, R. Hadžiselimović, B. Galić, *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2016**, *59*, 1.
- [12] M. Hadžić, S. Haverić, A. Haverić, B. Galić, *Biologia* **2015**, *70*, 553.
- [13] S. Islamović, B. Galić, M. Miloš, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *29*, 744.
- [14] D. Vullo, M. Miloš, B. Galić, A. Scozzafava, C. T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2015**, *30*, 341.
- [15] S. Ivanković, R. Stojković, Z. Galić, B. Galić, J. Ostojić, M. Marasović, M. Miloš, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2014**, *30*, 354.
- [16] L. Pojskić Kapur, S. Haverić, N. Lojo-Kadrić, M. Hadžić, A. Haverić, Z. Galić, B. Galić, D. Vullo, C. T. Supuran, M. Miloš, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 999.
- [17] J. S. Wright, E. R. Johnson, G. A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173.
- [18] E. Klein, V. Lukeš, M. Ilčin, *Chem. Phys.* **2007**, *336*, 51.
- [19] G. Litwinienko, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 222.
- [20] J. Dai, R. J. Mumper, *Molecules* **2010**, *15*, 7313.
- [21] K. M. Honório, A. B. F. Da Silva, *Int. J. Quant. Chem.* **2003**, *95*, 126.
- [22] A. N. Quieroz, B. A. Gomes, W. M. Moraes Jr, R. S. Borges, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1644.
- [23] W. Hehre, S. Ohlinger, P. Klunzinger, B. Deppmeier, A. Driessen, J. Johnson, P. Ohsan, *Spartan'14 for Windows, Macintosh and Linux: Tutorial and User's Guide*. Wavefunction Inc, Irvine, CA, **2014**.
- [24] N. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127.
- [25] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
- [26] L. Scotti, M. T. Scotti, K. F. M. Pasqualoto, V. Bolzani, E. I. Ferreira, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19*, 908.
- [27] C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, Wiley, Hoboken, NJ, **2004**.
- [28] I. G. Ryss, M. M. Slutskaya, *Zhur. Fiz. Khim.* **1951**, *22*, 1327.
- [29] I. F. Benzie, J. J. Strain, *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 15.
- [30] S. B. Nimse, D. Pal, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 27986.
- [31] M. Marasović, A. Rošić, B. Galić, M. Miloš, *CBUIIC Int. Conf. Proc. Prague, Czech*, **2017**.

RESEARCH PAPER



In vitro and *in vivo* antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells

Maja Marasovic^a, Sinisa Ivankovic^b, Ranko Stojkovic^b, Damir Djermic^c, Borivoj Galic^d and Mladen Milos^a

^aFaculty of Chemistry and Technology, University of Split, Split, Croatia; ^bDivision of Molecular Medicine, Rudjer Boskovic Institute, Zagreb, Croatia; ^cDivision of Molecular Biology, Rudjer Boskovic Institute, Zagreb, Croatia; ^dFaculty of Science, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

ABSTRACT

The cytotoxic activity of phenylboroxine acid was evaluated *in vitro* on mouse mammary adenocarcinoma 4T1, mouse squamous cell carcinoma SCCVII, hamster lung fibroblast V79 and mouse dermal fibroblasts L929 cell lines. The cytotoxic effects were dose dependent for all tested tumour and non-tumour cell lines. Under *in vivo* conditions, three application routes of phenylboronic acid were studied: intra-peritoneal (i.p.), intra-tumour (i.t.) and per-oral. After tumour transplantation in syngeneic mice, phenylboronic acid was shown to slow the growth of both tumour cell lines (4T1 and SCCVII) compared with the control. The inhibitory effects were pronounced during the application of phenylboronic acid. For both tested tumour cell lines, the most prominent antitumour effect was obtained by intraperitoneal administration, followed significantly by oral administration.

ARTICLE HISTORY

Received 5 June 2017
Revised 19 September 2017
Accepted 21 September 2017

KEYWORDS

Boron; phenylboronic acid; antitumour; 4T1 cells; SCCVII cells

Introduction

Generally, the majority of current cancer treatments control the rapid proliferation of primary tumour cells. However, conventional therapeutics are not sufficiently selective for tumourigenic cells. Damage to normal tissues could be significantly reduced if a potential therapeutic compound selectively impacts tumour cells while avoiding normal, healthy cells¹. Therefore, it is very important to identify highly selective and non-toxic compounds. Baker et al.² described the therapeutic potential of boron-containing compounds and suggested their use as a new class of anticancer agents. Other medicinal chemistry studies have resulted in the commercialisation of peptidylboronic acid antineoplastic drugs, such as Velcade or Bortezomid^{3,4}. In the development of boron-based enzyme inhibitors as potential antitumour drugs, increased targeting specificity limits their side effects⁵. Epidemiological, *in vitro*, and animal studies have revealed possible roles for boric acid as a chemotherapeutic agent^{6–8}. Boric acid is a mild organic Lewis acid with structural features similar to carbon, allowing it to act as a competitive inhibitor for many carbon-containing substrates. A few studies^{9,10} have indicated phenylboronic acid (PBA) as being more potent than boric acid in targeting metastatic and proliferative properties of cancer cells. These studies have shown that PBA can selectively inhibit human prostate and breast cancer cell migration and decrease cancer cell viability. In recent studies^{11,12}, *in vivo* antitumour examinations demonstrated that PBA-enriched nanoparticles have superior efficacy in restricting tumour growth and prolonging the survival time of tumour-bearing mice than free drugs.

These aforementioned studies have indicated the promising direction of studying the effects of PBA inhibition properties on other types of cancer cell lines. Therefore, as part of our project,

“Research on antitumour properties of different derivatives of boronic acid”, we decided to investigate *in vitro* and *in vivo* antitumour effects of PBA against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells. *In vivo* experiments were performed on mice using three modes of administration: intra-peritoneal, intra-tumour and per-oral.

Materials and methods

Tested compound and cell lines

PBA solutions (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) were prepared by dissolution in phosphate buffer (Fisher Chemical, Wien, Austria). Mouse mammary adenocarcinoma 4T1 cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and mouse squamous cell carcinoma SCCVII cell line was obtained from BC Cancer Research Centre (Vancouver, Canada). Both SCCVII and 4T1 murine tumour cells are widely accepted animal models for the investigation of these types of tumours in humans: SCCVII for human head and neck tumours¹³ and 4T1 for human breast adenocarcinomas¹⁴. The syngeneic transplantation model allowed us to test the toxicity of PBA on the same cells *in vivo* and *in vitro*. Cells were grown in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland), in a humidified 5% CO₂, 37°C atmosphere.

Animals and tumour models

The mice used in the study were obtained from Ruđer Bošković Institute's breeding colony. Two mouse strains, BALB/c syngeneic with 4T1 cells and C3H/H syngeneic with SCCVII cells, were used.

CONTACT Mladen Milos  milos@ktf-split.hr  Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Split, Croatia

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The animals were ~3-months-old and weighed 20–23 g. They were provided standard diet (Mucedola S.R.L., Milan, Italy) and tap water *ad libitum*. The animals were kept under conventional conditions: 12/12 h light/dark rhythms, 22 °C temperature and 55% humidity. Animals were treated according to the Animal Welfare Regulations. Each experimental group consisted of seven animals. Mouse tumour models of mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous cell carcinoma SCCVII were established by injecting 5×10^5 tumour cells subcutaneously into the right thighs of syngeneic mice.

All experimental procedures were performed in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals (including the use of the 3Rs procedures). The experiments were terminated before the mean tumour diameter exceeded 15 mm as recommended in the 2010 guidelines for the welfare and use of Animals in cancer research¹⁵.

Determination of cytotoxic activity in vitro

For evaluation of cell viability and cytotoxic effects of PBA on cultured cells, a crystal violet staining assays was used¹⁶. This test only determines living cells at the time of fixation and staining of the examined samples, while the dead cells are removed by washing of cell cultures. Experiments were carried out in 96-well microtitre plates; 1×10^4 tumour cells/250 µl medium were added to each well. After 24 h, when the cells reached confluence, old cultured media were replaced with fresh media. The tested compound PBA was added to the cultures to final concentrations of 0.1, 1.0 and 10.0 mg/ml (0.82, 8.2 and 82.0 mM). Control cells were incubated in RPMI medium without the tested substance. The cells were incubated for an additional 24 h. Cytotoxicity tests with crystal violet were performed to measure cell growth inhibition rates. Briefly, cells were fixed by the addition of a 3% solution of formalin for 15 min, washed with deionised water and dried in air. Afterwards, cells were stained with 0.1% crystal violet for 20 min, then extensively washed with deionised water and left to dry overnight. The dye was extracted from the cells using a 10% solution of acetic acid. Then, absorbance was measured using a microplate reader. The absorbance at 590 nm is proportional to the number of surviving cells. Each experiment was performed in quadruplicate. Inhibition of cell growth relative to controls was calculated according to the formula: inhibition of cell growth $\% = (C - T)/C \times 100$, where T denotes the mean absorbance of treated cells and C indicates the mean absorbance of untreated (control) cells. The LC₅₀ concentrations were estimated using probit analysis^{17,18}.

Tumour treatment and evaluation of antitumour activity in vivo

The treatment was started on Day 9 after transplantation, when tumour volumes reached ~250–300 mm³. For both experiments (cell lines 4T1 and SCCVII), mice were randomly divided into four groups (seven mice per group). Three application routes of PBA were studied: intra-peritoneal (i.p.), intra-tumour (i.t.) and per-oral. Briefly, 300 µl saline with a PBA dose of 100 mg/kg of mice (average body weight of 20–23 g) were administered once a day for nine consecutive days starting from Day 10. The total received dose was 900 mg/kg of mice for each mode of administration. Control mice received the same volumes of saline without PBA. The dosage regimen applied in this study was well-tolerated by the animals with no signs of overtotoxicity, i.e. the animals were generally in good condition and did not show significant weight loss. Available literature has also suggested low toxicity

of boron-containing acids, including PBA. Thus, in mice, a high LD₅₀ dose of 900 mg/kg for acute toxicity was determined¹⁹. The dose used in our study (100 mg/kg) was nine time lower than the LD₅₀ dose.

Tumour growth was observed by measuring three orthogonal tumour diameters (A, B, and C) with a calliper. Tumour volume was calculated by the formula $V = ABC\pi/6$. The inhibition of tumour growth was calculated by the formula: TGI (%) = $(C - T)/C \times 100$, where C is the mean tumour volume of the control (untreated) group, and T is the mean tumour volume of the treated groups. Significant differences in tumour volumes between the groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test of multiple comparisons. $p \leq .05$ was considered significant.

Results

Cytotoxic activity in vitro

The cytotoxic activities of PBA at different concentrations 0.1, 1.0 and 10 mg/ml (0.82, 8.2 and 82 mM) were evaluated on mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous cell carcinoma SCCVII cell lines (Figure 1) and on hamster lung fibroblast V79 and mouse dermal fibroblasts L929 cell lines (Figure 2). Generally, the cytotoxic effect of PBA was dose-dependent. In all tested tumour and non-tumour cell lines, 10 mg/ml PBA significantly reduced the number of surviving cells compared with the control group. However, some differences in the sensitivity of cells were observed at 0.1 and 1.0 mg/ml PBA. These concentrations did not significantly affect the growth of the 4T1, V79 and L929 cells; however, 22.0 and 28.1% inhibition were observed for the SCCVII cells. The LC₅₀ values were estimated to be 4.5 and 7.5 mg/ml for the SCCVII and 4T1 cells and 6.0 and 7.5 mg/ml for the L929 and V79 cells, respectively.

Antitumour activity in vivo

Antitumour activity *in vivo* was assessed on the same tumour models as the *in vitro* experiments. Preliminary experiments showed that the intra-peritoneal application of 50 mg/kg of PBA in a single dose was well-tolerated by all mice. The same results were achieved when PBA was applied as a single 50 mg/kg intra-tumoural dose. When PBA was administered per-orally in five consecutive days in five doses of 50 mg/kg, PBA was also well-tolerated by all mice. The effects of intra-peritoneal (i.p.), intra-tumour (i.t.) and per-oral (p.o.) applications of PBA on the growth of squamous cell carcinoma SCCVII is presented in Figure 3. The intraperitoneal and oral applications significantly slowed tumour growth compared with control, whereas no significant delay in tumour growth was observed when PBA was administered intratumourally.

PBA significantly reduced the growth of adenocarcinoma 4T1 in all three modes of administration (Figure 4). The intra-peritoneal application was significantly more effective than the intra-tumour or per-oral applications with a tumour growth inhibition of ~57% compared with control at the end of treatment (Figure 4). Table 1 shows different measured tumour parameters after transplantation of mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells in syngeneic mice and after treatment by PBA with the different administration routes. All parameters clearly show that PBA has antitumour activity in both cell lines, especially when administered intra-peritoneally. The difference in volumes for treated versus control 4T1 tumour after the ninth day of the i.p. treatment was 613 mm³, which represents a 57% tumour growth inhibition and 7 days tumour growth delay.

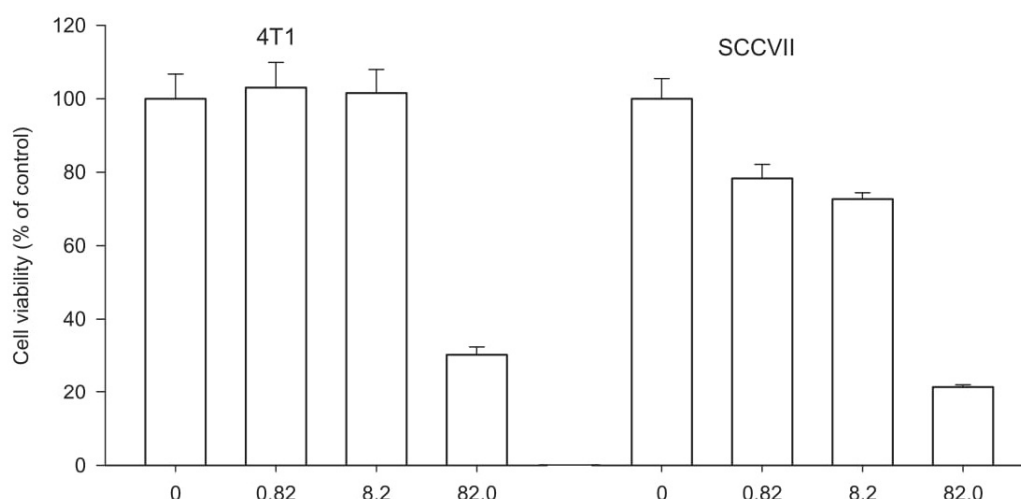


Figure 1. Cytotoxic effect of PBA 0.1, 1.0 and 10 mg/ml (0.82, 8.2 and 82 mM) on mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous cell carcinoma SCCVII. Cells survival rate measured by crystal violet assay. Absorbance at 590 nm is proportional to the number of surviving cells. Each experiment was done in quadruplicate. Inhibition of cell growth I (%) relative to controls was calculated according to the formula: $I = (C - T)/C \times 100$, where T denotes the mean absorbance of treated cells, and C indicates the mean absorbance of untreated cells, without the addition of PBA.

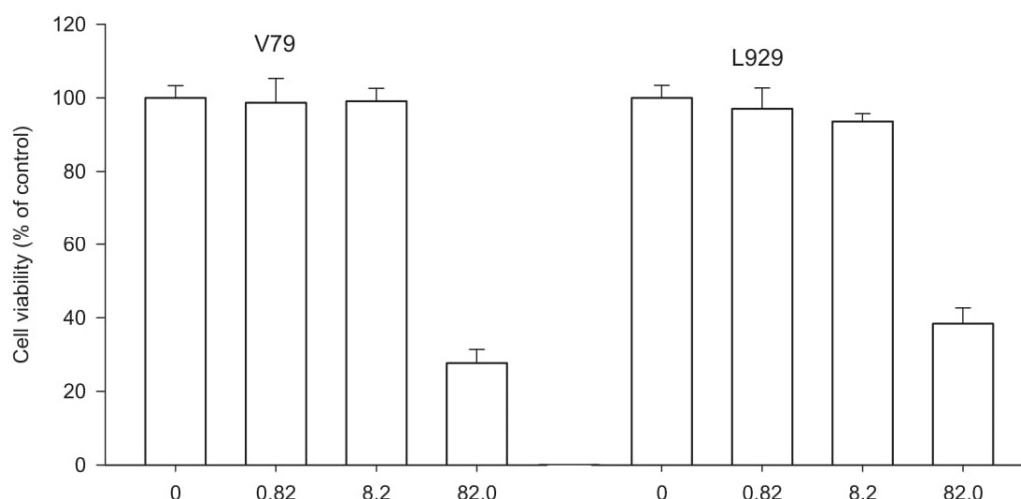


Figure 2. Cytotoxic effect of PBA 0.1, 1.0 and 10 mg/ml (0.82, 8.2 and 82 mM) on hamster lung fibroblast V79 and mouse dermal fibroblasts L929 cell lines. Cells survival rate measured by crystal violet assay. Absorbance at 590 nm is proportional to the number of surviving cells. Each experiment was done in quadruplicate. Inhibition of cell growth I (%) relative to controls was calculated according to the formula: $I = (C - T)/C \times 100$, where T denotes the mean absorbance of treated cells, and C indicates the mean absorbance of untreated cells, without the addition of PBA.

Discussion

This is the first report showing that PBA can inhibit the growth of mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and mouse squamous cell carcinoma SCCVII. The data presented indicated that PBA is capable of inhibiting growth in the selected cell lines *in vitro* and *in vivo* by three modes of administration, i.e. intra-peritoneal, intra-tumour and per-oral. As presented in the previous section, at PBA concentrations <1 mg/ml (8.2 mM), no inhibitions in tumour 4T1 cells *in vitro* were observed. Similar results were observed with non-tumour cells V79 and L929, whereas in tumour SCCVII cells, partial growth inhibition was seen. Significant growth inhibition LC₅₀ values were estimated at 4.5–7.5 mg/ml demonstrating no significant differences in inhibition between tumour cells and non-tumour cells.

Apoptosis is one of the most potent defences against cancer. This process eliminates potentially deleterious mutated cells²⁰ and enables the renewal of normal, healthy cells. The mechanism

whereby PBA inhibits cell growth *in vitro* and *in vivo* remains unknown. The sialic acid is known to be over-expressed on the cell surface of tumour cells and the increasing expression of sialic acid was previously shown on 4T1 cells²¹ and on SCCVII cells²². Since it has been reported that PBA possess high affinity to the sialic acid receptors²³, it suggests that PBA could affect tumour cells via sialic acid receptors.

Previously, PBA had been suggested to act as proteasome inhibitors. The boronic acid motif acts as a transition state analogue, forming hydrogen and covalent bonds in the enzyme active site. For example, the inhibition constants of chymotrypsin at pH 7 for simple PBA were found to be $K_i = 1.96 \times 10^{-4}$ M compared with $K_i = 1.0 \times 10^{-2}$ M of benzyl alcohol, which lacks the boronic acid motif. Evidence suggested that the inhibition activity was due solely to the boronic acid. Slight changes in pH can result in the release of the inhibitor from the active site, enabling the use of boronic acids as biological probes and in therapeutics²⁴. Therefore, we compared *in vitro* and *in vivo* PBA

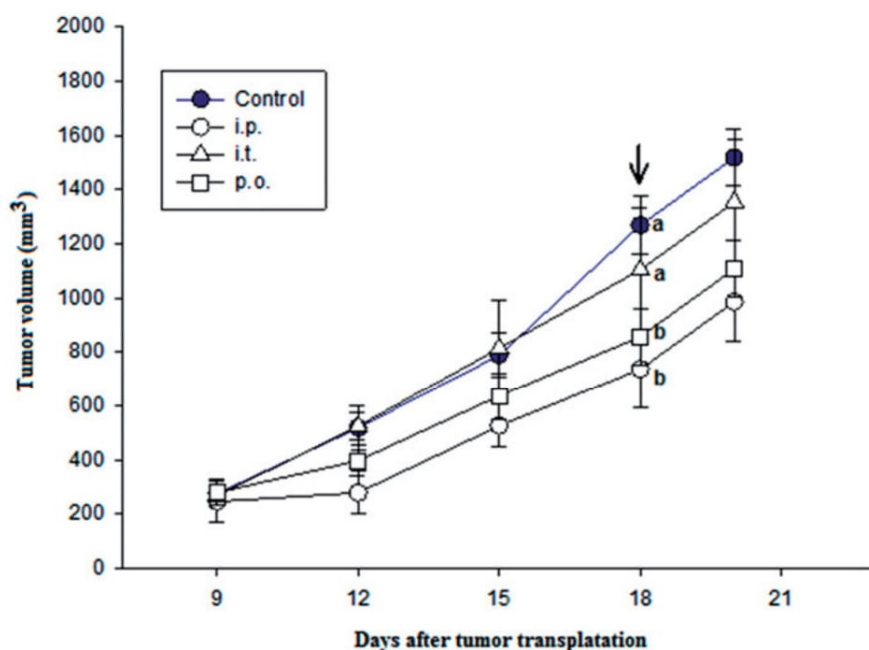


Figure 3. The effect of intra-peritoneal (i.p.), intra-tumour (i.t.) and per-oral (p.o.) application of PBA on the growth of squamous cell carcinoma SCCVII transplanted into mouse thigh. PBA was injected in a dose of 100 mg/kg once a day for nine consecutive days starting from Day 9 after tumour transplantation. Each experimental group consisted of seven animals. Different letters beside the symbols indicate significant differences between the groups ($p < .05$, Tukey's *post hoc* test) at the end of the treatment (arrow).

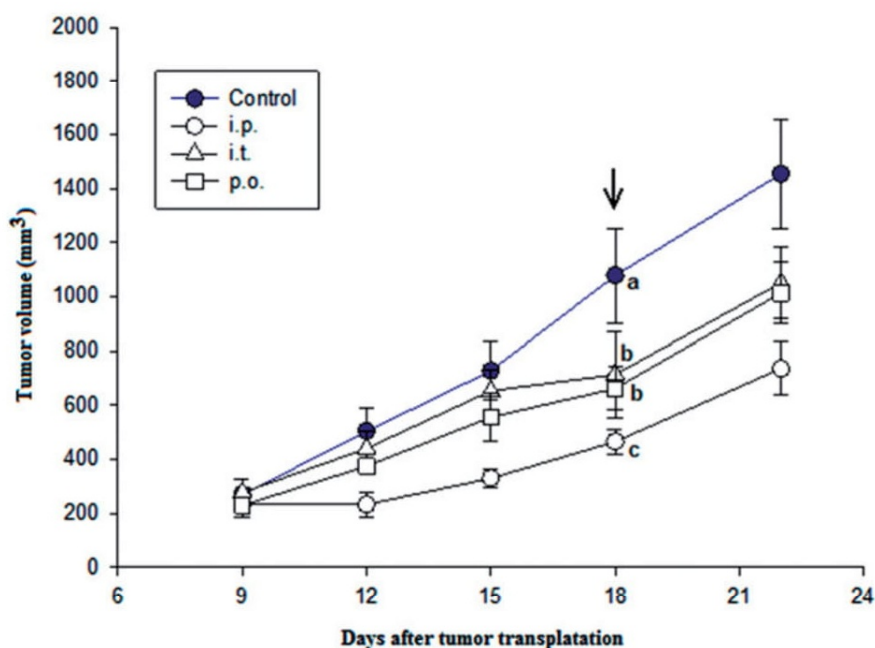


Figure 4. The effect of intra-peritoneal (i.p.), intra-tumour (i.t.) and per-oral (p.o.) application of PBA on the growth of mammary adenocarcinoma 4T1 transplanted into mouse thigh. PBA was injected in a dose of 100 mg/kg once a day for nine consecutive days starting from Day 9 after tumour transplantation. Each experimental group consisted of seven animals. Different letters beside the symbols indicate significant differences between the groups ($p < .05$, Tukey's *post hoc* test) at the end of the treatment (arrow).

antitumour activities using the same tumour cell lines. *In vivo* experiments were performed intra-peritoneally, intra-tumourally and per-orally. With respect to the mode of administration, the results observed were generally similar for both tumour models, i.e. the most pronounced effect was obtained by intraperitoneal administration followed by oral and intratumoural administrations. The remarkable inhibition of tumour growth after oral

administration suggested that PBA is not metabolised after oral administration or that its metabolites have similar antitumour effects. These metabolites, such as arylboronic acids and their esters, could have selectively reacted with H_2O_2 and metabolised the formation of boronate intermediates that rapidly hydrolyse to release phenols, borate esters, and boric acids²⁵. Boronic acids and esters do not appear to have intrinsic toxicity issues; the

Table 1. Tumour parameters after transplantation of mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells in syngeneic mouse and their treatment by PBA in the different administration routes.

Cells	Mode	T ₉ -C ₉ (mm ³)	TGI ₉ (%)	TGD ₇₀₀ (days)
4T1	i.p.	613	57	7
	i.t.	365	34	4
	p.o.	417	39	4
SCCVII	i.p.	532	42	4
	i.t.	164	13	0
	p.o.	411	32	2.5

T₉-C₉: the difference in volumes for treated versus control tumour after ninth day of treatment.

TGI₉%: tumour growth inhibition; $TGI\% = (1 - T/C) \times 100$; where, C is the mean tumour volume of control group and T is the mean tumour volume of treated groups after ninth day of treatment.

TGD₇₀₀: tumour growth delay presents the difference in days for treated versus control tumour to reach a volume 700 mm³.

Mode: i.t. (intra-peritoneal), i.t. (intra-tumour), and p.o. (per-oral).

boric acid end product is considered non-toxic to humans²⁶. However, different prodrugs coupled with an ROS trigger unit have been observed to be triggered by H₂O₂ to release active anticancer drugs (effectors) with selective toxicity towards cancer cells^{27,28}. Therefore, boronic acid could be used to develop novel methods to release pharmacologically active species triggered by high levels of H₂O₂ found in cancer cells²⁹. Such agents have the potential to kill malignant cells while leaving healthy cells relatively untouched. These boronic acids also provide an excellent opportunity to evaluate the feasibility of the ROS-activated pro-drug approach.

Recently, halogenated boroxines, e.g. K₂[B₃O₃F₄OH], have been suggested for use in the prevention and/or treatment of benign or malignant changes in epidermal tissue³⁰. This compound was listed as a promising new therapeutic for cancer diseases. Our previous study³¹ showed that this compound affected the *in vitro* and *in vivo* growth of 4T1 mammary adenocarcinoma, B16F10 melanoma and squamous cell carcinoma SCCVII cells. In previous studies, boronic acid derivative K₂[B₃O₃F₄OH] was hypothesised to reduce catalase³², carbonic anhydrase³³ and horseradish peroxidase³⁴ activity by increasing the concentration of H₂O₂ to produce beneficial effects in tumour tissues alone. Considering these results, the same mode of action for PBA could be suggested but would require further study.

Conclusion

As outlined by Baker et al.², boron compounds could be become widely used in future drug discovery research. Our work showed that PBA proved to be highly cytotoxic on tumour cells and, even after repeated administration in large doses, was well-tolerated by mice. Future work will focus on elucidating the antitumour mechanism of PBA.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was fully supported by the Croatian Science Foundation (Hrvatska Zaklada za Znanost) under project number HRZZ-IP-2014-09-6897.

References

1. Fallowfield LJ. Evolution of breast cancer treatments: current options and quality-of-life considerations. *Eur J Oncol Nurs* 2004;8:75–82.
2. Baker SJ, Ding CZ, Akama T, et al. Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Med Chem* 2009;1:1275–88.
3. Adams J, Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor velcade (bortezomib). *Cancer Invest* 2004;22:304–11.
4. Paramore A, Frantz S. Bortezomib. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:611–2.
5. Hall DG. Boronic acids. New York (NY): John Wiley and Sons; 2005.
6. Barranco WT, Eckhart CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 2004;216:21–9.
7. Barranco WT, Hudak PF, Eckhart CD. Evaluation of ecological and *in vitro* effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2007;18:71–7.
8. Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, et al. Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicol Pathol* 2004;32:73–8.
9. Bradke TM, Hall C, Carper SW, Plopper GE. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adh Migr* 2008;2:153–60.
10. McAuley EM, Bradke TA, Plopper GE. Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell Adh Migr* 2011;5:382–6.
11. Wang X, Tang H, Wang C, et al. Phenylboronic acid-mediated tumor targeting of chitosan nanoparticles. *Theranostics* 2016;6:1378–92.
12. Wang J, Wu W, Jiang X. Nanoscaled boron-containing delivery systems and therapeutic agents for cancer treatment. *Nanomedicine* 2015;10:1149–63.
13. Dasgupta S, Bhattacharya-Chatterjee M, O'Malley BW. Inhibition of NK cell activity through TGF-beta 1 by down-regulation of NKG2D in a murine model of head and neck cancer. *J Immunol* 2005;175:5541–50.
14. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* 2001;20.2:1–15.
15. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 2010;102:1555–77.
16. Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by Neutral red, MTT and Crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol In Vitro* 1998;12:251–8.
17. Finney DJ. Probit analysis. England: Cambridge University Press; 1952.
18. Kim V. Probit analysis. Available from: <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf> [last accessed 6 Apr 2017].
19. Soriano-Ursúa MA, Farfán-García ED, López-Cabrera Y, et al. Boron-containing acids: preliminary evaluation of acute toxicity and access to the brain determined by Raman scattering spectroscopy. *Neurotoxicology* 2014;40:8–15.
20. Reed J. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2941–53.
21. Wang X, Li X, Zeng YN, et al. Enhanced expression of poly-sialic acid correlates with malignant phenotype in breast

- cancer cell lines and clinical tissue samples. *Int J Mol Med* 2016;37:197–206.
22. Shikata F, Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y. *In vitro* cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;53: 57–63.
23. Djanashvili K, Frullano L, Peters JA. Molecular recognition of sialic acid end groups by phenylboronates. *Chemistry* 2005;11:4010–8.
24. Paul C, Trippier PC, McGuigan C. Boronic acids in medicinal chemistry: anticancer, antibacterial and antiviral applications. *Med Chem Commun* 2010;1:183–98.
25. Kuivila HG, Armour AG. Electrophilic displacement reactions. IX Effects of substituents on rates of reactions between hydrogen peroxide and benzenboronic acid. *J Am Chem Soc* 1957;79:5659–62.
26. Yang WQ, Gao X, Wang BH. Boronic acids. In: Hall DG, ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2005:481–512.
27. Kuang Y, Balakrishnan K, Gandhi V, Peng X. Hydrogen peroxide inducible DNA cross-linking agents: targeted anticancer prodrugs. *J Am Chem Soc* 2011;133:19278–31.
28. Hagen H, Marzenell P, Jentzsch E, et al. Aminoferrocene-based prodrugs activated by reactive oxygen species. *J Med Chem* 2012;55:924–34.
29. Peng X, Gandhi V. ROS-activated anticancer prodrugs: a new strategy for tumor-specific damage. *Ther Deliv* 2012;3:823–33.
30. Galic B. Boroxine composition for removal of skin changes. Patent US 8 278 289, USA; 2012.
31. Ivankovic S, Stojkovic R, Galic Z, et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the halogenated boroxine dipotassium-trioxohydroxytetrafluorotriborate $K_2[B_3O_3F_4OH]$. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2015;30:354–9.
32. Islamovic S, Galic B, Milos M. A study of the inhibition of catalase by dipotassium-trioxohydroxytetrafluorotriborate $K_2[B_3O_3F_4OH]$. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2014;29:744–8.
33. Vullo D, Milos M, Galic B, et al. Dipotassium-trioxohydroxytetrafluorotriborate, $K_2[B_3O_3F_4OH]$, is a potent inhibitor of human carbonic anhydrases. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2015;30:341–4.
34. Ostojic J, Herenda S, Galijasevic S, et al. Inhibition of horseradish peroxidase activity by boroxine derivative, dipotassium-trioxohydroxytetrafluorotriborate $K_2[B_3O_3F_4OH]$. *J Chem* 2017;2017:8134350.