

# Određivanje antioksidacijske aktivnosti derivata itakonske kiseline

---

Škarić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:680449>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET**

**DIPLOMSKI RAD**

**LUCIJA ŠKARIĆ**

**ZAGREB, 2021.**

Lucija Škarić

**Određivanje antioksidacijske aktivnosti derivata  
itakonske kiseline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021. godina

Ovaj je diplomski rad prijavljen na kolegiju Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te izrađen u Odjelu za međustaničnu komunikaciju Centra za translacijska i klinička ispitivanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i suvoditeljstvom dr. sc. Marija Matijašića.

*Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić na strpljenju i pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i komentoru dr. sc. Mariju Matijašiću koji mi je svojim znanjem i vještinama pomogao pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala prijateljima i kolegama na bezuvjetnoj pomoći u mojoj avanturi studiranja uz majčinstvo.*

*Najveće hvala mami, tati, sestri i bratu na neizmjernom razumijevanju i podršci koje su mi pružili tijekom cijeloga života. Hvala vam za svu ljubav, savjete, strpljenje i vjerovanje da ja to mogu.*

*Ovaj diplomski rad posvećujem svojoj obitelji, suprugu Andriji i kćeri Anđeli.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. TUMORI .....	1
1.2. LIJEČENJE TUMORA .....	1
1.2.1. ANTIMALARICI KAO KEMOTERAPEUTICI .....	3
1.3. OKSIDACIJSKI STRES.....	3
1.4. OKSIDACIJSKI STRES I NASTANAK RAKA .....	5
1.5. ANTIOKSIDANSI .....	6
1.5.1. VITAMINI .....	7
1.5.2. PEPTIDI I PROTEINI .....	10
1.5.3. ENZIMI .....	11
1.6. TESTOVI ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	12
1.6.1. ORAC METODA .....	13
1.6.2. TRAP METODA.....	13
1.6.3. DPPH METODA .....	14
1.6.4. BIOLOŠKI MODELI ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI .....	15
1.6.5. STANIČNE METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI .....	16
1.7. ITAKONSKA KISELINA.....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	18
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. MATERIJALI.....	19
3.2. METODE.....	21
3.2.1. USPOSTAVA DPPH METODE .....	21
3.2.2. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI SPOJEVA DPPH METODOM .....	23
4. REZULTATI .....	25
4.1. USPOSTAVA DPPH METODE.....	25
4.2. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KONJUGATA ITAKONSKE KISELINE I ANILINA .....	25
4.3. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KONJUGATA ITAKONSKE KISELINE I PIRIDINA .....	26
4.4. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KONJUGATA ITAKONSKE KISELINE I INDOLA .....	27
4.5. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL ANTIMALARIKA KLOROKINA I MEFLOKINA TE KONJUGATA ITAKONSKE KISELINE I PRIMAKINA, KLOROKINA TE MEFLOKINA.....	28
4.6. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL VITAMINA C I TROLOXA .....	29
5. RASPRAVA .....	30

6. ZAKLJUČCI .....	32
7. LITERATURA.....	33
8. SAŽETAK/SUMMARY .....	39

# **1. UVOD**

## **1.1. TUMORI**

Stanice tumora označava disbalans osnovnih staničnih regulacijskih mehanizama, a posljedica toga je njihova nenormalna proliferacija, nekontrolirani rast i dioba. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u organizmu, dok se izraz rak odnosi na zloćudne tumore. Dobročudni (benigni) tumori se ne šire, već ostaju lokalizirani na mjestu gdje su nastali, dok se zloćudni (maligni) premještaju s osnovnog mjesta nastanka na susjedna, zdrava tkiva. Kada se limfnim ili krvožilnim sustavom prošire na ostali dio tijela, kaže se da su metastazirali (Cooper i Hausman, 2004). Normalne, zdrave stanice mogu se pod utjecajem različitih čimbenika, preobraziti u zloćudne tvorevine koje se nekontrolirano dijele (Mintas, 2013). Tumori se kategoriziraju prema vrsti stanica iz kojih nastaju, najčešće u tri glavne skupine: karcinome, sarkome, leukemije ili limfome. Karcinomi su zloćudne bolesti epitelnog tkiva, sarkomi tumori vezivnog ili potpornog tkiva, a leukemije i limfomi nastaju iz krvotvornih stanica i stanica imunosnoga sustava (Cooper i Hausman, 2004).

## **1.2. LIJEČENJE TUMORA**

Liječenje zloćudnih bolesti provodi se primjenom zračenja, kirurškim zahvatima, kemoterapijom i imunoterapijom. Kod sustavno prisutne bolesti, kemoterapija je terapija izbora (Francetić i sur., 2015). Dijelimo ju na primarnu, neoadjuvantnu i adjuvantnu. Bolesnici s diseminiranom bolešću ne mogu se liječiti lokalnom terapijom pa se primjenjuje primarna kemoterapija. Adjuvantna kemoterapija primjenjuje se nakon kirurškog zahvata kako bi se spriječilo moguće širenje bolesti. Neoadjuvantna kemoterapija je način liječenja bolesnika s inicijalno inoperabilnim tumorom, s ciljem da se učini operabilnim (Vrdoljak i sur., 2013).

Antineoplastici su lijekovi koje prema mehanizmu djelovanja možemo podijeliti na one koji djeluju na nukleinske kiseline, enzime povezane sa sintezom i funkcijom DNA (antimetaboliti), ili strukturne proteine te inhibitore signalnih puteva odnosno inhibitore različitih enzima. Citostatici koji djeluju na nukleinske kiseline interkaliraju se u dvostruju uzvojniju DNA pa tako inhibiraju njezinu replikaciju i transkripciju kao i djelovanje helikaza. Inhibiraju topoizomerazu stvaranjem

kompleksa topoizomeraza II-DNA te uzrokuju pucanje DNA uzvojnice (Francetić i sur., 2015). Primjer takvih lijekova su doksorubicin i idarubicin. Poznati su i alkilirajući agensi koji, zahvaljujući svojim alkilirajućim skupinama, tvore kovalentne veze s DNA. Takvu sposobnost imaju: derivati dušikovog iperita (ciklofosamid, ifosfamid), derivati nitrozureje (karmustin) i spojevi platine (cisplatin, karboplatin). Antimetaboliti su strukturni analozi staničnih metabolita koji se ugrađuju u nukleinske kiseline umjesto prirodnih nukleotidnih baza (purina, pirimidina) i sprječavaju katalitičke funkcije određenih enzima. Posljedica je zaustavljanje diobe i umnažanja tumorskih stanica te stanična smrt. Dije se u tri skupine: analozi folne kiseline (metotreksat), analozi pirimidina (fluorouracil, citarabin, gemcitabin, kapecitabin) i analozi purina (merkaptopurin, tiogvanin). Lijekove koji djeluju na tubulin (strukturni protein) možemo nazvati mitotičkim inhibitorima jer djeluju tako da interferiraju sa stvaranjem mikrotubula. Mikrotubuli tvore mitotičko vreteno ključno za odvajanje kromosoma tijekom diobe, a kad je njihovo stvaranje spriječeno, zaustavlja se stanična dioba. U mitotičke inhibitore spadaju vinka alkaloidi (vinkristin, vinorelbin) i taksani (paklitaksel, docetaksel) (Rajić, 2020; Perčić, 2017; Francetić i sur., 2015; Mintas, 2013).

U novije skupine lijekova spadaju inhibitori protein-kinaza. Imatinib je inhibitor Bcr- Abl kinaze i primjenjuje se u liječenju kronične mijeloidne leukemije. Selektivno sprječava proliferaciju i uzrokuje apoptozu *Philadelphia-kromosom* pozitivnih stanica. Postoji još jedna skupina inhibitora protein kinaza, koja je sve učestalija u liječenju lokalno uznapredovalog ili metastatskog raka dojke, a to su selektivni inhibitori ciklin-ovisnih kinaza - ribociklib i palbociklib. Vežu se na kompleks ciklin D-CDK4/6 te tako dovode do zastoja u G1 fazi staničnog ciklusa ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Gefitinib i erlotinib su inhibitori receptora tirozin kinaze za epidermalni čimbenik rasta (EGFR). Lapatinib inhibira djelovanje tirozin kinaze koja eksprimira EGFR i HER2 (humani receptor epidermalnog faktora rasta 2), čija se pojačana ekspresija povezuje s razvojem raka dojke (Francetić i sur., 2015). Postoje i selektivni inhibitori višestrukih tirozin-kinaza, poput sunitiniba i sorafeniba. Temsirolimus je selektivni inhibitor mTOR, koji u tumorskim stanicama dovodi do zastoja u G<sub>1</sub> fazi staničnog ciklusa. Sljedeća skupina su inhibitori VEGF-a, koji imaju važnu ulogu u angiogenezi (Francetić i sur., 2015).

Primjeri imunoterapije su monoklonska protutijela koja se vežu za specifične antigene na površini tumorskih stanica, poput nekih proteina koji nisu prisutni u zdravim, normalnim



stanicama. Potiču imunosni odgovor koji uništava tumorske stanice. Postoje i monoklonska protutijela koja su vezana sa citostatikom, čime im se povećava selektivno antitumorsko djelovanje. Monoklonska protutijela koja se koriste u liječenju raka su rituksimab, trastuzumab, cetuksimab, durvalumab, daratumumab, nivolumab, pertuzumab, bevacizumab i alemtuzumab (Francetić i sur., 2015; Mintas, 2013).

### **1.2.1. ANTIMALARICI KAO KEMOTERAPEUTICI**

Klorokin (CQ) i hidroksiklorokin (HCQ) su dobro poznati 4-aminokinolinski antimalarijski agensi. Predklinička ispitivanja podržavaju uporabu CQ i HCQ u terapiji protiv raka, posebno u kombinaciji s konvencionalnim tretmanima protiv raka jer su u stanju povećati osjetljivost tumorskih stanica na različite lijekove, što povećava terapijsku aktivnost. Do sada, klinički rezultati uglavnom idu u prilog primjeni CQ-a. Međutim, preko 30 kliničkih studija još uvijek ocjenjuju aktivnost i CQ i HCQ u različitim vrstama raka i u kombinaciji s različitim standardnim načinima liječenja. Zanimljivo je da CQ i HCQ djeluju i na stanice raka i na mikrookoliš tumora. Osim inhibicije autofagnog fluksa, koji je najviše proučavan kao antikancerogeni učinak CQ i HCQ, ovi lijekovi utječu na put Toll-receptora 9, p53 i CXCR4-CXCL12 u stanicama karcinoma. Pokazalo se da u stromi tumora CQ utječe na vaskulaturu tumora, fibroblaste povezane s rakom i imunološki sustav (Verbaanderd i sur., 2017).

### **1.3. OKSIDACIJSKI STRES**

Oksidacijski se stres događa zbog disbalansa oksidacijskih i antioksidacijskih mehanizama, u korist oksidacije. Povezuje se sa starenjem i brojnim patološkim stanjima poput hipertenzije, dijabetesa, ishemije/perfuzije, ateroskleroze, karcinoma, bolesti pluća i poremećaja živčanog sustava. Postoje situacije u kojima su oksidacijski mehanizmi korisni, na primjer, pri uklanjanju mikroorganizama što čini naš imunosni sustav. No, kad je količina reaktivnih kisikovih spojeva veća od kapaciteta antioksidacijske obrane organizma, tijelo dolazi u stanje oksidacijskoga stresa.

Reaktivni kisikovi radikali nastaju normalnim mehanizmima metabolizma stanice, no u organizmu postoje enzimski i neenzimski antioksidacijski mehanizmi koji se suprotstavljaju štetnim učincima oksidativnog stresa (Birben i sur., 2012). Visoko reaktivne molekule mogu oduzeti elektron molekulama koje su prije bile stabilne, odnosno oksidirati ih. Posljedično nastaju

nestabilne molekule - slobodni radikali. ROS (reaktivni kisikovi spojevi) (Tablica 1.) i RNS (reaktivni dušikovi spojevi) (Tablica 2.) mogu izravno utjecati na DNA, lipide i proteine, što rezultira mutacijama, kidanjem veza, oksidacijom LDL-a (lipoproteina niske gustoće) te promjenama u aktivnosti enzima i signalnim putevima (Heber i sur., 2006).

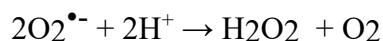
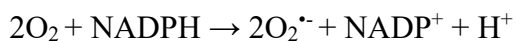
Tablica 1. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) (Štefan i sur., 2007)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
-superoksidni anionski radikal, $O_2^{\bullet-}$	-vodikov peroksid, $H_2O_2$
-hidroksilni, $OH^{\bullet}$	-ozon, $O_3$
-peroksilni, $ROO^{\bullet}$	-singletni kisik, $^1O_2$
-hidroperoksilni, $HO_2^{\bullet}$	-hipokloritna kiselina, $HClO$
-alkoksilni, $RO^{\bullet}$	

Tablica 2. Reaktivni dušikovi spojevi (RNS) (Štefan i sur., 2007)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
-dušikov (II) oksid, $NO^{\bullet}$	-nitrozil, $NO^+$
-dušikov (IV) oksid, $NO_2^{\bullet}$	-nitritna kiselina, $HNO_2$
	-dušikov (III) oksid, $N_2O_3$
	-peroksinitrit, $ONOO^-$
	-alkilperoksinitrit, $ROONO$

Slobodni radikali su kemijske vrste s nesparenim elektronom od kojih je većina vrlo reaktivna (Heber i sur., 2006). Male količine ROS-a stalno se stvaraju u aerobnim organizmima, a njihovo nakupljanje ili neučinkovito uklanjanje dovodi do oksidacijskog stresa. Prisutnost slobodnih radikala može uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, može potaknuti citotoksično djelovanje, inducirati mutacije, kromosomske aberacije i naposljetku dovesti do razvoja tumora (Štefan i sur., 2007). Kad molekula kisika primi elektron, nastaje superoksidni radikal koji protoniranjem prelazi u vodikov peroksid:



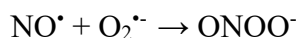
Izvori superoksidnog radikala mogu biti enzimski (NADPH oksidaza, ksantin oksidaza), stanični (respiracijski lanac, djelovanje makrofaga i leukocita) te izvori iz okruženja (X-zrake, UV-svjetlo, toksične kemikalije) (Nimse i Pal, 2015; Štefan i sur., 2007). Vodikov peroksid može u prisustvu iona željeza i bakra dati reaktivni hidroksilni radikal koji je jedan od najsnažnijih oksidansa, a nastaje Fentonovom reakcijom:



Kada govorimo o RNS-u, enzim sintaza dušikovog oksida (NOS) stvara radikal dušikovog (II) oksida ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) iz arginina:



Nastali  $\text{NO}^{\bullet}$  može zatim reagirati sa superoksidnim radikalom uz stvaranje peroksinitrita:



Peroksinitrit reagira s ostacima aromatskih aminokiselina u enzimima pa dolazi do njihove nitracije i posljedično, inaktivacije enzima (Nimse i Pal, 2015).

#### **1.4. OKSIDACIJSKI STRES I NASTANAK RAKA**

Virchow je još u 19. stoljeću pretpostavio da tumori nastaju u područjima kronične upale otkrivši prisutnost leukocita u malignom tkivu. U tumorskom, a i u okolnim tkivima, pronađeni su ROS, proinflamatorni citokini, kemokini, interleukini (IL-1, -6, -8) te faktori rasta koji djeluju preko NF- $\kappa$ B. Aktivacija nuklearnog faktora  $\kappa$ B može biti rezultat oksidacijskoga stresa (Heber i sur., 2006).

Oštećenje bioloških molekula od strane ROS-a dovodi do pretjerane stanične proliferacije, migracije stanica i tumorske angiogeneze (Heber i sur., 2006). Reaktivni spojevi mogu oksidacijom

DNA uzrokovati nastanak 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina, koji izaziva mutacije DNA, a nakupljanje takvih promjena doprinosi karcinogenezi (Sosa i sur., 2013). Primjeri oštećenja DNA su: modifikacije DNA baza ili deoksiriboze koje dovode do mutacija, delecija, kidanja veza, inhibicije popravka DNA i posljedične izmjene staničnog signaliziranja. Sveukupno, to rezultira izmjenom staničnog rasta, diferencijacije i stanične smrti - apoptoze (Heber i sur., 2006).

ROS induciraju i lipidnu peroksidaciju te oštećuju staničnu membranu što dovodi do inaktivacije membranskih receptora i enzima te povećanja tkivne permeabilnosti. Produkti lipidne peroksidacije mogu dalje inaktivirati stanične proteine te dovesti do razvoja brojnih patoloških stanja, uključujući i rak. Osim što djeluju na DNA i lipide, ROS uzrokuju i fragmentaciju peptidnih lanaca, unakrsno povezivanje proteina, oksidaciju specifičnih aminokiselina te povećanu osjetljivost na proteolizu i posljedičnu degradaciju proteina (Birben i sur., 2012).

## **1.5. ANTIOKSIDANSI**

Odlika antioksidansa (Tablica 3.) je sposobnost neutraliziranja učinaka slobodnih radikala te zaštita od njihovog štetnog djelovanja te uklanjanje istih. Ovisno o topljivosti, dijele se na hidrosolubilne (npr. vitamin C), koji se nalaze u citosolu, te na liposolubilne (npr. vitamin E, karotenoidi), koji se uglavnom nalaze u staničnim membranama. Postoji još jedna podjela, a to je na enzimске (vidi 1. 5. 3.) i neenzimске antioksidanse (Nimse i Pal, 2015; Pham-Huy i sur., 2008).

Neenzimski antioksidansi dijele se na metaboličke i one unesene hranom. Endogeni antioksidansi koji se stvaraju metabolizmom u organizmu su glutation, koenzim Q10, lipoična kiselina, mokraćna kiselina, bilirubin i transferin. Egzogeni, koji se unose hranom su vitamin C, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi, omega-3 i omega-6 masne kiseline (Pham-Huy i sur., 2008).

Tablica 3. Antioksidansi i njihovo djelovanje (Štefan i sur., 2007)

Antioksidans	Djelovanje
-superoksid dismutaze	-katalitički uklanjaju $O_2^{\bullet -}$
-katalaza	-uklanja $H_2O_2$ ( u velikim koncentracijama)
-glutation peroksidaze	-uklanjaju $H_2O_2$ ( u malim koncentracijama); i organske hidroperokside
-selen	-koenzim glutacione peroksidaze
-vitamin E	-kidanjem lanaca ostvaruje antioksidacijsko djelovanje
- $\beta$ -karoten	-uklanja singletni kisik i slobodne radikale
-vitamin C	-uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona
-koenzim Q	-djeluje antioksidacijski u respiracijskom lancu
-glutation	-uklanja radikale, koristi se za regeneraciju askorbata, te kao koenzim
-polifenoli	-uklanjaju slobodne radikale i vežu metalne ione
-transferin	-veže ione željeza
-urati	-vežu metale i uklanjaju radikale
-bilirubin	-uklanja peroksilne radikale

## 1.5.1. VITAMINI

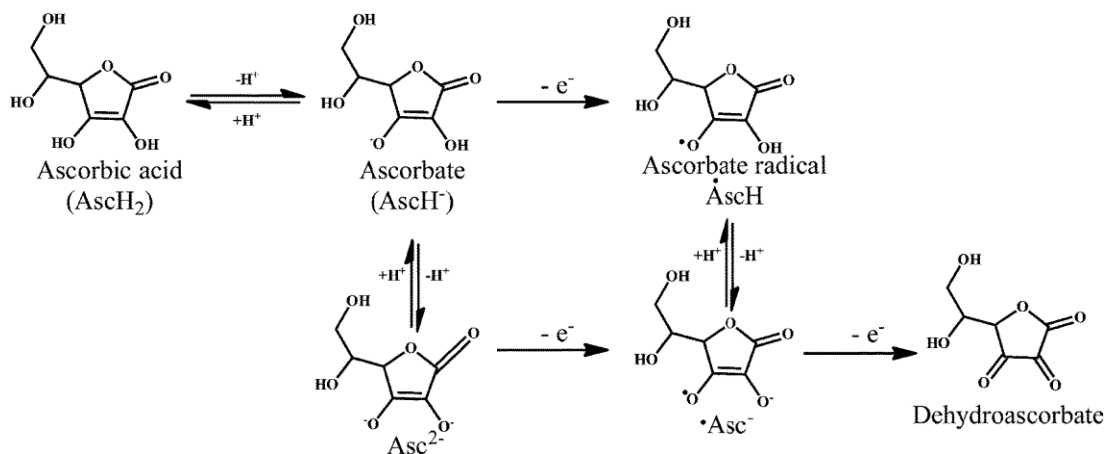
### 1.5.1.1. VITAMIN C

Vitamin C poznat je po svom antioksidacijskom, antitumorskom, antiaterogenom i imunomodulacijskom djelovanju. Njegovo otkriće vezano je uz skorbut, bolest koju karakteriziraju simptomi poput umora, iscrpljenosti, sporog zarastanja rana, krvarenja desni i unutarnjeg krvarenja

upravo zbog nedostatka vitamina C (Perčić, 2017).

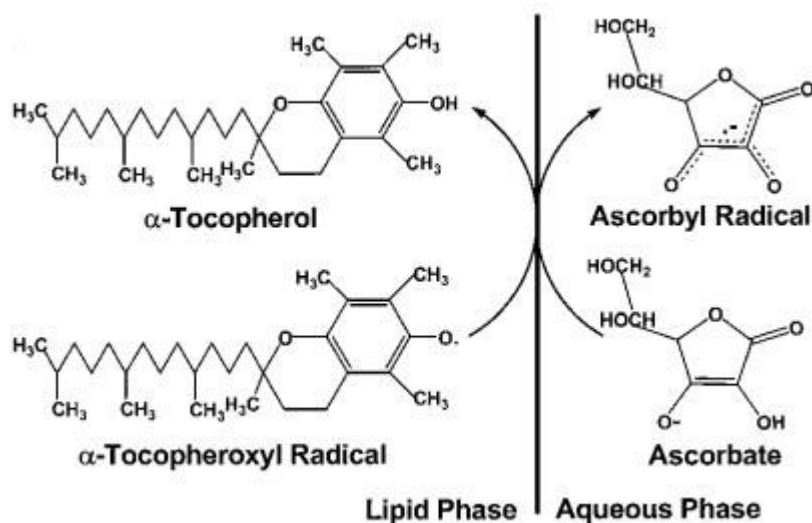
Vitamin C djeluje kao kofaktor hidrosilaza i monooksigenaza uključenih u sintezu neurotransmitera, kolagena i karnitina. Ubrzava reakcije hidrosilacije održavajući metalne ione u aktivnom centru enzima u reduciranom stanju (Naidu, 2003). Ključan je za aktivnost dvije vrste enzima: hidrosilaza koje sadrže željezo (prolil- i lizil- hidrosilaze bitne za sintezu kolagena) te onih koje sadrže bakar (dopamin- $\beta$ -hidrosilaze bitne za sintezu kateholamina, adrenalina i noradrenalina iz tirozina). Također, djeluje i antiaterogeno sprječavajući oksidaciju LDL-a hvatanjem slobodnih radikala ili drugih reaktivnih kisikovih spojeva. Bitan inicijalni korak ateroskleroze je adhezija leukocita na endotel dok vitamin C ima sposobnost sprječavanja interakcije leukocita i endotelnih stanica (Naidu, 2003).

Vitamin C postoji u reduciranom obliku kao askorbinska kiselina i u oksidiranom obliku kao dehidroaskorbinska kiselina (DHA). DHA ulazi u stanicu putem glukoza transportera te se u stanici reducira u askorbinsku kiselinu pa tako smanjuje razinu slobodnih radikala (Lee, 2009). Vitamin C donira jedan elektron lipidnom radikalumu kako bi se sprječila lančana reakcija peroksidacije lipida. Tada nastaje askorbatni radikal (Slika 1.). Gubitkom drugog elektrona nastaje dehidroaskorbat koji nema antioksidacijski kapacitet (Nimse i Pal, 2015), stoga se može reducirati ponovno u askorbinsku kiselinu uz pomoć glutationa (Domitrović, 2006).



Slika 1. Reakcije vitamina C (Nimse i Pal, 2015)

Vitamin C obnavlja vitamin E (Slika 2.) i omogućava mu daljnje djelovanje (Domitrović, 2006) tako da reducira  $\alpha$ -tokoferoksilni radikal i regenerira  $\alpha$ -tokoferol uz stvaranje askorbilnog radikala (Sadler i sur., 1991).



Slika 2. Vitamin C regenerira vitamin E (Carr i sur., 2000)

### 1.5.1.2. VITAMIN E

Vitamin E je zahvaljujući svojim antioksidacijskim svojstvima vrlo važan u prevenciji bolesti povezanih sa oksidacijskim stresom, kao što su rak, kardiovaskularne bolesti i ateroskleroza (Brigelius-Flohe i Traber, 1999). Poznat je i pod nazivom  $\alpha$ -tokoferol.

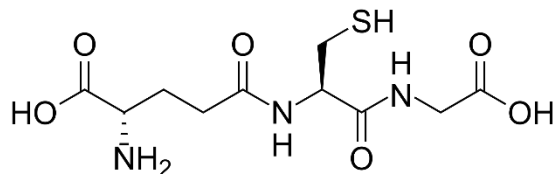
Prisutan je u staničnim membranama gdje se ponaša kao hvatač slobodnih radikala i inhibira lipidnu peroksidaciju (Klein i sur., 2000). Sprječava visokoreaktivne molekule poput superoksida, hidroksil radikala, hidroperoksil radikala i drugih da oštete biološke membrane i lipoproteine u plazmi. Na taj način smanjuje mogućnost mutagenoze i karcinogenoze. Uz to, sprječava stvaranje karcinogenih nitrozamina, djeluje antiproliferativno, inhibira staničnu adheziju, metabolizam arahidonske kiseline i prostaglandina te poboljšava rad imunskog sustava (Weinstein i sur., 2007; Klein i sur., 2000). Kemijska karcinogenaza uključuje elektrofilni napad slobodnih radikala ROS-a i RNS-a na makromolekule poput DNA te ih tako oštećuje. Pritom može

nastati 8-OH-2-deoksigvanozin i transverzija mutacija gvanina u timin ukoliko dođe do replikacije prije popravka baze. Takva mutacija na *p53* genu može rezultirati njegovom smanjenom tumorskom supresorskom aktivnošću što se događa u više od polovice karcinoma (Combs, 2008). Između ostalog, vitamin E može utjecati i na rast i agresivnost tumora s obzirom da inhibira protein kinazu C i proliferaciju stanica glatkih mišića (Klein i sur., 2000).

## 1.5.2. PEPTIDI I PROTEINI

### 1.5.2.1. GLUTATION

Glutation (GSH, Slika 3.) je tripeptid koji se biosintetizira iz aminokiselina L-cistein, L-glutaminske kiseline i glicina. Prisutan je u svim stanicama našeg tijela sa svojim brojnim ulogama. Kao kofaktor sudjeluje u brojnim enzimskim reakcijama u citoplazmi stanice. Također, ima ulogu u posttranslacijskim modifikacijama. GSH je prisutan u stanicama sisavaca u visokoj koncentraciji (oko 5 mM) i kao sulfhidrilni pufer štiti stanice tako što reagira s  $H_2O_2$  i ostalim štetnim produktima metabolizma te sprečava oksidacijski stres (Berg i sur., 2014). Ima sposobnost obnavljanja vitamina C i E ponovno u njihove aktivne oblike.

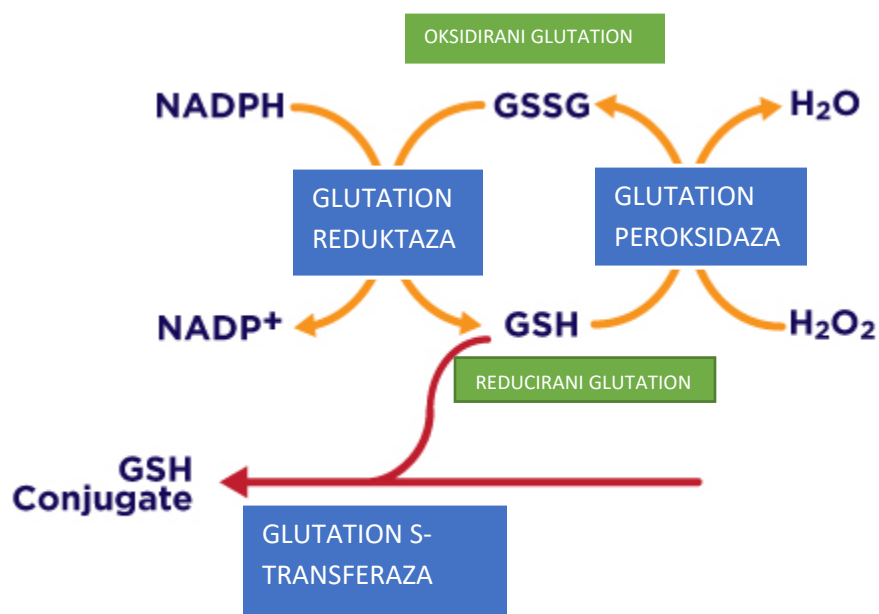


Slika 3. Kemijska struktura reduciranog glutationa (GSH) (preuzeto s: <https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione>, 26.1.2021.)

Glutation zbog izmjene elektrona u prisutnosti slobodnih radikala prelazi između reduciranog tiolnog oblika (GSH) i oksidiranog oblika (GSSG) u kojem su dva tripeptida povezana disulfidnim mostom (Berg i sur., 2014). GSSG se reducira pomoću glutation-reduktaze u GSH (Slika 4.). Izvor elektrona je NADPH. U većini sisavaca omjer GSH prema GSSG obično je 500



puta veći, odnosno reduciranog GSH ima i do 500 puta više nego oksidiranog GSSG. Omjer reduciranog i oksidiranog glutatona predstavlja jačinu oksidacijskog stresa u organizmu (Berg i sur., 2014).

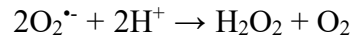


Slika 4. Oksidacija GSH u GSSH u stanici (preuzeto s: <https://www.arborassays.com/supersensitive-easy-measurement-gsh>, 26. 1. 2021.).

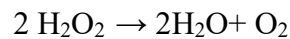
### 1.5.3. ENZIMI

Enzimski antioksidansi koji su uključeni u neutraliziranje ROS-a (Slika 5.) i RNS-a su: katalaza (CAT), superoksid-dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza (GPx), glutation-reduktaza (GR), tioredoksin-reduktaza (TR) i peroksiredoksin (PRX) (Birben i sur., 2012; Pham-Huy i sur., 2008).

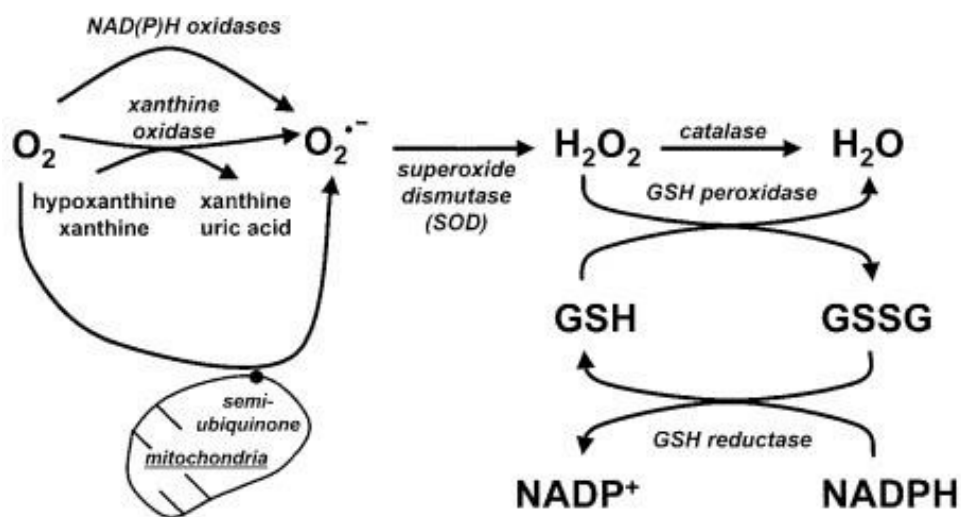
SOD je prva linija obrane od slobodnih radikala, a katalizira pretvorbu superoksidnog anionskog radikala u vodikov peroksid i kisik:



CAT i GPx kataliziraju pretvorbu vodikovog peroksida u kisik i vodu (Pham-Huy i sur., 2008):



GPx osim  $\text{H}_2\text{O}_2$  uklanja i organske perokside, a pritom oksidira reduciranu formu glutationa GSH u GSSG (Nimse i Pal, 2015; Pham-Huy i sur., 2008).



Slika 5. Putevi stvaranja i uklanjanja ROS (Dröge, 2002)

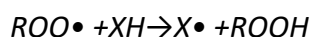
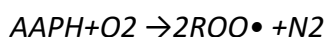
## 1.6. TESTOVI ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Testove antioksidacijske aktivnosti dijelimo u dvije kategorije: zasnovane na prijenosu vodika (HAT) i testovima prijenosa jednog elektrona (ET). Kombinirani ET i HAT testovi mogu se odvijati istovremeno, no u tom će slučaju dominantan mehanizam ovisiti o strukturi i svojstvima antioksidansa, njegovom koeficijentu razdjeljenja, topljivosti, ali i o sustavu otapala.

Antioksidacijske se aktivnosti prate inhibicijom oksidacije sonde ili ekvivalentima referentnog antioksidansa, primjerice Troloxa, askorbinske kiseline ili drugih. Oksidacija sonde mjeri se različitim detekcijskim tehnologijama poput spektrofotometrije, fluorimetrije, kemiluminiscencije, amperometrije, EPR (elektronska paramanetska rezonancija), FT-IR (Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija) i NMR (nuklearna magnetska rezonancija) (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.6.1. ORAC METODA

ORAC (kapacitet apsorpcije kisikovih radikala, engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity) metoda je jedna od najkorištenijih metoda za mjerenje antioksidacijskoga potencijala. Temelji se na sljedećim reakcijama:



gdje je AAPH, azo-spoj punoga naziva 2,2'-azobis (2-amidinopropan)-dihidroklorid, izvor peroksilnog radikala; ROO•, tj. u prisutstvu kisika AAPH stvara peroksilni radikal. Inkubacija fluorescentne sonde (FP) s AAPH uzrokuje oksidaciju sonde čime ona prelazi u nefluorescentni oblik i time dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije. Kod koinkubacije AAPH, fluorescentne sonde i antioksidansa (XH), antioksidans je donor vodika, te on daje svoj vodik peroksilnom radikalu pri čemu peroksilni radikal prelazi u manje reaktivni oblik. Manjak peroksilnog radikala uzrokuje smanjivanje oksidacije fluorescentne sonde, a time ujedno i odgađanje smanjenja intenziteta fluorescencije (López-Alarcóna i Denicolab, 2013).

### 1.6.2. TRAP METODA

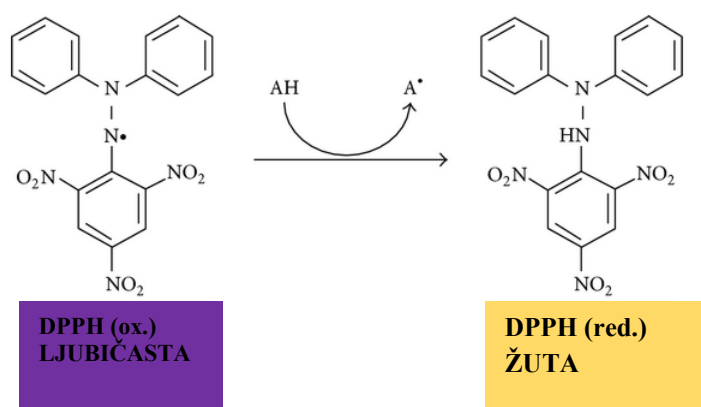
TRAP (engl. Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter Assay) metoda jedna je od prvih metoda korištenih za određivanje potpunog antioksidacijskoga kapaciteta krvne plazme ili seruma. Specije uključene u TRAP metodu su peroksilni radikali generirani termolizom AAPH i tvari koje se peroksidiraju, a sadržane su u plazmi ili drugim biološkim tekućinama. AAPH se dodaje u plazmu u kojoj se sastavnice koje se oksidiraju promatraju kroz potrošnju kisika na

površini kisikove elektrode. Princip mjerenja je inhibicija oksidacije prisustvom antioksidansa. Vremenski interval indukcije reakcije (*lag faza*) uspoređuje se s vremenskim intervalom referentnog spoja, Troloxa (Litescu i sur., 2010).

### 1.6.3. DPPH METODA

DPPH (2, 2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat) test je brza, jednostavna, jeftina i široko korištena metoda za mjerenje sposobnosti spojeva da djeluju kao hvatači slobodnih radikala ili donori vodika te za procjenu antioksidacijske aktivnosti u složenijim biološkim uzorcima (Blois, 1958).

DPPH<sup>•</sup> je stabilan slobodni radikal zahvaljujući svojstvu delokalizacije slobodnoga elektrona, zbog kojeg molekula ne dimerizira, kao što bi bio slučaj kod ostalih radikala (Alam i sur., 2013). Radikal apsorbira vidljivu svjetlost na 515 nm što se vidi kao crveno-ljubičasto obojenje, dok se u proton-donorskoj otopini generira njegov reducirani oblik (neradikalni) blijedo-žute boje (Slika 6.). Reakcija kreće s prijenosom elektrona, dok je prijenos protona zapravo sekundarna reakcija do koje dolazi u otapalima s jakim vodikovim vezama kao što su metanol i etanol (Kedare i Singh, 2011).



Slika 6. Reakcija vezanja protona na DPPH<sup>•</sup> (preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-DPPH-radical-scavenging-capacity-assay\\_fig4\\_255976992](https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-DPPH-radical-scavenging-capacity-assay_fig4_255976992), 7.2.2021.)

## **1.6.4. BIOLOŠKI MODELI ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI**

### **1.6.4.1. METODA INHIBICIJE OKSIDACIJE LDL-KOLESTEROLA**

Gašenjem slobodnih radikala i keliranjem prooksidacijskih metala, antioksidansi mogu inhibirati oksidaciju LDL-a. Vežanjem na apolipoprotein B, antioksidansu je omogućen pristup lipidima kao i sprječavanje interakcije s prooksidansima. U navedenoj metodi, oksidacija LDL-kolesterola inducira se prijelaznim metalima kao što je  $\text{Cu}^{2+}$  ili peroksilnim radikalima generiranim termalnim raspadom AAPH. Supstrat (LDL-C), inicijator (metalni ion, peroksil-radikal) i antioksidansi inkubiraju se na fiziološkoj temperaturi od 37 °C te se nastajanje konjugiranih diena prati spektrofotometrijski na 234 nm. Antioksidacijska aktivnost izražava se kao postotak inhibicije stvaranja konjugiranih diena u usporedbi s kontrolom koja ne sadrži antioksidanse (Shadidi i Zhong, 2015).

### **1.6.4.2. METODA INHIBICIJE OKSIDACIJE I KIDANJA DNA**

Oksidacijski stres stanicu vodi prema oštećenju DNA, koje uključuje mutagenezu i karcinogenezu te druge patološke procese poput starenja. U navedenoj metodi, antioksidacijski se učinak, određuje u superzavijenom plazmidnom pBR322 DNA modelnom sustavu, gdje se kidanje DNA lanca inducira hidroksilnim i peroksilnim radikalima. Ovi radikali glavni su izvor biološki relevantnih ROS-ova odgovornih za oksidacijsko oštećenje DNA, posebice mitohondrijske DNA. Fentonovom reakcijom fero-iona s vodikovim peroksidom generiraju se hidroksilni radikali, dok se peroksilni radikali generiraju uz pomoć AAPH. Nakon inkubacije s radikalima i antioksidansima na 37°C, DNA frakcije separiraju se gel elektroforezom, a vrpce identificiraju nakon vizualizacije. I otvoreni cirkularni oblik DNA nastao jednolančanim kidanjem, i linearni oblik nastao dvolančanim kidanjem mogu se smatrati produktima oksidacije DNA, s tim da je otvoreni cirkularni oblik dominantniji. Koncentracije nativne (superzavijene) i pokidanih DNA frakcija dobivaju se denzitometrom iz intenziteta ili gustoće odgovarajućih vrpce. Moguće je da antioksidansi inhibiraju rezanje DNA kombinacijom mehanizama gašenja radikala i keliranja fero-iona te se njihova učinkovitost može računati kao retencija DNA (postotak očuvane neoksidirane i superzavijene DNA) (Shadidi i Zhong, 2015).

## **1.6.5. STANIČNE METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI**

### **1.6.5.1. METODA INHIBICIJE HEMOLIZE**

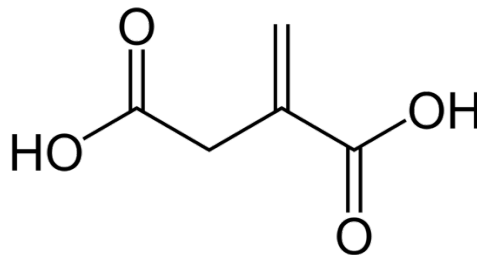
Eritrociti su, kao specifični prenositelji kisika krvlju, neprestano izloženi oksidacijskom stresu. ROS-ovi, a posebno vodikov peroksid kao normalan stanični metabolit, može inicirati oksidaciju proteina (hemoglobina) i lipida (ugl. kolesteril-estera), vodeći do narušavanja staničnog oblika i membranske strukture te konačno do hemolize. Kao inicijatori oksidacije koriste se vodikov peroksid i peroksilni radikali. Nakon inkubacije s inicijatorom i antioksidansom na 37 °C, postotak hemolize određuje se periodično centrifugiranjem i spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije oslobođenog hemoglobina u supernatantu na 524 nm. Inhibicija hemolize antioksidansima izračunava se prema kontroli koja ne sadrži antioksidanse. Postotak hemolize određuje se zamućenjem (turbiditetom) suspenzije eritrocita bez centrifugiranja (Shadidi i Zhong, 2015).

### **1.6.5.2. CAA METODA (engl. Cellular Antioxidant Assay)**

CAA je razvijena za kvantitativno mjerenje antioksidacijske sposobnosti inhibicije oksidacije u stanicama. Metoda koja preuzima prednosti staničnih kultura i kemijskih testova, i to uvođenjem fluorescentne probe u stanice. HepG2, stanična linija humanog hepatokarcinoma, veže 2',7'- diklorofluorescin diacetat (DCFH-DA) i on se aktivira u DCFH staničnom deacetilacijom kataliziranom esterazama. DCFH osjetljiv je na ROS-ove (vodikov peroksid i peroksilni radikal) i na RNS-ove (reaktivne dušikove specije; dušikov oksid i peroksinitrit) te zbog toga nastaje oksidacijski produkt DCF koji zbog ekscitacije fluorescira. Antioksidansi apsorbirani u stanici mogu ugasiti peroksilne radikale što dovodi do nižeg stupnja oksidacije i oslabljenog porasta fluorescencije. CAA nudi brojne prednosti za procjenu antioksidanasa jer se upotrebljava biološki relevantan supstrat, koriste niske razine oksidansa, a stanično preuzimanje antioksidanasa korelira s bioraspoloživošću *in vivo*. Zbog smanjene stabilnosti stanične linije HepG2, moguće je koristiti i druge stanične kulture. CAA je predložena kao standardizirana metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti u stanici kako bi se smanjile varijacije među laboratorijima (Shadidi i Zhong, 2015)

## 1.7. ITAKONSKA KISELINA

Itakonska kiselina jest dikarboksilna kiselina koja sadrži egzometilensku skupinu konjugiranu s karbonilnom skupinom (Slika 7.). Kiselina koja ima jasna inhibicijska svojstva: u makrofagima sisavaca bakterijska infekcija potiče indukciju gena koji kodira cis-akonitat-dekarboksilazu, što rezultira stvaranjem itakonske kiseline koja inhibira metabolizam bakterija kao dio imunološkog odgovora. Itakonska kiselina također inducira transkripcijski faktor Nrf2 koji je neophodan za zaštitu od oksidacijskoga i ksenobiotičkoga stresa i za ublažavanje upale (Mills i sur., 2018). Itakonat i njegov membranski propusni derivat dimetil itakonat selektivno inhibiraju podskupinu citokina 2, uključujući IL-6 i IL-12, ali ne i TNF (Bambouskova i sur., 2018).



Slika 7. Kemijska struktura itakonske kiseline (preuzeto s: [https://sh.wikipedia.org/wiki/Itakonska\\_kiselina](https://sh.wikipedia.org/wiki/Itakonska_kiselina), 28.1.2021.)

Reaktivna alfa-metilenska jedinica u itakonskoj kiselini omogućuje umrežavanje ili polimerizaciju, pa je moguće napraviti njezine polimere i kopolimere (Zerkowski i Solaiman, 2014). Spojevi s izloženim nezasićenim  $\beta$ -ugljicima smatraju se najboljim supstratima za Michaelovu adiciju. Michaelovi akceptori prisutni su u velikom broju lijekova protiv raka. Na primjer, inhibitori receptora epidermalnog faktora rasta i inhibitori tirozin-kinaza (EGFR-TKI), poput afatiniba, neratiniba, osimertiniba, ibrutiniba, kovalentno se vežu na ostatak cisteina koji se nalazi na položaju 797 receptora (Minari i sur., 2016).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidacijski potencijal 10 spojeva sintetiziranih na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, korištenjem DPPH metode.

Antioksidansi su molekule koje su sposobne inhibirati oksidaciju drugih molekula, spriječiti oštećenje DNA, proteina i stanične membrane (Ames i sur. 1993) te spriječiti staničnu smrt nakon oslobađanja slobodnih radikala. Potraga za novim molekulama s antioksidacijskim svojstvima izuzetno je aktivno područje istraživanja jer takve molekule mogu potencijalno smanjiti rizik od mnogih kroničnih bolesti, uključujući aterosklerozu, moždani udar, dijabetes, Alzheimerovu bolest i neke oblike raka. Nadalje, različite se vrste antioksidansa (vitamini C i E, glutation, lipoična kiselina, butilirani fenoli itd.) naširoko koriste u kemijskoj i farmaceutskoj industriji za prekid radikal-lanca oksidacije. Stoga, postoji veliki znanstveni interes za otkrivanje učinkovitih sintetskih i/ili prirodnih antioksidansa (Costa i sur., 2006; Costa i sur. 2008).

Spojevi sintetizirani na Zavodu za farmaceutsku kemiju konjugati su itakonske kiseline i antimalarika primakina, klorokina i meflokina, ali i konjugati itakonske kiseline i fluoroanilina, piridina i indola. Unatoč činjenici da su derivati itakonske kiseline nedovoljno istraženo područje, te su u literaturi dostupni samo ograničeni podaci o njihovoj pripremi i/ili biološkoj aktivnosti (Domínguez i sur. 1989; Nayak i sur. 2016), postoje navodi prema kojima konjugati itakonske kiseline i primakina posjeduju antitumorsku aktivnost. Također, različiti antimalarijski lijekovi pokazuju izravno ili posredno djelovanje protiv raka, dok su supstituenti piridin, fluoroanilin i indol prisutni u nekim citostaticima (npr. sorafenib, imatinib, sunitinib) (Pavić i sur. 2014; Perković i sur., 2016; Pavić i sur., 2016, Verbaanderd i sur. 2016). Derivatizacija registriranih antimalarijskih lijekova, posebno njihova hibridizacija s različitim kemijskim osnovama, također je popularna strategija u potrazi za novim biološki aktivnim agensima s raznim biološkim profilima (Zorc i sur., 2019)



### 3. MATERIJALI I METODE

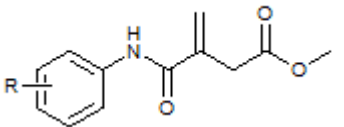
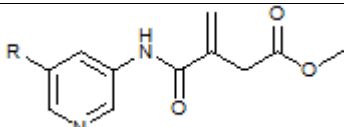
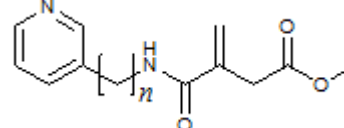
Uzorci novosintetiziranih derivata itakonske kiseline analizirani su u Centru za translacijska i klinička istraživanja, na Odjelu za međustaničnu komunikaciju pri Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 2.

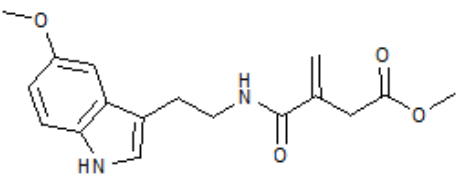
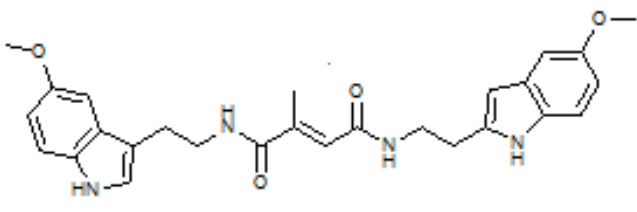
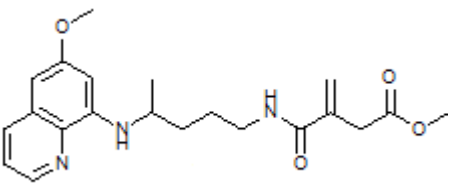
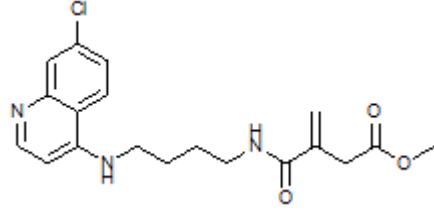
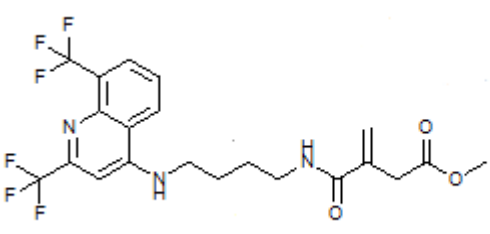
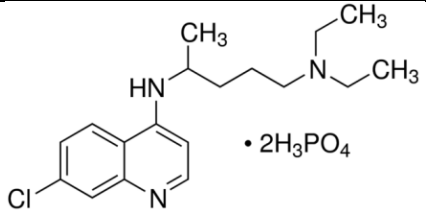
#### 3.1. MATERIJALI

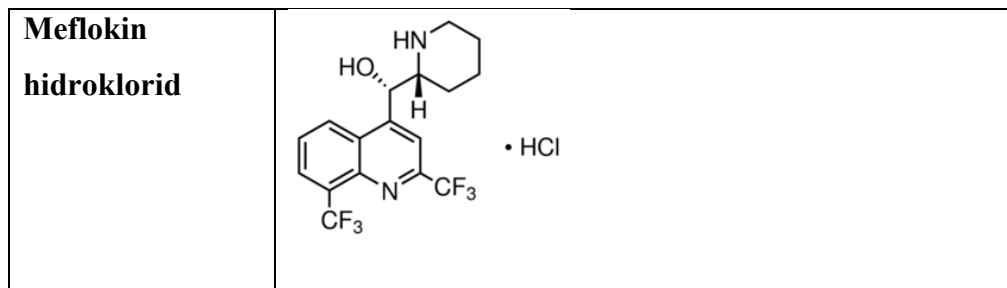
Kemijski spojevi

U ispitivanje je uključeno 10 derivata itakonske kiseline, označenih kao V1, V2, V3, V4, V6, V8, V9, MI3, MI5, MI7, kao i poznati spojevi s antimalarijskim svojstvima: klorokin difosfat i meflokin hidroklorid (Tablica 4.).

**Tablica 4. Kemijske strukture kemijskih spojeva uključenih u ispitivanje**

Spoj	Struktura
V1 (R= <i>p</i> -F)	
V2 (R= <i>m</i> -CF <sub>3</sub> )	
V3 (R= <i>p</i> -CF <sub>3</sub> )	
V4 (R=H)	
V6 (n=1)	

V8	
V9	
MI3	
MI5	
MI7	
Klorokin difosfat	



## Pribor i reagensi

Prilikom ispitivanja korišteni laboratorijski pribor i uređaji su:

- 1) epruvete od 2,0 mL i 15 mL (Eppendorf, Njemačka)
- 2) pipete od 2, 20, 100 i 1000  $\mu$ L i pripadajući nastavci (Eppendorf, Njemačka)
- 3) multikanalne pipete (Eppendorf, Njemačka)
- 4) kontroler za pipete (Eppendorf, Njemačka)
- 5) mikrotitarske pločice (Falcon, kat. br. 353075)
- 6) digitalna vaga (Kern, Njemačka)
- 7) vorteks (IKA, Njemačka)
- 8) sprektrofotometar (Spectramax i3x, Molecular Devices, USA)

Glavni reagensi korišteni za određivanje antioksidacijskog potencijala u uzorcima:

- 1) 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrate (DPPH, Sigma, kat. br. D9132)
- 2) Vitamin C (Acros Organics, kat. br. 401471000)
- 3) 6-hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox, Fluka, kat. br. 238813)
- 4) 96 % etanol (Kefo, kat. br. 133124)
- 5) Dimetil sulfoksid (DMSO, Sigma, kat.br. D5879)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. USPOSTAVA DPPH METODE

Metoda se provodi u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica prema priloženoj shemi (Slika 8.). Vitamin C i Trolox korišteni su kao standardni antioksidansi za uspostavu DPPH metode.

Standardi su otopljeni u DMSO do koncentracije od 50 mM, te su radne otopine pripravljene u etanolu u decimalnim razrjeđenjima (1 mM - 100 pM). Dodano je 50 uL pripravljene otopine po jažici. DPPH je svježe razrijeđen u apsolutnom etanolu te dodan u jažice u finalnoj koncentraciji od 100 uM, u volumenu od 50 uL. Kontrolne jažice sastojale su se samo od etanola (negativna kontrola) ili etanola s dodatkom DPPH (pozitivna kontrola) te su neke od jažica sadržavale DPPH i DMSO otapalo (DMSO kontrola). DMSO kontrola je korištena kao potvrda da otapalo u kojem su spojevi pripremljeni ne utječe na bilo koji način na rezultate testa.

Pločice su inkubirane 30 minuta, zaštićene od svjetlosti. Absorbancija je zabilježena na 517 nm pomoću Spectarmax i3x čitača mikrotitarskih pločica. Izračunate su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti standarda u odnosu na pozitivnu kontrolu:

$$\% \text{ kontrole} = [\text{apsorbancija uzorka} / \text{apsorbancija pozitivne kontrole}] \times 100$$

Rezultati su analizirani u GraphPad Prism softveru. IC50 vrijednost (koncentracija spoja koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju danoga parametra) izračunata je za svaki spoj iz krivulje odnosa koncentracije i odgovora, korištenjem analize nelinearnom regresijom.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank + DPPH		1 mM		1 mM							
B			100 μM		100 μM							
C			10 μM		10 μM							
D	blank - DPPH		1 μM		1 μM							
E			100 nM		100 nM							
F			10 nM		10 nM							
G	blank + DPPH + DMSO		1 nM		1 nM							
H			100 pM		100 pM							
			vitamin C		trolox							

Slika 8. Shematski prikaz organizacije mikrotitarske pločice.

### 3.2.2. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI SPOJEVA DPPH METODOM

Istom metodom ispitana je antioksidacijska aktivnost spojeva. Metoda je provedena u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica prema priloženoj shemi (Slika 9). Vitamin C i Trolox su u testu korišteni kao standardni antioksidansi za usporedbu sa spojevima, te su oba standarda pripravljena prethodno opisanim postupkom (vidi 3.2.1.). Spojevi su također otopljeni u DMSO do koncentracije od 50 mM, te su radne otopine pripravljene u etanolu u seriji razrjeđenja (1 mM - 0,5 nM). Dodano je 50 uL pripravljene otopine spojeva po jažici. DPPH je svježe razrijeđen u apsolutnom etanolu te dodan u jažice u finalnoj koncentraciji od 100 uM, u volumenu od 50 uL. U testu je korištena negativna i pozitivna kontrola, kao i kontrola otapala, pripravljene prethodno opisanim postupkom (vidi 3.2.1.).

Pločice su inkubirane 30 minuta, zaštićene od svjetlosti. Absorbancija je zabilježena na 517 nm pomoću Spectarmax i3x čitača mikrotitarskih pločica. Izračunate su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti standarda u odnosu na pozitivnu kontrolu prema prethodno opisanom postupku, a rezultati su analizirani u GraphPad Prism softveru.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			1 mM		1 mM		1 mM		1 mM		1 mM	
B		blank + DPPH	500 µM		500 µM		500 µM		500 µM		500 µM	
C			100 µM		100 µM		100 µM		100 µM		100 µM	
D			50 µM		50 µM		50 µM		50 µM		50 µM	
E		blank - DPPH	10 µM		10 µM		10 µM		10 µM		10 µM	
F			5 µM		5 µM		5 µM		5 µM		5 µM	
G		blank + DPPH	1 µM		1 µM		1 µM		1 µM		1 µM	
H		+ DMSO	0,5 µM		0,5 µM		0,5 µM		0,5 µM		0,5 µM	
			V1		V2		V3		V4		V6	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank + DPPH		1 mM		1 mM		1 mM		1 mM		1 mM	
B			500 $\mu$ M		500 $\mu$ M		500 $\mu$ M		500 $\mu$ M		500 $\mu$ M	
C			100 $\mu$ M		100 $\mu$ M		100 $\mu$ M		100 $\mu$ M		100 $\mu$ M	
D			50 $\mu$ M		50 $\mu$ M		50 $\mu$ M		50 $\mu$ M		50 $\mu$ M	
E			10 $\mu$ M		10 $\mu$ M		10 $\mu$ M		10 $\mu$ M		10 $\mu$ M	
F		5 $\mu$ M		5 $\mu$ M		5 $\mu$ M		5 $\mu$ M		5 $\mu$ M		
G	blank + DPPH + DMSO		1 $\mu$ M		1 $\mu$ M		1 $\mu$ M		1 $\mu$ M		1 $\mu$ M	
H			0,5 $\mu$ M		0,5 $\mu$ M		0,5 $\mu$ M		0,5 $\mu$ M		0,5 $\mu$ M	
			V8		V9		MI3		MI5		MI7	

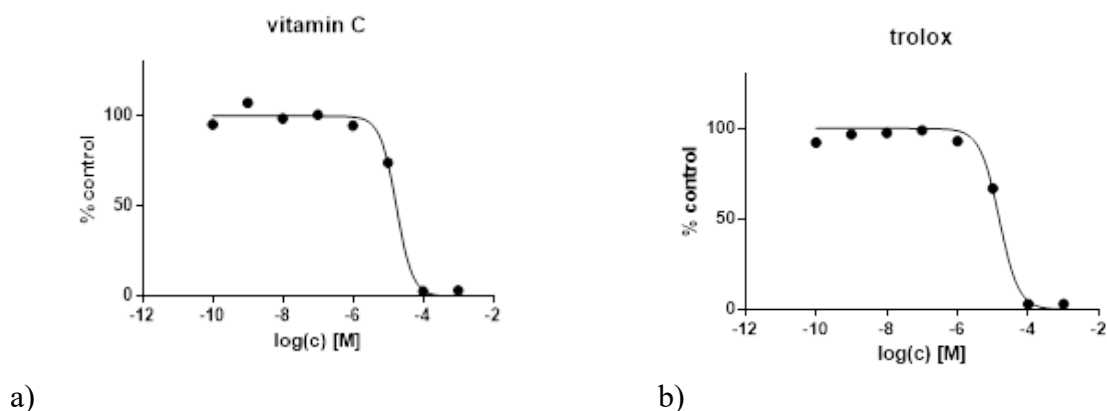
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank + DPPH		1 mM		1 mM		1 mM		1 mM			
B			500 $\mu$ M		500 $\mu$ M		100 $\mu$ M		100 $\mu$ M			
C			100 $\mu$ M		100 $\mu$ M		10 $\mu$ M		10 $\mu$ M			
D			50 $\mu$ M		50 $\mu$ M		1 $\mu$ M		1 $\mu$ M			
E			10 $\mu$ M		10 $\mu$ M		100 nM		100 nM			
F		5 $\mu$ M		5 $\mu$ M		10 nM		10 nM				
G	blank + DPPH + DMSO		1 $\mu$ M		1 $\mu$ M		1 nM		1 nM			
H			0,5 $\mu$ M		0,5 $\mu$ M		100 pM		100 pM			
			CQ		MQ		vitamin C		trolox			

Slika 9. Shematski prikaz razrjeđenja ispitivanih spojeva i primakinskih standarda

## 4. REZULTATI

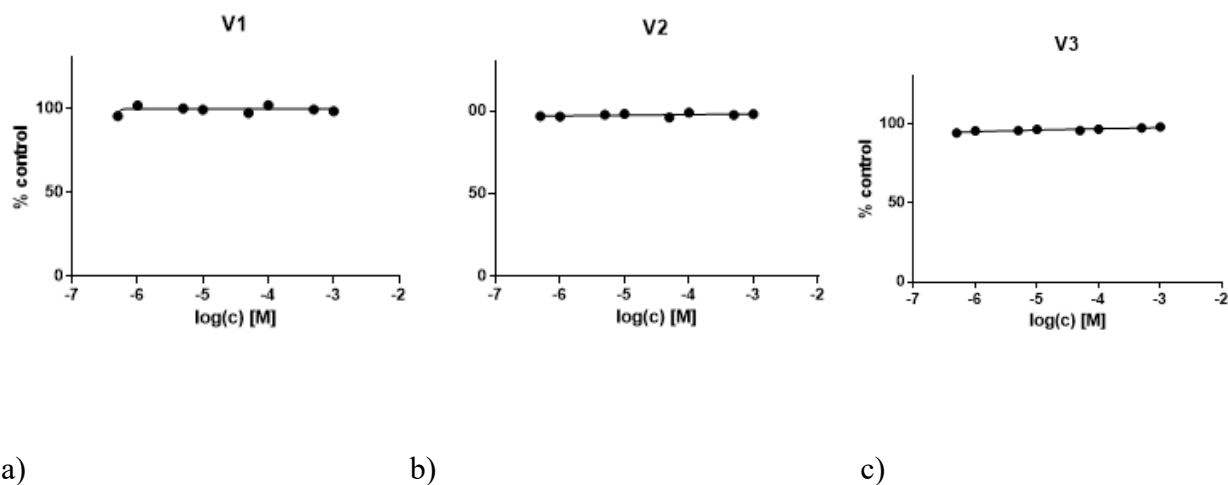
### 4.1. USPOSTAVA DPPH METODE

DPPH metoda uspostavljena je korištenjem dva poznata spoja s antioksidacijskom aktivnošću, vitamina C i Troloxa. Rezultati ekperimenta prikazani su na slici 10. Grafovi pokazuju odnos koncentracije ispitivanih spojeva i njihove aktivnosti u usporedbi s pozitivnom kontrolom. Utvrđena IC<sub>50</sub> koncentracija za vitamin C iznosi 17,4 μM, a za Trolox ona iznosi 15,3 μM.



Slika 10. Antioksidacijski učinak vitamina C (a) i troloxa (b) prilikom uspostave metode

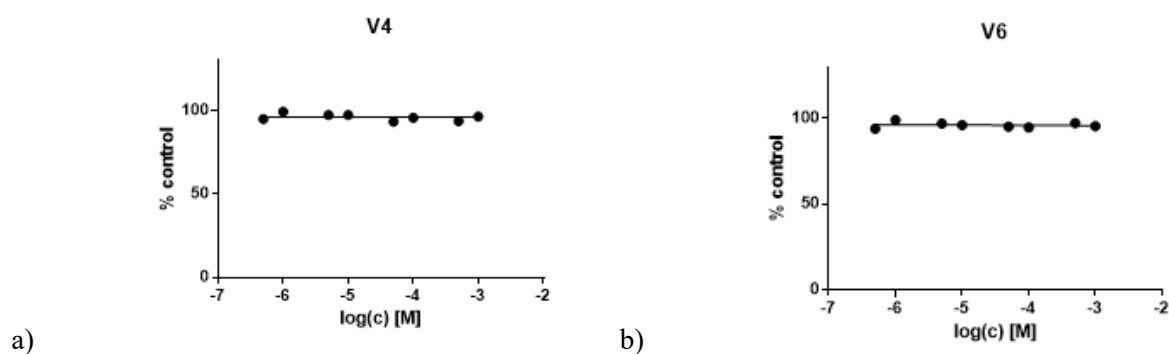
### 4.2. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KONJUGATA ITAKONSKE KISELINE I ANILINA



Slika 11. – Antioksidacijski učinak spoja V1 (a), V2 (b) i V3 (c)

Spoj V1 konjugat je itakonske kiseline i fluoroanilina, V2 je konjugat itakonske kiseline i *m*-trifluorometilanilina, dok je V3 konjugat itakonske kiseline i *p*-trifluorometilanilina. Rezultati eksperimenta (Slika 11.) pokazuju da su IC<sub>50</sub> vrijednosti svih ispitivanih konjugata itakonske kiseline i anilina veće od 1000 μM, te da ispitivani spojevi ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost.

#### 4.3. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KONJUGATA ITAKONSKE KISELINE I PIRIDINA

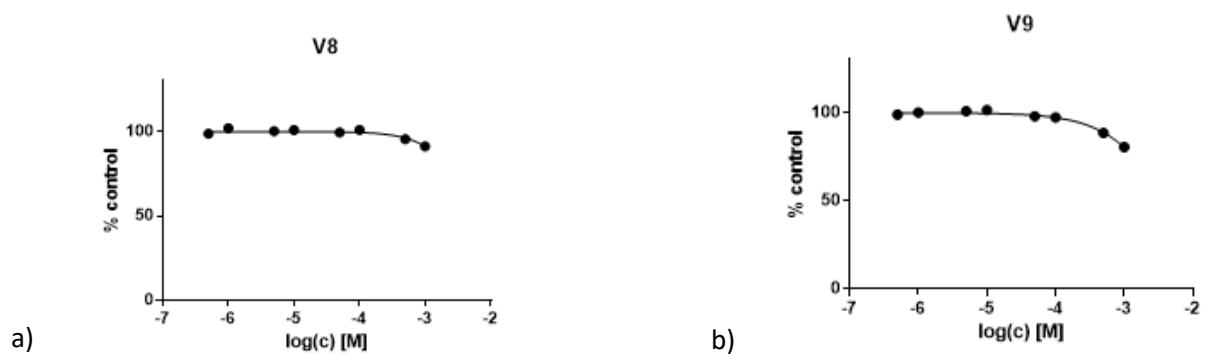


Slika 12. Antioksidacijski učinak spoja V4 (a) i V6 (b)

Prema rezultatima eksperimenta (Slika 12.) može se zaključiti kako niti konjugati itakonske kiseline i piridina ne pokazuju antioksidacijski učinak. Njihova IC<sub>50</sub> vrijednost veća je od 1000 μM.



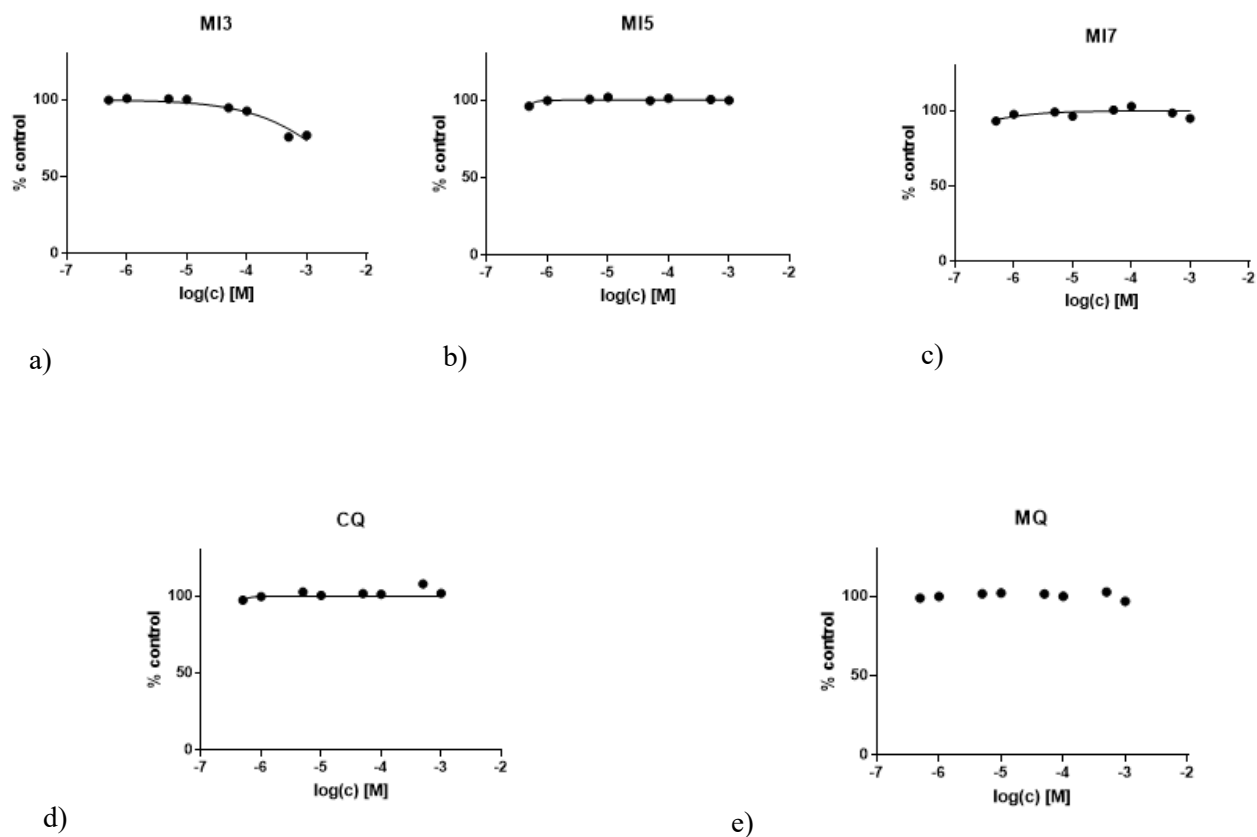
#### 4.4. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KONJUGATA ITAKONSKE KISELINE I INDOLA



Slika 13. Antioksidacijski učinak spoja V8 (a) i V9 (b)

Spoj V8 konjugat je itakonske kiseline i indola, dok je spoj V9 konjugat itakonske kiseline i dvije molekule indola. Oba su derivata pokazala potencijalnu antioksidacijsku aktivnost u višim ispitivanim koncentracijama (Slika 13.), no i njihova IC<sub>50</sub> vrijednost bila je veća od 1000  $\mu$ M.

#### 4.5. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL ANTIMALARIKA KLOROKINA I MEFLOKINA TE KONJUGATA ITAKONSKE KISELINE I PRIMAKINA, KLOROKINA TE MEFLOKINA

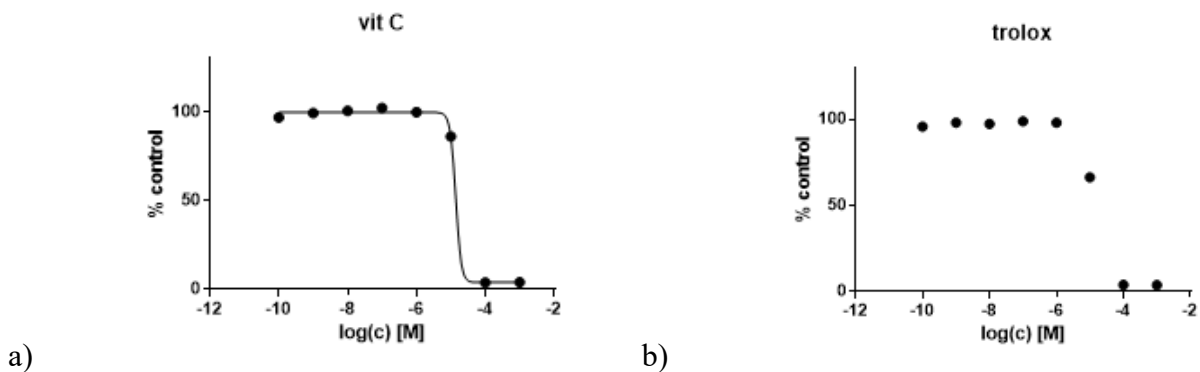


Slika 14. Antioksidacijski učinak spojeva MI3 (a), MI5 (b), MI7 (c), klorokina (d) i meflokina (e)

Spoj MI3, konjugat itakonske kiseline i primakina, pokazao je potencijalni antioksidacijski učinak u višim ispitivanim koncentracijama (Slika 14.), što se može očitati iz grafa za navedeni spoj, no i njegova IC<sub>50</sub> vrijednost još uvijek je veća od 1000  $\mu$ M. Spojevi MI5 (konjugat itakonske kiseline i klorokina), MI7 (konjugat itakonske kiseline i meflokina), CQ (klorokin difostfat), MQ (meflokin hidroklorid) nisu pokazali antioksidacijski potencijal uz vrijednost IC<sub>50</sub> veću od 1000  $\mu$ M.

#### 4.6. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL VITAMINA C i TROLOXA

Utvrđene su IC<sub>50</sub> vrijednosti poredbenih otopina- vitamina C i Troloxa (derivata vitamina E), poznatih i prihvaćenih antioksidansa. IC<sub>50</sub> vrijednost vitamina C, iznosila je 13,8 μM, a Troloxa 11,4 μM.



Slika 15. Antioksidacijski učinak vitamina C (a) i troloxa (b) kao poredbenih otopina

Sve IC<sub>50</sub> vrijednosti ispitivanih spojeva prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5. IC<sub>50</sub> vrijednosti ispitivanih i poredbenih spojeva

Spoj	IC <sub>50</sub> (μM)
V1	>1000
V2	>1000
V3	>1000
V4	>1000
V6	>1000
V8	>1000
V9	>1000
MI3	>1000
MI5	>1000
MI7	>1000
CQ	>1000
MQ	>1000
vitamin C	13,8
Trolox	11,4

## 5. RASPRAVA

Metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom odabrana je prvenstveno zbog jednostavnosti i brzine mjerenja antioksidacijskog potencijala spojeva. Korištena metoda preuteza je iz literature (Blois, 1958).

Prilikom uspostave DPPH metode pokazano je kako između izmjerenih vrijednosti apsorbancije pozitivne kontrole te DMSO kontrole nema značajne razlike ( $A_{514\text{poz}}=0,182\pm 0,009$ ,  $A_{514\text{DMSO}}=0,181\pm 0,007$ ) što potvrđuje da otapalo nema utjecaja na izmjerene vrijednosti apsorbancije. U uspostavi metode korištena su dva standardna antioksidansa kao poredbene otopine - vitamin C i Trolox. Rezultati testiranja pokazuju kako su dobivene IC<sub>50</sub> vrijednosti bliske onima navedenima u literaturi (Stepanić i sur., 2014, Wanga i sur., 2011) čime je dana dodatna potvrda uspješne uspostave DPPH testa.

DPPH metodom ispitana je antioksidacijska aktivnost derivata itakonske kiseline. Za razliku od standardnih antioksidanasa, čije su IC<sub>50</sub> vrijednosti u niskim mikromolarnim koncentracijama (IC<sub>50</sub><sub>vit C</sub> = 13,8 uM, IC<sub>50</sub><sub>trolox</sub> = 11,4 uM), svi su ispitivani spojevi pokazali IC<sub>50</sub> vrijednost veću od 1000 μM. Navedena je vrijednost obrnuto proporcionalna antioksidacijskoj aktivnosti iz čega se može zaključiti da ispitivani spojevi ne posjeduju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala.

Naznake antioksidacijske aktivnosti mogu se uočiti u koncentracijama od 500 uM i 1 mM nekih od ispitivanih spojeva. Grafovi (Slika 13. a i b, Slika 14. a) pokazuju kako bi ispitivani spojevi V8 i V9 (konjugati itakonske kiseline i dvije molekule indola) kao i MI3 (konjugat itakonske kiseline i primakina) mogli biti potencijalni antioksidansi u višim koncentracijama, no takve su koncentracije biološki nezanimljive zbog mogućnosti velike toksičnosti spojeva na organizam, samim time i velikog spektra nuspojava. Iz tog je razloga potrebna identifikacija optimalne doze s visokim omjerom koristi i rizika zajedno s odgovarajućim znanjem o biotransformaciji antioksidansa (Bast i Haenen, 2013).

Nakon razmatranja strukture navedenih spojeva, uočena im je strukturalna sličnost. Naime, spojevi V8 i V9 sadrže indolski prsten s vezanom metoksi skupinom dok spoj MI3 sadrži benzen i piridin s vezanom metoksi skupinom. Spojevi s skupinama koji mogu osigurati slobodne

elektrone (npr. S, O ili N), bilo u obliku negativnog naboja ili nesparenog para elektrona, mogu pokazati veću antioksidacijsku aktivnost zbog svojih redoks svojstava (Nayak i sur., 2016).

Navedeni bi se spojevi mogli ispitati i nekom od pouzdanijih metoda, poput onih u staničnim kulturama- staničnom antioksidacijskom metodom (CAA) kako bi se dobili biološki relevantiniji rezultati.

Rezultati preostalih spojeva (V1, V2,V3, V4, V6, MI5, MI7, CQ, MQ) bili su u skladu s očekivanim jer su brojna istraživanja pokazala prooksidacijske učinke primakina. Liječenje primakinom uzrokuje oksidacijski stres stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta unutar jetre, bubrega i eritrocita (Zorc i sur., 2019) Nastali slobodni radikali svojim mehanizmima potom oštećuju DNA, uzrokuju jednolančane i dvolančane lomove, inhibiraju enzime popravka genetičkog materijala. Kako se tumorske stanice dijele brže od stanica zdravog tkiva te su obično manje diferencirane, jednolančani lomovi često prođu nezamjećeni te se oni prenose na stanice kćeri. Dolazi do nakupljanja mutacija u tumorskim stanicama koje zbog toga odlaze u apoptozu ili se sporije dijele.

Sintetizirani derivati itakonske kiseline, spojevi su s Michaelovim akceptorskim dijelom i aromatičnim dijelovima konjugata. To su ključna strukturna obilježja antikancerogenih i antivirusnih lijekova odgovornih za kovalentno vezanje lijeka na cisteinski ostatak željenog proteina (Kudo i sur., 1999). Učinak itakonske kiseline pa tako i njenih derivata na druge metaboličke putove također je zanimljiv jer razumijevanje njihovih fizioloških uloga i mehanizama djelovanja može spriječiti neželjene nuspojave i povećati sigurnost primjene.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Uspješno je uspostavljena DPPH metoda za određivanje antioksidacijskog potencijala spojeva.
2. Ispitivani novosintetizirani konjugati itakonske kiseline u DPPH testu nisu pokazali antioksidacijsku aktivnost. Njihove IC<sub>50</sub> vrijednosti bile su veće od 1000  $\mu$ M.
3. Daljnja biološka ispitivanja spojeva mogla bi pokazati da derivati itakonske kiseline mogu poslužiti kao ishodni spojevi za daljnje modifikacije i derivatizacije strukture s ciljem razvijanja snažnijih antikancerogenih lijekova.

## 7. LITERATURA

Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, 2013, 21, 143–152.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U.S. A.*, 1993, 90, 7915–7922.

Bambuskova M, Gorvel L, Lampropoulou V, Sergushichev A, Loginicheva E, Johnson K, Korenfeld E, Mathyer ME, Kim H, Huang L, Duncan D, Bregman H, Keskin A, Santeford A, Apte RS, Sehgal R, Johnson B, Amarasinghe GK, Soares MP, Satoh T, Akira S, Hai T, Guzman Strong C, Auclair C, Roddy TP, Biller SA, Jovanovic M, Klechevsky E, Stewart KM, Randolph GJ, Artyomov M. Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the I $\kappa$ B $\zeta$ –ATF3 inflammatory axis. *Nature*, 2018, 556, 501–504.

Bast A, Haenen GR. Ten misconceptions about antioxidants. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(8), 430-436.

Berg RH, Preuss ML, Cameron JC, Jez JM. Immunolocalization of glutathione biosynthesis enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 75, 9-13.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 2012, 5, 9–19.

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958, 181, 1199–1200.

Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76, 703-716.

Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential Antiatherogenic Mechanisms of Ascorbate (Vitamin C) and  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E). *Circ Res*, 2000, 87, 349-354.

Combs GF, The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health. *New York, Elsevier Academic Press*, 2008, str. 3, 42, 48, 99-104, 147, 158, 159, 182, 193-198, 239, 242.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 569, 570, 583, 606, 631-640, 649-652, 654, 657.

Costa D, Gomes A, Lima JLFC., Fernandes E. Singlet oxy-gen scavenging activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Redox Rep*, 2008, 13, 153.

Costa D, Vieira A, Fernandes E. Dipyron and aminopyrine are effective scavengers of reactive nitrogen species. *Redox Rep*, 2006, 11, 136–142.

Domínguez E, Laborra C, Linaza, A, Madoz A, Katime IA. A series of mono and diesters of itaconic acid: synthesis and structural determination. *Monatsh Chem*, 1989, 120, 743–748.

Domitrović R. Vitamin C u prevenciji i liječenju bolesti. *Biochemia medica*, 2006, 16, 107-125.

Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 2002, 82, 47-95.

Francetić I. i sur. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 485-520.

Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. Nutritional oncology. *Academic Press*, 2006, str. 97, 513-516, 545-553.



Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48, 412-422.

Klein EA, Thompson IM, Lippman SM, Goodman PJ, Albanes D, Taylor PR, Coltman C. SELECT: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial: rationale and design. *Prost Canc Prostatic Dis*, 2000, 3, 145-151.

Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M, Horinouchi S. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1999, 9112–9117.

Litescu SC, Eremia S, Radu GL. Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. *Bio-Farms for Nutraceutical*, 2010, 18, 241-249.

López-Alarcón C, Denicolab A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 2013 , 763, 1-10.

Mills EL, Ryan DG, Prag HA, Dikovskaya DA, Menon D, Zaslona Z, Jedrychowski MP, Costa AS, Higgins M, Hams E, Szpyt J, Runtsch MC, King MS, McGouran JF, Fischer R, Kessler BM, McGettrick AF, Hughes MM, Carroll RG, Booty LM, Knatko EV, Meakin PJ, Ashford MLJ, Modis LK, Brunori G, Sévin DS, Fallon PG, Caldwell ST, Kunji ERS, Chouchani ET, Frezza C, Dinkova-Kostova AT, Hartley RC, Murphy MP, O'Neill LA. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*, 2018, 556, 113-117.

Minari R, Bordi P, Tiseo M. Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer: review on emerged mechanisms of resistance. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5, 695–708.

Mintas M. Medicinska kemija protutumorskih lijekova. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 16, 116, 118, 121, 140, 141, 144-147, 150.

Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J*, 2003, 2, 1-10.

Nayak PS, Narayana B, Sarojini BK, Sheik S, Shashidhara KS, Chandrashekar KR. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of imides, pyridazines, and imidazoles derived from itaconic anhydride for potential antioxidant and antimicrobial activities. *J Taibah Univ Sci*, 2016, 10, 823–838.

Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants and their reaction mechanism. *RSC Adv*, 2015, 5, 27986-28006.

Palbociclib, Sažetak opisa svojstva lijeka, 2021., [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kisqali-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kisqali-epar-product-information_en.pdf), pristupljeno 18. 1. 2021.

Pavić K, Perković I, Cindrić M, Pranjić M, Martin-Kleiner I, Kralj M, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Katsori AM, Zorc B. Novel semicarbazides and ureas of primaquine with bulky aryl or hydroxyalkyl substituents: Synthesis, cytostatic and antioxidative activity. *Eur J Med Chem*, 2014, 86, 502-514.

Pavić K, Perković I, Gilja P, Kozlina F, Ester K, Kralj M, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Design, synthesis and biological evaluation of novel primaquine-cinnamic acid conjugates of amide and acylsemicarbazide type. *Molecules*, 2016, 21, 1629–1653.

Perčić L. Antitumorsko djelovanje odabranih vitamina. Zagreb, 2017.

Perković I, Antunović M, Marijanović I, Pavić K, Ester K, Kralj M, Vlainić J, Kosalec I, Schols D, Hadjipavlou-Litina D, Pontiki E, Zorc B. Novel urea and bis-urea primaquine derivatives with hydroxyphenyl and halogenphenyl substituents: synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem*, 2016, 124, 622–636.

Perković I, Beus M, Schols D, Persoons L, Uzelac L, Kralj M, Zorc B. Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents. *Mol Divers*, 2020, 1-14.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 2008, 4, 89–96.

Rajić Z. Odabrana poglavlja farmaceutske kemije, interna skripta, neobjavljena literatura

Ribociclib, Sažetak opisa svojstava lijeka, 2021,  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kisqali-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kisqali-epar-product-information_en.pdf), pristupljeno 18.1.2021.

Sadler JM, Strain JJ, Caballero B. Encyclopedia of human nutrition, *Academic Press*, 1991, str 147.

Shadidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18(B), 757-781.

Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh V. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev*, 2013, 12, 376–390.

Stepanić V, Matijašić M, Horvat T, Verbanac D, Kučerová-Chlupáčová M, Saso L, Žarković N. Antioxidant Activities of Alkyl Substituted Pyrazine Derivatives of Chalcones-In Vitro and In Silico Study. *Antioxidants*, 2019, 8(4), 90.

Štefan L, Tepšić T, Zavidović T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.

Verbaanderd C, Maes H, Schaaf MB, Sukhatme VP, Pantziarka P, Sukhatme V, Agostinis P, Bouche G. Repurposing drugs in oncology (ReDO) – chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *eCancer*, 2017, 11, 781.

Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 1-8, 10, 14-17, 20-24.

Wanga X, Lia X, Chen D. Evaluation of Antioxidant Activity of Isoferulic Acid in vitro. *Natural Product Communications*, 2011, 6, 1285 – 1288.

Weinstein SJ, Wright ME, Lawson KA, Snyder K, Männistö S, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Serum and dietary vitamin E in relation to prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16, 1253-1259.

Zerkowski JA, Solaiman DKY. 2-Fatty acrylic acids: New highly derivatizable lipophilic platform molecules. *J Am Oil Chem Soc*, 2014, 91, 1225-1233.

Zorc B, Perković I, Pavić K, Rajić Z, Beus M. Primaquine derivatives: Modifications of the terminal amino group. *Eur J Med Chem*, 2019.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

Lucija Škarić

### **Određivanje antioksidacijske aktivnosti derivata itakonske kiseline**

Stanice tumora obilježava disbalans osnovnih staničnih regulacijskih mehanizama, a posljedica toga je njihova nenormalna proliferacija, nekontrolirani rast i dioba. Disbalans oksidacijskih i antioksidacijskih mehanizama, u korist oksidacije naziva se oksidacijskim stresom. Tim procesom nastaju slobodni radikali. Prisutnost slobodnih radikala može uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, može potaknuti citotoksično djelovanje, inducirati mutacije, kromosomske aberacije i naposljetku dovesti do razvoja tumora. U ovom je radu ispitivana antioksidacijska aktivnost 10 novosintetiziranih spojeva. Sintetizirani spojevi derivati su itakonske kiseline i antimalarika primakina, klorokina i meflokina, kao i konjugati itakonske kiseline i fluoroanilina, piridina i indola. Sintetizirani su kao potencijalni antitumorski i antivirusni agensi. Odabrana je DPPH metoda kojom se brzo i jednostavno procjenjuje antioksidacijska aktivnost u složenijim biološkim uzorcima. DPPH metoda uspostavljena je korištenjem dva poznata spoja s antioksidacijskom aktivnošću, vitaminom C i Troloxom. Potom su standardi i ispitivani spojevi otopljeni u DMSO otapalu do koncentracije od 50 mM, te su radne otopine pripremljene u etanolu u seriji razrjeđenja (1 mM - 0,5 nM). Izmjerena im je apsorbancija i izračunata vrijednost antioksidacijske aktivnosti u odnosu na pozitivnu kontrolu. Ispitivani konjugati itakonske kiseline u DPPH testu nisu pokazali antioksidacijsku aktivnost. Njihove IC<sub>50</sub> vrijednosti bile su veće od 1000 μM.

Ključne riječi: tumori, derivati itakonske kiseline, DPPH metoda, antioksidacijska aktivnost

### **Determining antioxidant activity of itaconic acid derivatives**

Tumor cells are characterized by the imbalance of basic cellular regulation mechanisms, and the result is abnormal proliferation, uncontrolled growth, and division. The disbalance between oxidative and antioxidative mechanisms in favor of oxidation is called oxidation stress. This process creates free radicals. The presence of free radicals can cause lipid peroxidation, damage to DNA and proteins, stimulation of cytotoxic actions, induction of mutations, chromosomal aberrations, which will eventually lead to tumor development. In this paper, the antioxidant activity of 10 newly synthetic compounds were examined. Synthesized compounds are derivatives of itaconic acid and anti-malarial drugs: primaquine, chloroquine and mefloquine, as well as conjugates of itaconic acid and fluoroaniline, pyridine and indole. They are synthesized as potential anticancer and antiviral agents. A DPPH method was chosen to assess antioxidant activity quickly and easily in more complex biological samples. The DPPH method was established using two known compounds with antioxidant activity, vitamin C and Trolox. The standards and test compounds were dissolved in the DMSO solvent to a concentration of 50 mM. The stock solutions were then prepared in ethanol in a dilute series (1 mM - 0.5 nM). They were measured for absorbance and the value of antioxidant activity was calculated in relation to positive control. The examined itaconic acid conjugates in the DPPH test showed no antioxidant activity. Their IC<sub>50</sub> values were greater than 1000 μM.

Keywords: tumours, itaconic acid derivatives, DPPH method, antioxidant activity

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DERIVATA ITAKONSKE KISELINE

Lucija Škarić

#### SAŽETAK

Stanice tumora obilježava disbalans osnovnih staničnih regulacijskih mehanizama, a posljedica toga je njihova nenormalna proliferacija, nekontrolirani rast i dioba. Disbalans oksidacijskih i antioksidacijskih mehanizama, u korist oksidacije nazivamo oksidacijskim stresom. Tim procesom nastaju slobodni radikali. Prisutnost slobodnih radikala može uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina, može potaknuti citotoksično djelovanje, inducirati mutacije, kromosomske aberacije i naposljetku dovesti do razvoja tumora. U ovom je radu ispitivana antioksidacijska aktivnost 10 novosintetiziranih spojeva. Sintetizirani spojevi derivati su itakonske kiseline i antimalarika primakina, klorokina i meflokina, kao i konjugati itakonske kiseline i fluoroanilina, piridina i indola. Sintetizirani su kao potencijalni antitumorski i antivirusni agensi. Odabrana je DPPH metoda kojom se brzo i jednostavno procjenjuje antioksidacijska aktivnost u složenijim biološkim uzorcima. DPPH metoda uspostavljena je korištenjem dva poznata spoja s antioksidacijskom aktivnošću, vitaminom C i Troloxom. Potom su standardi i ispitivani spojevi otopljeni u DMSO otapalu do koncentracije od 50 mM, te su radne otopine pripremljene u etanolu u seriji razrjeđenja (1 mM - 0,5 nM). Izmjerena im je apsorbancija i izračunata vrijednost antioksidacijske aktivnosti u odnosu na pozitivnu kontrolu. Ispitivani konjugati itakonske kiseline u DPPH testu nisu pokazali antioksidacijsku aktivnost. Njihove IC<sub>50</sub> vrijednosti bile su veće od 1000 μM.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 15 grafičkih prikaza, 5 tablica, 49 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: tumori, derivati itakonske kiseline, DPPH metoda, antioksidacijska aktivnost

Mentor: **Prof. dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Komentor: **Dr. sc. Mario Matijašić**, znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Izv. prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Mario Matijašić**, znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of medical biochemistry and haematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### DETERMINING ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ITACONIC ACID DERIVATIVES

Lucija Škarić

#### SUMMARY

Tumor cells are characterized by the imbalance of basic cellular regulation mechanisms, and the result is abnormal proliferation, uncontrolled growth, and division. The disbalance between oxidative and antioxidative mechanisms in favor of oxidation is called oxidation stress. This process creates free radicals. The presence of free radicals can cause lipid peroxidation, damage to DNA and proteins, stimulation of cytotoxic actions, induction of mutations, chromosomal aberrations, which will eventually lead to tumor development. In this paper, the antioxidant activity of 10 newly synthetic compounds were examined. Synthesized compounds are derivatives of itaconic acid and anti-malarial drugs: primaquine, chloroquine and mefloquine, as well as conjugates of itaconic acid and fluoroaniline, pyridine and indole. They are synthesized as potential anticancer and antiviral agents. A DPPH method was chosen to assess antioxidant activity quickly and easily in more complex biological samples. The DPPH method was established using two known compounds with antioxidant activity, vitamin C and Trolox. The standards and test compounds were dissolved in the DMSO solvent to a concentration of 50 mM. The stock solutions were then prepared in ethanol in a dilute series (1 mM - 0.5 nM). They were measured for absorbance and the value of antioxidant activity was calculated in relation to positive control. The examined itaconic acid conjugates in the DPPH test showed no antioxidant activity. Their IC<sub>50</sub> values were greater than 1000 μM.

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

Thesis includes: 42 pages, 15 figures, 5 tables and 49 references. Original is in Croatian language.

Keywords: tumours, itaconic acid derivatives, DPPH method, antioxidant activity

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-Mentor: **Mario Marijašić, Ph.D. Research associate**, University of Zagreb School of Medicine

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Mario Marijašić, Ph.D. Research associate**, University of Zagreb School of Medicine