

# Ispitivanje utjecaja derivata itakonske kiseline na koncentraciju tiolnih skupina ljudskoga seruma

---

Mavrić, Luka

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:163:930090>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-09**



Repository / Repozitorij:

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



**Luka Mavrić**

**Ispitivanje utjecaja derivata itakonske kiseline na koncentraciju tiolnih skupina ljudskoga seruma**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj je diplomski rad prijavljen na predmetu Biokemija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na uloženom trudu, savjetima i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. BIOKEMIJA TIOLA I NJIHOVA ULOGA U ANTIOKSIDACIJSKOJ OBRANI STANICE.....	1
1.1.1. Oksidacijske modifikacije tiola.....	2
1.1.2. Reaktivne kisikove vrste – nastajanje i funkcija u stanju ravnoteže.....	3
1.1.3. Oksidacijski stres .....	5
1.1.4. Sustavi antioksidacijske obrane .....	6
1.1.5. Tiol-peroksidaze .....	7
1.1.6. Glutation i tioredoksin .....	10
1.2. RAZVOJ LIJEKA – <i>IN SILICO</i> I <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJA .....	13
1.2.1. <i>In silico</i> ispitivanja i visokoprotočni probir .....	13
1.2.2. <i>In vitro</i> ispitivanja.....	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Materijali .....	18
3.1.1. Uzorci.....	18
3.1.2. Uređaji i kemikalije.....	20
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Načelo metode s Ellmanovim reagensom.....	21
3.2.2. Određivanje promjene koncentracije ukupnih tiolnih skupina .....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1. Rezultati .....	23
4.1.1. Koncentracije tiola bez utjecaja ispitivanih derivata .....	23
4.1.2. Apsolutne promjene koncentracija tiola uzrokovane ispitivanim derivatima.....	24
4.1.3. Relativne promjene koncentracija na različitim temperaturama .....	26
4.2. Rasprava.....	27
5. ZAKLJUČCI.....	30
6. LITERATURA .....	31
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	36
8. PRILOZI .....	38
8.1. Kratice .....	38
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

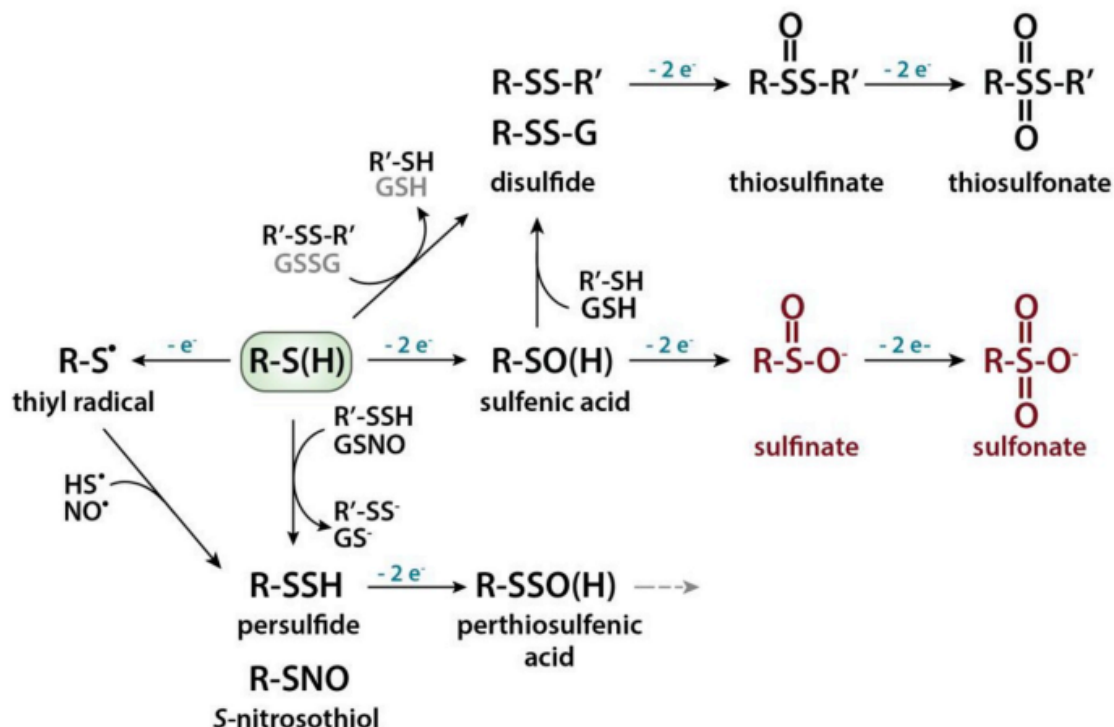
## 1. UVOD

### 1.1. BIOKEMIJA TIOLA I NJIHOVA ULOGA U ANTIOKSIDACIJSKOJ OBRANI STANICE

Tioli su organski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže -SH skupinu vezanu za atom ugljika. Također su poznati pod nazivom merkaptani (engl. *capture mercury* – hvataju živu) zbog toga što formiraju stabilne spojeve s teškim metalima. Imaju usporediva svojstva sa svojim analogima alkoholima, koji umjesto -SH skupine imaju -OH skupinu. U odnosu na alkohole, tioli su skloniji deprotonaciji, iako je kisik elektronegativniji od sumpora. Uzrok tomu je S-H veza koja je slabija od O-H veze, ali i veća stabilnost tiolatnog aniona ( $R-S^-$ ) u odnosu na alkoksidni anion ( $R-O^-$ ). Tiolatni anion je stabilniji jer se negativni naboj na sumporu može delokalizirati preko većeg prostora nego na kisiku (Wade, 2012).

Tiolna skupina prisutna je kod ljudskih proteina u bočnom ogranku aminokiseline cisteina. Radi se o aminokiselini čiji bočni ogranak čini metilna skupina na koju je vezana tiolna skupina (Berg i sur., 2010). Kao što je i očekivano s obzirom na prirodu tiolne skupine, cistein je podložan deprotonaciji, što povećava njegovu reaktivnost u nukleofilnim reakcijama. Tiolna skupina slobodnog cisteina ima  $pK_a$  vrijednost od 8,45. Dakle, u fiziološkim bi uvjetima samo mali udio cisteina trebao imati deprotoniranu tiolnu skupinu. Unatoč tomu, vrlo je teško predvidjeti koji cisteini će u sklopu pojedinih proteina biti koliko reaktivni (Ulrich i Jakob, 2019). Polarne i pozitivno nabijene aminokiseline često stabiliziraju tiolatni anion, snizujući  $pK_a$  vrijednost tiolne skupine cisteina u proteinskoj strukturi (Ferrer-Sueta i sur., 2011). Također, bipolarni karakter  $\alpha$ -uzvojnice smanjuje  $pK_a$  cisteinskih tiolnih skupina i čini bočne ogranke cisteina bližih N-kraju proteina reaktivnijima od onih bližih C-kraju (Kortemme i Creighton, 1995). Osim  $pK_a$  vrijednosti tiolne skupine, reaktivnost bočnog ogranka cisteina ovisi i o njegovoj dostupnosti unutar trodimenzionalne strukture proteina. Reaktivni cisteini često se nalaze u aktivnim središtima enzima. Vezna su mjesta za palmitoilaciju i prenilaciju te visokim afinitetom vežu metale poput željeza i cinka. Ipak, ključno svojstvo tiolatnih aniona je da podliježu nizu reverzibilnih i ireverzibilnih oksidacijskih reakcija (Ulrich i Jakob, 2019).

### 1.1.1. Oksidacijske modifikacije tiola



**Slika 1.** Prikaz oksidacijskih modifikacija tiolne skupine (preuzeto iz Ulrich i Jakob, 2019.)

Tiolatni anion podliježe jednoelektronskoj i dvoelektronskoj oksidaciji. Dvoelektronskom oksidacijom najprije nastaje vrlo reaktivni i nestabilni međuprodukt sulfenska kiselina (R-SOH) koja reagira s obližnjim tiolima stvarajući inter- ili intramolekularne disulfidne mostove (R-SS-R'). Navedeni procesi reverzibilni su, ali u prisutnosti jačih oksidansa sulfenska se kiselina može ireverzibilno oksidirati prvo do sulfinske, a zatim do sulfonske kiseline. Jednoelektronskom oksidacijom tiolatnog aniona nastaje tiolni radikal (R-S $^{\bullet}$ ) koji daljnjim reakcijama može formirati persulfid (R-SSH) ili S-nitrozotiol (R-SNO) (Ulrich i Jakob, 2019). Persulfidi imaju nižu  $pK_a$  vrijednost od tiola te dvoelektronskom oksidacijom stvaraju perthiosulfenske kiseline, nestabilne međuprodukte analogne sulfenskim kiselinama koji podliježu daljnjoj oksidaciji (Heppner i sur., 2018).

Dva cisteina povezana disulfidnim mostom nazivaju se cistinom. Takve su strukture prisutne u proteinima povezujući cisteinske ostatke na istom ili na različitim peptidnim lancima. Prisutnost i mjesto disulfidnih mostova u proteinu igra ključnu ulogu u njihovu strukturiranju i

nastanku biološki aktivne konformacije koja omogućava fiziološku funkciju proteina (Berg i sur., 2010). Stoga stanice ulažu značajnu količinu energije u prevenciju nespecifičnih tiolnih oksidacijskih reakcija, dok s druge strane omogućuju strogo kontrolirano odvijanje tiolnih oksidacijskih reakcija koje imaju fiziološki značajne uloge. Stvaranje disulfidnih mostova u proteinima katalizirano je specijaliziranim enzimima poput oksidoreduktaza i tiol-oksidaza te se odvija u specifičnim staničnim odjeljcima – endoplazmatskom retikulu i međumembranskom prostoru mitohondrija. Kako bi se osiguralo da preostali proteinski tioli ostanu u reduciranom obliku, u citosolu, jezgri i matriksu mitohondrija održavaju se reducirajući uvjeti. Unatoč tomu, prisutne reaktivne kisikove, dušikove i klorove vrste mogu direktno ili indirektno uzrokovati različite tiolne modifikacije koje utječu na enzimsku aktivnost, interakcije među proteinima i sklonost posttranslacijskim modifikacijama (Ulrich i Jakob, 2019).

### **1.1.2. Reaktivne kisikove vrste – nastajanje i funkcija u stanju ravnoteže**

Reaktivne kisikove vrste (ROS – engl. *reactive oxygen species*) igraju značajnu ulogu u humanim fiziološkim i patofiziološkim procesima. Radi se o molekulama s nesparenim valentnim elektronima, odnosno slobodnim radikalima; te o neradikalima koji u strukturi imaju nestabilne kovalentne veze. U pravilu se radi o izrazito nestabilnim elektrofilnim vrstama koje stupaju u reakcije s različitim biološkim molekulama, uključujući proteine, lipide, ugljikohidrate i nukleinske kiseline (Čepelak, 2009).

Nastajanje ROS-a neizbježno je u aerobnom metabolizmu. Naime, u respiracijskom lancu elektroni se na kisik prenose jedan po jedan te dolazi do stupnjevite redukcije kisika i nastajanja vode (Čepelak, 2009). Taj se proces odvija na enzimu citokrom c oksidazi, odnosno kompleksu IV respiratornog lanca. Iako prijenosom četiri elektrona na molekulu kisika nastaje bezopasan produkt (dvije molekule vode), međuprodukti tog prijenosa reaktivne su kisikove vrste, i to superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), koji nastaje prijenosom jednog elektrona, te vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), koji nastaje prijenosom dvaju elektrona na molekulu kisika. Kako ne bi došlo do štetnog djelovanja, ti međuprodukti su čvrsto vezani na citokrom c oksidazi između željezovog i bakrovog iona do potpune redukcije. Ipak, manji dio superoksida i vodikovog peroksida oslobodi se s enzima (Berg i sur., 2010). Osim respiratornog lanca, reaktivne kisikove vrste također nastaju kao posljedica zračenja i kao nusprodukti drugih metaboličkih procesa, primjerice prilikom djelovanja enzima NO-sintetaze, ksantin-oksidaže, flavin-dehidrogenaze, aldehid-oksidaže i dehidrogenaze

dihidroorotične kiseline. Superoksidni radikal također nastaje oksidacijom katekolamina, flavina i feredoksina (Čepelak, 2009). Za razliku od drugih enzima kod kojih su ROS nusprodukti, kod NADPH-oksidaza (NOX) proizvodnja ROS-a primarna je funkcija. Radi se o membranskim proteinima koji prenose elektrone kroz membranu, uz kisik kao konačni akceptor. Time se stvara superoksidni anion. Poznato je 5 izoformi ovog enzima, a prisutne su u velikom broju različitih stanica i u skoro svim tkivima (Brieger i sur., 2018).

Superoksidni anion produkt je većine opisanih procesa nastajanja ROS-a. Vrlo je nestabilan, ali zbog naboja ne prolazi kroz biološke membrane. Spremno reagira s dušikovim (II) oksidom (NO), dajući peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Ipak, vjerojatno najznačajnija reakcija superoksidnog aniona jest reakcija katalizirana superoksid-dismutazom (SOD) (Brieger i sur., 2018). SOD katalizira konverziju dvaju superoksidnih radikala u jednu molekulu vodikovog peroksida i jednu molekulu elementarnog kisika (Berg i sur., 2010).

Vodikov peroksid je neradikal koji također spada u ROS. Za razliku od superoksidnog aniona, prolazi kroz biološke membrane. Podliježe različitim reakcijama kojima stvara reaktivnije spojeve uključujući hipokloritnu kiselinu (HOCl) i hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) (Čepelak, 2009).

Hipokloritna kiselina nastaje reakcijom vodikovog peroksida i klora koju katalizira peroksidaza, a uz drugu molekulu vodikovog peroksida daje singlet kisik ( $^1\text{O}_2$ ) (Brieger i sur., 2018).

Hidroksilni radikal nastaje homolitičkom fisijom vodikovog peroksida u prisutnosti radijacije, Fentonovom reakcijom i Haber-Weissovom reakcijom (Čepelak, 2009). Fentonova reakcija je reakcija vodikovog peroksida s  $\text{Fe}^{2+}$ . Dolazi do prijelaza elektrona s iona željeza na peroksid pri čemu se peroksid kida na hidroksilni radikal i hidroksid. U Haber-Weissovoj reakciji hidroksilni radikal i hidroksid nastaju iz vodikovog peroksida i superoksidnog aniona uz  $\text{Fe}^{3+}$  kao katalizator. Sastoji se od dva koraka. Prvi korak je prijelaz elektrona sa superoksidnog aniona na  $\text{Fe}^{3+}$ . Nastaje elementarni kisik i  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  sudjeluje u drugom koraku koji je identičan Fentonovoj reakciji. Dolazi do povratka  $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$ , a otpušteni elektron napada vodikov peroksid, kidajući ga na hidroksilni radikal i hidroksid (Filipovic i Koppenol, 2019; Kehrer, 2000).

Unatoč visokoj reaktivnosti, ROS se u fiziološkim uvjetima nalaze u stanju ravnoteže i obnašaju niz važnih bioloških funkcija. Na staničnoj razini sudjeluju u regulaciji rasta, apoptoze i u drugim signalizacijskim putevima. Neutrofil i makrofagi ih stvaraju kako bi mogli ubijati bakterije. Stvaraju ih primarno pomoću NOX2. Superoksidni anion se brzo dizmutira u vodikov



peroksid. Njega mijeloperoksidazom prevode u hipokloritnu kiselinu koja je oko 50 puta učinkovitija u ubijanju mikroba. U sklopu imunskog sustava ROS također sudjeluju u limitiranju specifičnog imunskog odgovora i u terminaciji upalnog procesa (Brieger i sur., 2018). Još jedan primjer važnosti ROS-a je biosinteza hormona štitnjače. Naime, jod potreban za sintezu transportira se u folikule štitnjače u obliku jodida te se mora oksidirati prije vezanja za tireoglobulin. Oksidacija joda odvija se pomoću enzima tireoperoksidaze uz vodikov peroksid kao kofaktor. Tireoperoksidaza ubrzava i proces vezanja oksidiranog joda na tireoglobulin. Kada je sustav tireoperoksidaze zakočen ili postoji nasljedni nedostatak tog sustava, sinteza hormona štitnjače se u potpunosti obustavlja (Guyton i Hall, 2012).

### **1.1.3. Oksidacijski stres**

Kako bi ROS ostale u fiziološkim koncentracijama, procesi njihovog nastajanja i razgradnje moraju biti u ravnoteži. Ako se ta ravnoteža naruši u korist nastajanja, dolazi do stanja oksidacijskoga stresa koje dovodi do brojnih oštećenja stanica i tkiva (Brieger i sur., 2018).

ROS u suvišku reagiraju sa skoro svim vrstama bioloških molekula. Produkt reakcije slobodnoga radikala i neradikala novi je slobodni radikal koji stupa u novu reakciju. Rezultat je lančana reakcija koja obuhvaća velik broj bioloških molekula i može uzrokovati značajna oštećenja u biološkom okruženju u kojem se odvija. Lančana reakcija naposljetku je prekinuta ako nastali radikal reagira s drugim radikalom. Hidroksilni radikal najreaktivniji je od svih slobodnih radikala nastalih u aerobnom metabolizmu te uzrokuje oksidacijske promjene brojnih različitih staničnih spojeva. Od aminokiselina posebno su osjetljivi prolin, arginin, cistein, histidin i metionin. Posljedice njihovih oksidacijskih promjena uključuju fragmentaciju proteina, sklonost proteolitičkoj razgradnji te križno povezivanje i agregaciju. Lipidi staničnih membrana podliježu lipidnoj peroksidaciji zbog koje membrane postaju porozne i gube akcijski potencijal. Dolazi do promjene funkcije ionskih kanala, inaktivacije enzima i membranskih receptora te gubitka fiziološke funkcije membrane (Čepelak, 2009).

Oksidacija DNA od posebnog je značaja jer može dovesti do mutageneze i karcinogeneze. Mitohondrijska DNA pokazala se posebno osjetljivom na mutacije uzrokovane oksidacijskim stresom zbog nedostatka enzima zaduženih za popravak DNA (Brieger i sur., 2018).

Osim karcinogeneze, ROS sudjeluju u nizu patoloških procesa. Primjerice, imaju ulogu u progresiji različitih neuroloških bolesti. Kod Alzheimerove bolesti amiloid, posebno njegovi

topljivi oblici, mogu dovesti do aktivacije mikroglije. Aktivirane mikroglija stanice proizvode ROS, pridonoseći oštećenju neurona i demenciji. NOX-om uzrokovan oksidativni stres pokazao se značajnim faktorom u propadanju dopaminergičkih neurona kod Parkinsonove bolesti. Također ima ključnu ulogu u razvoju amiotrofične lateralne skleroze (ALS) (Brieger i sur., 2018).

Brojna vaskularna stanja također uključuju djelovanje ROS-a. Superoksid doprinosi hipertenziji smanjujući dostupnost vazodilatatora dušikovog oksida. Monociti i makrofagi aktivirani u aterosklerozi oštećuju susjedne endotelne stanice lučenjem ROS-a. Prilikom reperfuzije ishemičnog tkiva dolazi do naglog povećanja koncentracija kisika što dovodi do prekomjerne aktivnosti enzimskih sustava koji koriste kisik. Stvaraju se povećane količine ROS-a koje su glavni uzrok oštećenja ishemičnog tkiva (Brieger i sur., 2018; Čepelak, 2009).

Oksidacijski stres povezuje se s nizom drugih kliničkih stanja, uključujući idiopatski i membranski glomerulonefritis, plućni emfizem, akutni respiracijski distresni sindrom, autoimune bolesti poput reumatoidnog artritisa, pankreatitis prouzročen masnim kiselinama, i brojne druge (Čepelak, 2009).

#### **1.1.4. Sustavi antioksidacijske obrane**

Kako bi spriječio toksično djelovanje povećane koncentracije ROS-a, organizam je razvio niz mehanizama obrane. Ti mehanizmi djeluju zajednički, a uključuju tri principa djelovanja.

Prvi je sprječavanje nastanka pojedinih vrsta ROS-a. Tu spada održavanje niskog tlaka kisika u tkivima, zatvaranje enzima koji sudjeluju u stvaranju radikala u pojedine stanične odjeljke poput peroksisoma i lizosoma, te vezanje slobodnih iona željeza u komplekse s proteinima čime se sprječava odvijanje Fentonove i Haber-Weissove reakcije. Drugi princip je popravljavanje oštećenja i uklanjanje oštećenih molekula prije nego što svojim nakupljanjem uzrokuju nova oštećenja. Treći princip je uklanjanje nastalih vrsta. U tome sudjeluju antioksidansi poput vitamina C, vitamina E, urata, ubikinona i karotena, te enzimski sustavi.

SOD uklanja superoksidni anion katalizirajući reakciju opisanu u poglavlju 1.3. Prisutna je u skoro svim stanicama biljaka i životinja, a kod ljudi postoje tri oblika: mitohondrijski, citosolski i izvanstanični (Čepelak, 2009).

Razgradnju vodikovog peroksida katalizira enzim katalaza. Radi se o hemoproteinu koji dvije molekule vodikovog peroksida prevodi u jednu molekulu elementarnog kisika i dvije molekule vode. Smještena je većinom u peroksisomima, a manje u citoplazmi. Razgrađuje

primarno vodikov peroksid koji je nastao u peroksisomima djelovanjem glikolat-oksidge (Berg i sur., 2010; Čepelak, 2009).

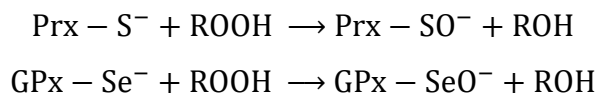
### 1.1.5. Tiol-peroksidaze

Tiol-peroksidaze glavni su enzimi za redukciju vodikovog peroksida nastalog djelovanjem SOD-a, ali i ogranskih peroksida poput lipidnih peroksida stanične membrane, te peroksinitrita. Uključuju dvije skupine enzima: glutation-peroksidaze (GPx) i peroksiredoksine (Prx). Obje skupine, reducirajući perokside, oksidiraju dvije tiolne skupine u disulfid. Te dvije tiolne skupine najčešće se nalaze na glutationu ili tioredoksinu (Čepelak, 2009; Flohé i sur., 2011).

GPx se u ljudskom organizmu nalazi u 4 oblika: stanična (GPx1), gastrointestinalna (GPx2), plazmatska (GPx3) i fosfolipid-hidroperoksid-glutation-peroksidaza (GPx4) (Flohé i sur., 2011). Kod Prx je u sisavaca eksprimirano 6 različitih izoformi koje pripadaju različitim podskupinama. PrxI, PrxII, PrxIII i Prx IV spadaju u 2-Cys Prx, PrxV je atipični 2-Cys Prx, dok je PrxVI 1-Cys Prx (Rhee, 2016).

#### 1.1.5.1. Antioksidacijska aktivnost tiol-peroksidaza

Dok se kod peroksiredoksina u katalitičkom središtu nalazi tzv. peroksidatski cistein (C<sub>P</sub>), 4 oblika humane GPx zamijenila su ga selenocisteinom (Sec) – analogom cisteina kod kojeg se na mjestu sumpora nalazi atom selenija. U prvom koraku taj bočni ogranak stupa u reakciju s peroksidom, oksidirajući se pritom do intermedijera sulfenske, odnosno selenenske kiseline:



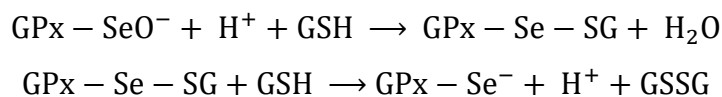
Kako bi se taj korak odvijao prihvatljivom brzinom, Cys/Sec se mora nalaziti u deprotoniranom stanju. Sec je ovdje u prednosti budući da i u slobodnom obliku ima pK<sub>a</sub> oko 5 (Flohé i sur., 2011). Ipak, zahvaljujući strogo očuvanom slijedu aminokiselina koje čine njegov mikrookoliš, Prx održavaju C<sub>P</sub> deprotoniranim. Za nekolicinu Prx utvrđene su pK<sub>a</sub> vrijednosti oko 6 (Nelson i sur., 2008).

I GPx i Prx u stanju su reducirati široki spektar peroksida, uključujući H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, primarne, sekundarne i tercijarne organske perokside, te peroksinitrit. reakcija s peroksinitritom pokazala se

izuzetno brzom kod nekih Prx (Nauser i sur., 2004). Brzina reakcije općenito je najveća za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a najmanja za tercijarne organske peroksidge. Iznimka je GPx4, koji se nalazi u obliku monomera integriranog u biomembrane, i zaslužan je za redukciju lipidnih peroksidge (Flohé i sur., 2011).

Intermedijeri nastali u prvom koraku vrlo su nestabilni i skloni hiperoksidaciji selenenske, odnosno sulfenske kiseline u seleninsku, odnosno sulfinsku kiselinu, što bi dovelo do inaktivacije enzima. Kako bi se izbjegle hiperoksidacija, 2-Cys Prx sadrže drugi cistein zvan C<sub>R</sub> (eng. *resolving cysteine*). C<sub>R</sub> jedne molekule reagira s C<sub>P</sub> druge, stvarajući homodimere povezane disulfidnim vezama. Atipični 2-Cys Prx razlikuje se po tome što C<sub>R</sub> reagira s C<sub>P</sub> iste molekule, čime stvori intramolekularnu disulfidnu vezu. 1-Cys Prx ne sadrži C<sub>R</sub> pa stvara disulfide s cisteinima drugih proteina i malim tiolnim molekulama (Rhee, 2016). Mehanizam zaštite GPx od hiperoksidacije nije još dokazan, ali se najizglednijim objašnjenjem smatra reakcija s jednom od amidnih skupina koje se nalaze u blizini katalitičkog središta. Produkt takve reakcije bio bi selenil-amid (Flohé i sur., 2011).

Sljedeći korak je redukcija katalitičkog središta i povratak enzima u početno stanje. U redukciji sudjeluju dvije SH skupine koje se pritom oksidiraju u disulfid. Porijeklo SH skupina razlikuje se među pojedinim enzimima. GPx1 se gotovo isključivo reducira pomoću GSH-a. S obzirom da glutation ima jednu tiolnu skupinu, potrebne su dvije molekule glutationa za redukciju jedne molekule GPx1. Prvi glutation napada oksidirani selenij te nastaje selenil-sulfidna veza. Tu vezu napada druga molekula glutationa, stvarajući simetrični disulfid tzv. GSSG, i vraćajući enzim u početno stanje:



Specifičnost prema glutationu slabije je izražena kod GPx2 i GPx3, a najslabija je kod GPx4, koji može reagirati s mnoštvom različitih tiolnih supstrata (Flohé i sur., 2011). U nekim slučajevima GPx4 reagira i sa SH skupinom druge GPx4 molekule. Time se polimerizira, gubi enzimsku aktivnost i postaje strukturni protein. Taj proces pokazao se neophodnim u spermiogenezi (Flohé, 2007).

Svi 2-Cys Prx fiziološki se reduciraju redoksinima, primarno tioredoksinom. S obzirom da se radi o proteinima s dva cisteina u CxxC strukturi (pri čemu je x bilo koja druga aminokiselina),

dovoljan je jedan redoksin za redukciju jednog atipičnog 2-Cys Prx, odnosno dvije za redukciju jednog homodimera 2-Cys Prx. Supstrati koji sudjeluju u redukciji 1-Cys Prx nisu još identificirani (Flohé i sur., 2011). Osim malih tiolnih molekula i SH skupina proteina, kao potencijalni supstrat pokazao se i vitamin C (Monteiro i sur., 2007).

#### **1.1.5.2. Druge funkcije tiol-peroksidaza**

Činjenica da je tako velik broj enzima zadužen za istu funkciju, kao i činjenica da pojedini peroksiredoksini nisu evolucijom izgubili sklonost hiperoksidaciji i posljedičnoj inaktivaciji, upućuju da antioksidacijska obrana nije jedina funkcija ovih enzima.

Već je spomenuta važnost polimeriziranog GPx4 za spermiogenezu. Konkretna funkcija nije još dokazana, ali se smatra važnom komponentom mitohondrijske kapsule (Flohé, 2007).

Sekundarna funkcija peroksiredoksina proizlazi iz funkcije  $H_2O_2$  kao signalne molekule. Iako se ispostavilo da  $H_2O_2$  sudjeluje u nizu signalizacijskih puteva oksidirajući cisteinske ogranke ciljnih proteina, nijedna od tih reakcija se ne odvija brže od  $43 M^{-1}s^{-1}$ , što je presporo u odnosu na reakcije  $H_2O_2$  s tiol-peroksidazama te je nužno sudjelovanje Prx u signalizaciji (Flohé i sur., 2011). To sudjelovanje opisuju tri modela koji nisu međusobno isključivi. U prvom modelu  $H_2O_2$  ipak direktno oksidira ciljne proteine. To je omogućeno privremenom hiperoksidacijom Prx. Pokazalo se da je ATP-ovisan enzim sulfiredoksin u stanju obrnuti hiperoksidaciju Prx i vratiti njegovu aktivnost. Na ovaj se način, kod povećane proizvodnje  $H_2O_2$ , Prx inaktivira dovoljno dugo da  $H_2O_2$  oksidira ciljne proteine. Prema drugom modelu aktivacija ciljnog proteina se odvija preko Prx. Oksidirani Prx, u obliku sulfenske kiseline ili u obliku disulfida, reagira s cisteinskim ostatkom ciljnog proteina, formirajući međuprodukt s intermolekularnom disulfidnom vezom. Međuprodukt reagira s drugom SH skupinom ciljnog proteina. Time dolazi do oksidacije ciljnog proteina i promjene njegove funkcije, te redukcije Prx. Prema trećem modelu Prx je reduciran tioredoksinom koji onda oksidira ciljni protein (Netto i Antunes, 2016; Rhee, 2016).

### 1.1.6. Glutation i tioredoksin

Glutation i tioredoksin glavne su redukcijske komponente u djelovanju tiol-peroksidaza i važni su za njihovu biološku funkciju.

#### 1.1.6.1. Glutation

Glutation, odnosno  $\gamma$ -glutamylcisteinilglicin, je tripeptid koji sudjeluje kao supstrat u mnogim oksidoredukcijskim reakcijama, a specifičnost mu omogućuju negativan naboj i neuobičajena  $\gamma$ -glutamatna peptidna veza. Ključna komponenta je SH skupina bočnog ogranka cisteina. Ona se u većini reakcija, uključujući i reakciju kataliziranu glutathion-peroksidazama, oksidira te nastaje GSSG. Kako bi se održao omjer koncentracija reduciranoga i oksidiranoga glutathiona, koji je u većini stanica veći od 500, nastali GSSG mora se reducirati. Tu reakciju katalizira FAD-ovisni enzim glutathion-reduktaza (GR) koja prenosi elektrone s koenzima NADPH na disulfid (Berg i sur., 2010; Ulrich i Jakob, 2019).

Primarna stanična funkcija glutathiona je zaštita od oksidacijskog stresa. S obzirom da se u fiziološkim uvjetima samo 2,9 % glutathiona nalazi u reaktivnom deprotoniranom obliku (Reyes i sur., 2018), brzina izravne reakcije glutathiona i  $H_2O_2$  premala je da bi bila biološki značajna. Stoga glutathion primarno djeluje kao reducirajući ekvivalent antioksidacijskim enzimima, uključujući prethodno opisane tiol-peroksidaze (Ulrich i Jakob, 2019).

S-glutathionilacija proteina je drugi način na koji glutathion štiti od oksidacijskog stresa. Glutathion se reverzibilno veže na u fiziološkim uvjetima reducirane SH skupine proteina, štiteći ih od ireverzibilnih oksidacijskih promjena kojima su izloženi u oksidacijskim uvjetima. Prema Hansenu i sur., u stanicama pod oksidacijskim stresom udio S-glutathioniliranih proteina može doseći 15 %, dok je u stanicama bez stresa manji od 0,1 % (Hansen i sur., 2009; Ulrich i Jakob, 2019).

Glutathion također sudjeluje u zaštiti stanica od potencijalno štetnih ksenobiotika. Omogućuje S-glutathionilaciju elektrofila u reakciji koja se, ovisno o svojstvima ksenobiotika, odvija bez enzima ili uz katalizu glutathion-S-transferaza. Glutathion smanjuje i toksičnost reaktivnih metalnih iona poput  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^+$  i  $Pb^{2+}$  formirajući komplekse s njima (Ulrich i Jakob, 2019).

Glutathion ima ulogu i u oksidativnom smatanju proteina. Oksidativno smatanje proteina odvija se u endoplazmatskom retikulu (ER) i uključuje kidanje nepravilno formiranih i sklapanje nativnih disulfidnih mostova. Posredovano je protein disulfid izomerazom (PDI). Glutathion

reducira PDI kako bi mogao reducirati nenativne disulfidne mostove na proteinima. Reducirani oblik PDI-a aktivira i Ero1, FAD-ovisnu tiol-oksidazu koja proizvodi značajne količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na taj način glutation zapravo neizravno povećava količinu ROS-a u ER-u. S obzirom da se glutation ne može sintetizirati u samom ER-u, dolazi iz citosola olakšanom difuzijom kroz Sec61 kanale koji su indirektno inhibirani aktivacijom Ero1, čime se regulira količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ER-u (Ponsero i sur., 2017; Ulrich i Jakob, 2019).

Glutaredoksin koristi glutation za prijelaz u reducirani oblik koji je katalitički aktivan i koji sudjeluje u biosintezi Fe-S proteinskih kompleksa i u redukciji brojnih enzima, ali i deglutationilaciju proteina na koje se vezao GSH (Xiao i sur., 2019).

### 1.1.6.2. Tioredoksin

Tioredoksin (Trx) je protein koji se sastoji od jednog peptidnog lanca. Karakteriziraju ga dva cisteina u aktivnom središtu koji mu omogućuju oksidoredukcijsko djelovanje. Kod sisavaca se razlikuju citoplazmatska (Trx1), mitohondrijska (Trx2) i krnja izoforma (Trx80) koja nema oksidoredukcijska svojstva (Lee i sur., 2013).

Analogno GSH i GR, Trx se reducira pomoću tioredoksin-reduktaze (TrxR). TrxR je FAD-ovisna oksidoreduktaza, formira antiparalelne homodimere koji na predzadnjoj poziciji C-kraja imaju selenocistein (Gladyshev i sur., 1996). Zahvaljujući reaktivnosti i izloženosti selenocisteina, TrxR ima nisku specifičnost i može reducirati niz drugih supstrata. Da bi došlo do redukcije supstrata, oba selenocisteina moraju biti reducirana, a reduciraju se primanjem elektrona s NADPH (Lee i sur., 2013).

Kao i glutation, primarna funkcija Trx je zaštita stanice od negativnih učinaka oksidacijskog stresa. Trx redukcijom različitih reduktivnih enzima omogućuje njihovu aktivnost. Osim već spomenutih tiol-peroksidaza, reducira i ribonukleotid-reduktaze (RNR) koje prevode ribonukleotide u deksiribonukleotide i time omogućuju sintezu DNA, te metionin-sulfoksid-reduktaze (Msr) koje reduciraju metionin-sulfoksid u metionin (Lee i sur., 2013).

Osim reduktivnih enzima, Trx sudjeluje u regulaciji velikog broja različitih staničnih signalizacijskih puteva. Ima, primjerice, kompleksnu ulogu u regulaciji apoptoze. U reduciranom obliku veže apoptoza-signalizirajuću kinazu 1 (ASK1) te je inaktivira i usmjerava na ubikvitinaciju i razgradnju. To djelovanje oslabljeno je u prisutnosti Txnip (engl. *thioredoxin-interacting protein*)

koji se veže na kompleks Trx i ASK1 te oslobađa i reaktivira ASK1. S druge strane, Trx potiče apoptozu aktivirajući homolog fosfataze i tenzina (PTEN). Inaktivni oblik PTEN-a ima intramolekularnu disulfidnu vezu koju Trx reducira. Time se PTEN aktivira i počinje inhibirati fosforilaciju Akt signalnog puta koji potiče stanični rast i proliferaciju. Inhibicijom staničnog rasta i proliferacije, PTEN indirektno potiče apoptozu. Trx stupa u interakcije s brojnim drugim signalizacijskim molekulama i transkripcijskim faktorima, uključujući NF- $\kappa$ B, protein 21, protein 53, hipoksija-inducibilni transkripcijski faktor-1  $\alpha$  i mnoge druge (Lee i sur., 2013; Lillig i Holmgren, 2007).



## 1.2. RAZVOJ LIJEKA – *IN SILICO* I *IN VITRO* ISPITIVANJA

### 1.2.1. *In silico* ispitivanja i visokoprotočni probir

Sekvenciranjem ljudskoga genoma broj identificiranih potencijalnih bioloških meta za lijekove povećao se za nekoliko redova veličine. Zbog toga se razvila potreba za tehnologijama i sustavima kojima bi se identificirao veći broj spojeva koji su dobre početne točke za razvoj novih lijekova. S tim ciljem brojne su farmaceutske tvrtke razvile automatizirane sustave visokoprotočnog probira (engl. *high throughput screening*, HTS) kojima je moguće ispitati stotine ili tisuće spojeva dnevno i suziti izbor prije trošenja resursa na daljnju optimizaciju spojeva (Verbanac i sur., 2005).

Veličine početnih baza podataka kreću se između  $10^4$  i  $10^6$  pojedinačnih spojeva (Blay i sur., 2020). Kako bi se HTS mogao provesti, potrebno je prvo sastaviti reprezentativni set (RS) spojeva. Verbanac i sur. navode korake kojima se početna baza podataka sa spojevima može svesti na RS. Najprije je potrebno odstraniti multiplikate molekula. Multiplikati uključuju različite acidobazne oblike, tautomere, stereoizomere i smjese. Mogu se ukloniti korištenjem standardiziranog zapisa kao što je SMILES (eng. *Simplified Molecular Input Line Entry System*) ([www.daylight.com](http://www.daylight.com)). Time se dobije pripremljena baza podataka koja se dalje filtrira (Verbanac i sur., 2005).

Cilj filtriranja je eliminacija spojeva čija fizikalna i kemijska svojstva onemogućuju zadovoljavajući ADMET (apsorbcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost). Jedan od predloženih načina filtriranja je LR5 (eng. *Lipinski rule of five*). LR5 uključuje 4 kriterija:

1.  $M_r > 500$
2.  $ClogP > 5$
3. broj donora vodikovih veza  $> 5$
4. broj akceptora vodikovih veza  $> 10$

Navedena svojstva upućuju na slabu apsorbciju i biodostupnost prilikom oralnog unosa (Lipinski i sur., 2001). Odbacuju se molekule za koje vrijede više od dva navedena kriterija (Verbanac i sur., 2005).

Filtrirana baza podataka obično i dalje sadrži preveliki broj molekula. Stoga se slične molekule grupiraju u skupine (engl. *clusters*) te se iz svake skupine jedna molekula predstavnik uključi u konačni RS. Za utvrđivanje sličnosti molekula razvijeni su različiti algoritmi kao što su

Jarvis-Patrickov algoritam i dbelus (Butina, 1999; Jarvis i Patrick, 1973; van Drie i Lajines, 1998; Verbanac i sur., 2005).

Jedna od metoda *in silico* probira je virtualna simulacija vezanja za ciljnu molekulu. Probirom se nastoje predvidjeti značajke vezanja ispitivane i ciljne molekule, primjerice afinitet i mjesto vezanja. Budući da različita ionska stanja, tautomeri i stereoizomeri imaju različitu dinamiku vezanja, potrebno je najprije prevesti molekulu u odgovarajuće ionsko stanje i uzeti u obzir sve relevantne tautomere i stereoizomere. Potom se iz standardiziranog 2D zapisa generira 3D model. Za samu simulaciju mogu se koristiti različiti algoritmi koji moraju uzeti u obzir brojne strukturne karakteristike obiju molekula, uključujući pozicije vodikovih atoma, orijentaciju hidroksilnih skupina u aktivnom mjestu, molekule vode i fleksibilnost strukture (Verbanac i sur., 2005).

### 1.2.2. *In vitro* ispitivanja

Osim *in silico* ispitivanja, potrebno je provesti i odgovarajuća *in vitro* ispitivanja. Danas je dostupno mnoštvo različitih tehnologija i metoda koje se mogu koristiti u sklopu probira visokog protoka. Odabir i prilagodba metode ovise o svojstvu koje se ispituje i primjeni koju bi konačni lijek imao. Ispitivati se može interakcija s ciljnim proteinom. To može podrazumijevati sposobnost vezanja, ali i utjecaj na funkciju ili konformaciju ciljnog proteina. Za ispitivanje samog vezanja danas se koristi niz metoda uključujući: NMR koji može biti ligand-detektirajući i protein-detektirajući, rezonancu površinskih plazmona, masenu spektrometriju, diferencijalnu skenirajuću fluorimetriju (engl. *differential scanning fluorimetry*), DNA-kodirane biblioteke (engl. *DNA-encoded library*) i rentgensku kristalografiju (Blay i sur., 2020).

Također se često ispituje inhibicija aktivnosti pojedinih enzima, obično metodom kompeticije, gdje ispitivani derivat istiskuje poznati supstrat ili ligand s enzima.

Osim specifičnih biokemijskih interakcija, probir se može provoditi na temelju sposobnosti spojeva da induciraju određeni stanični fenotip. Za tu svrhu provode se ispitivanja na staničnim linijama. Važno je odabrati pravu staničnu liniju za potrebe pojedinog testa. Ispitivati se može vijabilnost stanice odnosno citotoksičnost spoja, utjecaj spoja na pojedine signalne puteve te utjecaj na interakcije među pojedinim proteinima. Za određivanje vijabilnosti stanica popularne su metode s metaboličkim bojama. Stanice se tretiraju spojem, primjerice 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromidom (MTT), koji poprima boju nakon

konverzije nekim staničnim metaboličkim procesom te se mjerenjem intenziteta te boje odredi broj živih stanica (Stoddart, 2011). Za ostala ispitivanja na staničnim linijama danas su najpopularnije mikroskopske metode i protočna citometrija, kojima je moguće uz korištenje fluorescentnih obilježivača pratiti mnoštvo različitih staničnih svojstava i procesa, uključujući razinu proteina, lokalizaciju i translokaciju proteina, internalizaciju receptora, (dis)funkciju organela, oblik i kondenzaciju jezgre, stanični ciklus i druge (Blay i sur., 2020).

*In vitro* probiri često uključuju i ispitivanje antibakterijske i antioksidacijske aktivnosti. Ispitivanja antibakterijske aktivnosti obično uključuju izlaganje pojedinih bakterijskih kultura različitim razrjeđenjima ispitivanog spoja te se dobiveni rezultati izražavaju u kao minimalne inhibirajuće koncentracije (MIC) (Dahmer i sur., 2019; Martínez i sur., 2020; Popović-Djordjević i sur., 2016; Verbanac i sur., 2016)

### **1.2.2.1. Ispitivanja antioksidacijske aktivnosti**

Antioksidacijska ili prooksidacijska aktivnost također su važna svojstva potencijalnih novih lijekova. S obzirom da se radi o kompleksnim mehanizmima koji ovise o velikom broju faktora, razvijene su različite metode s različitim prednostima i manama.

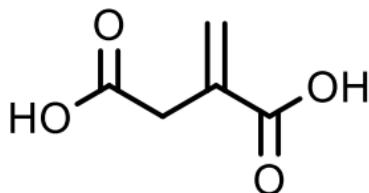
Jedna od najpopularnijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti je metoda s 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazilom (DPPH). DPPH je stabilni radikal koji u tom obliku apsorbira svjetlost valne duljine 515 nm, a nakon redukcije antioksidansom prestaje apsorbirati na toj valnoj duljini. To omogućuje jednostavno praćenje djelovanja ispitivanog derivata mjerenjem pada apsorbancije pri 515 nm. U ovoj metodi ispituje se sposobnost derivata da direktno reducira slobodne radikale (engl. *free radical scavenging capacity*). Prednosti metode su jednostavnost, osjetljivost i to što ne zahtijeva sofisticiranu opremu niti posebni tretman uzorka poput visoke temperature ili izvora kisika. Ipak, metoda ima i nedostatke poput interferencije tvari koje apsorbiraju svjetlost na valnim duljinama između 500 i 550 nm te utjecaja koncentracije metalnih iona. Uz to, pokazalo se da se otopina DPPH brzo razgrađuje i pri skladištenju na niskim temperaturama, zbog čega je potrebno na dnevnoj bazi pripremati relativno velike volumene otopine (2-4 mL po uzorku). U novije vrijeme razvijene su verzije ove metode koje rješavaju neke od tih mana. Musa i sur. opisali su postupak koji koristi mikrotitarske pločice i suhe reagense, dok su Sirivibulkovit i sur. opisali metodu s mikrofluidičnim analitičkim uređajima baziranima na papiru ( $\mu$ PAD, engl. *microfluidic paper-based analytical devices*). Obje metode su značajno

smanjile potrebne volumene uzorka i reagensa i kod metode s  $\mu$ PAD postignuta je i stabilnost uređaja 10 dana na 2-4 °C (Brand-Williams i sur., 1995; Musa i sur., 2013; Sirivibulkovit i sur., 2018).

Za razliku od metode s DPPH, staničnim metodama moguće je ispitati antioksidacijski potencijal derivata na staničnoj razini, a ne samo direktnu redukciju slobodnih radikala. Pri ispitivanju antioksidacijskih aktivnosti derivata kalcona, Stepanić i sur. su uz metodu s DPPH-om koristili i test s THP-1 stanicama tretiranim s  $H_2O_2$ . Stanicama je dodan sipitivani spoj 30 minuta prije ili nakon izlaganja dozi  $H_2O_2$  ekvivalentnoj citotoksičnoj  $ED_{50}$  dozi, te je praćen njihov rast kroz sljedeća 4 dana (Stepanić i sur., 2019). Drugi primjer staničnog antioksidacijskog testa korišten je u istraživanju Verbanac i sur. pri evaluaciji antioksidacijskih aktivnosti analoga 2-fenol-kinolina. Radi se o testu s fluorogenom sondom 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetatom (DCFH-DA). Nakon difuzije u stanicu, DCFH-DA se deacetilira staničnim esterazama i potom ga oksidiraju prisutni slobodni radikali. Mjeri se intenzitet fluorescencije nastalog 2',7'-diklorodihidrofluoresceina koji je proporcionalan razini ROS-a u citosolu (Verbanac i sur., 2016).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Michaelova reakcija je adicija nukleofila na  $\alpha,\beta$ -nezasićeni karbonil. Zahvaljujući rezonanciji,  $\beta$  ugljikov atom dijeli parcijalni pozitivni naboj s karbonilnim ugljikom, što ga čini izrazito elektrofilnim. Spojevi s izloženim  $\beta$  ugljikom dobri su Michaelovi akceptori (Wade, 2012). Neki Michaelovi akceptori odobreni su za korištenje kao različiti lijekovi. Primjerice, afatinib, neratinib i osimertinib inhibiraju epidermalne receptore faktora rasta vežući se kovalentnom vezom na cisteinski ostatak na poziciji 797 receptora (Minari i sur., 2016). Etakrinska kiselina inhibira Na-K-2Cl kotransportere i na taj način postiže diuretski učinak, dok inhibicijom izoenzima glutation-S-transferaze pojačano eksprimiranih u tumorskim stanicama smanjuje rezistenciju na kemoterapiju (Somberg i Molnar, 2009).



**Slika 2.** Struktura itakonske kiseline (preuzeto iz Perković i sur., 2020.)

Itakonska kiselina također je dobar Michaelov akceptor zahvaljujući izloženom nezasićenom  $\beta$  ugljiku (Slika 2), ali su njezini derivati slabo istraženi. Perković i sur. su sintetizirali niz derivata itakonske kiseline kao potencijalna antiproliferativna i antiviralna sredstva te su ispitali njihovu antikancerogenu i antiviralnu aktivnost (Perković i sur., 2020).

Cilj ovog rada je ispitati nespecifično vezanje tih derivata na tiolne skupine biomolekula, poput cisteinskih ogranaka proteina i glutationa. Prilikom dodatka otopine derivata ljudskom serumu, nespecifično vezanje tiola očituje se izraženim padom koncentracije ukupnih slobodnih tiolnih skupina. Za određivanje koncentracije tiolnih skupina korištena je metoda s Ellmanovim reagensom.

### 3. MATERIJALI I METODE

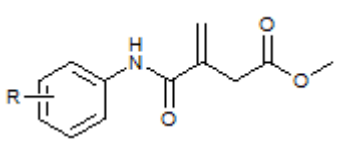
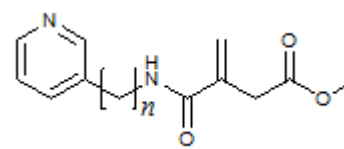
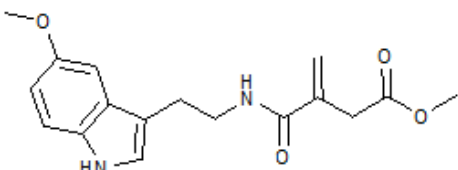
#### 3.1. Materijali

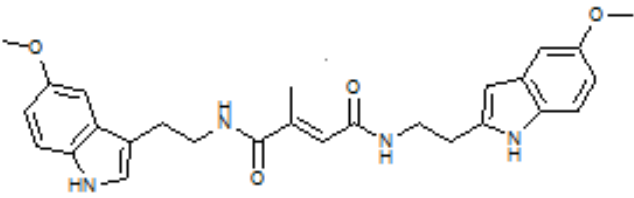
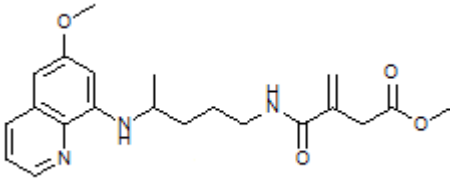
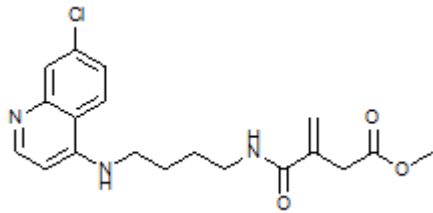
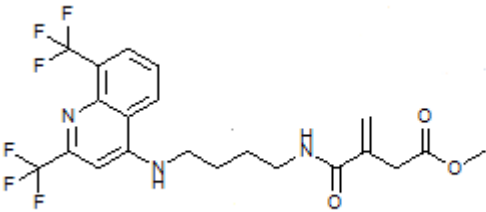
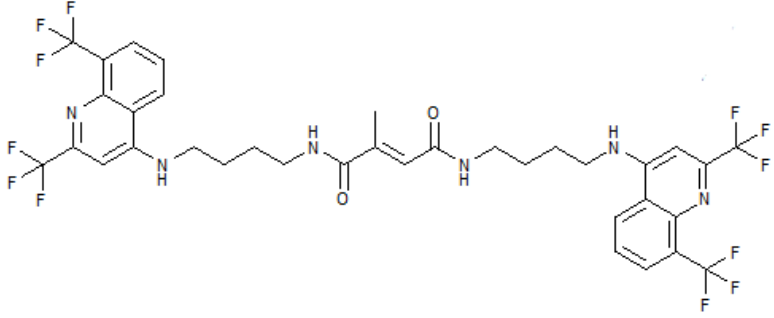
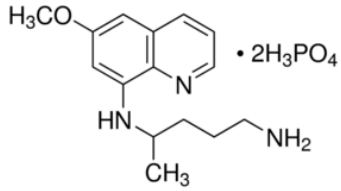
##### 3.1.1. Uzorci

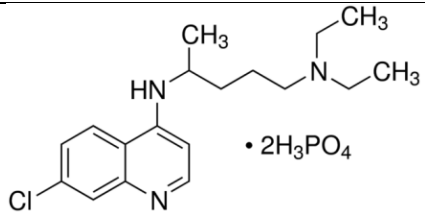
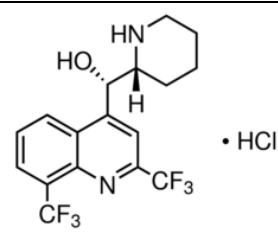
U radu je ispitano 11 derivata itakonske kiseline s oznakama: V1, V2, V3, V6, V7, V8, V9, MI3, MI5, MI7 i MI9. Ispitani derivati uključuju tri fluoroanilinska (V1, V2, V3), dva piridinska (V6, V7), dva indolna (V8, V9), jedan primakinski (MI3), jedan klorokin (MI5) i dva meflokinska derivata (MI7, MI9).

Derivati su sintetizirani u sklopu istraživanja Perković i sur. na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu (Perković i sur., 2020). Uz navedene derivate, ispitani su i antimalarici primakin bisfosfat (PQ), klorokin difosfat (CQ) i meflokin hidroklorid (MQ). Svi ispitivani spojevi su otopljeni u dimetilformamidu (DMF) i čuvani na -20 °C.

**Tablica 1.** Strukture ispitivanih derivata itakonske kiseline, PQ, CQ i MQ

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> )	
V6 (n=1)	
V7 (n=2)	
V8	

V9	
MI3	
MI5	
MI7	
MI9	
PQ	

CQ	
MQ	

Pool seruma korišten u ispitivanju prikupljen je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu kao krvni derivat i čuvan je na 4 °C.

### 3.1.2. Uređaji i kemikalije

Uzorci spojeva ispitivani su u laboratoriju Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju. Pri ispitivanju korišteni su sljedeći uređaji i materijali:

1. epruvete od 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)
2. pipete od 50, 200 i 1000  $\mu$ L i pripadajući nastavci (Eppendorf, Njemačka)
3. uređaj za centrifugu EBA 12 R (Hettich, Njemačka)
4. spektrofotometar CE 1011 (Cecil Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo)
5. analitička vaga (Kern & Sohn, Njemačka)
6. inkubator Thermomixer comfort (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije korištene pri ispitivanju su:

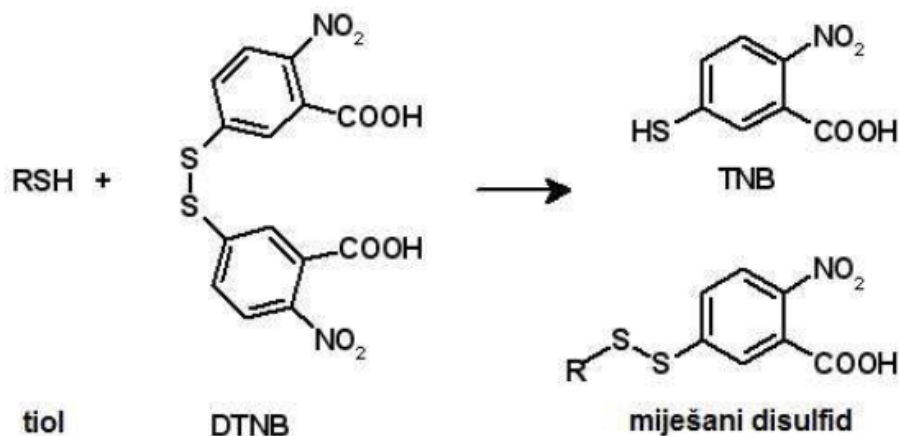
1. apsolutni metanol (Fisher Scientific, SAD)
2. 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (Fisher Scientific, SAD), otopljena u apsolutnom metanolu, koncentracija 10 mmol/L
3. tris-EDTA pufer, pH 8,2



## 3.2. Metode

### 3.2.1. Načelo metode s Ellmanovim reagensom

Za određivanje ukupnih tiolnih skupina u ljudskom serumu korištena je metoda s Ellmanovim reagensom, odnosno 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB). Metoda se temelji na reakciji DTNB i tiolne skupine pri kojoj nastaju miješani disulfid i 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB).



Slika 3. Reakcija DTNB i tiola (preuzeto iz Žanić Grubišić i sur., 2014.)

Reakcija se odvija brzo i stehiometrijski. TNB se pri neutralnom i alkalnom pH nalazi u anionskom obliku te mu molarni apsorpcijski koeficijent na valnoj duljini od 412 nm iznosi 14150  $\text{cm}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}$ , što omogućuje njegovo određivanje spektrofotometrijom. Reakcijsku smjesu čini: 790  $\mu\text{L}$  metanola, 150  $\mu\text{L}$  tris-EDTA pufera, 50  $\mu\text{L}$  seruma i 10  $\mu\text{L}$  Ellmanovog reagensa. Uz svaku pripremljenu testnu smjesu pripremi se i odgovarajuća slijepa proba reagensa i slijepa proba uzorka. U slijepu probu reagensa umjesto seruma doda se 50  $\mu\text{L}$  metanola, dok se u slijepu probu uzorka umjesto Ellmanovog reagensa doda 10  $\mu\text{L}$  metanola. Daljnji postupak sa svakom slijepom probom identičan je postupku s odgovarajućom testnom smjesom.

Sadržaj epruvete dobro se promiješa i inkubira 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci se centrifugiraju 15 minuta na 3500 g pri sobnoj temperaturi te se potom izmjeri apsorbanacija supernatanta prema destiliranoj vodi na valnoj duljini od 412 nm. Koncentracija tiolne skupine u serumu izračuna se prema sljedećoj jednadžbi:

$$c_{\text{tiolne skupine}} [\text{mmol L}^{-1}] = \frac{(A - B - C) * 10^3 * V}{\epsilon_{412} * d * v}$$

pri čemu je:

- A – apsorbancija probe na 412 nm
- B – apsorbancija slijepa probe reagensa na 412 nm
- C – apsorbancija slijepa probe reagensa na 412 nm
- $10^3$  – faktor za preračunavanje mol u mmol
- V – volumen reakcijske smjese
- $\epsilon_{412}$  – molarni apsorpcijski koeficijent TNB<sup>-</sup> na 412 nm
- d – debljina kivete
- v – volumen uzorka

(Žanić Grubišić i sur., 2014.)

### 3.2.2. Određivanje promjene koncentracije ukupnih tiolnih skupina

Ispitivani derivati podijeljeni su u serije te je u svakom danu mjerenja određen utjecaj jedne serije derivata na koncentraciju ukupnih tiola u serumu. Na početku svake serije najprije je određena koncentracija ukupnih tiola bez utjecaja ispitivanih derivata. Pripremljen je triplikrat smjesa 40  $\mu\text{L}$  seruma i 10  $\mu\text{L}$  DMF-a. Za svaku pripremljenu smjesu proveden je gore opisani postupak, koristeći smjesu umjesto 50  $\mu\text{L}$  seruma. Zatim je za svaki derivat iz serije pripremljena smjesa 40  $\mu\text{L}$  seruma i 10  $\mu\text{L}$  otopine derivata u DMF-u s kojom je nakon inkubacije sat vremena također proveden gore opisani postupak.

Ispitivanje je provedeno dvaput, uz razliku u uvjetima inkubacije. Jednom su derivati inkubirani na sobnoj temperaturi, a drugi put sat vremena na 37 °C.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

Za svaku izmjerenu apsorbanciju prema jednadžbi iz poglavlja 3.2.1. izračunata je koncentracija tiolnih skupina u smjesi. Koncentracije tiola u smjesama s ispitivanim derivatima u ostatku rada će se označavati kao  $c(\text{derivat})$ , a koncentracije u smjesama seruma i DMF-a, odnosno smjesama bez utjecaja ispitivanih derivata, kao  $c(\text{serum})$ . Sve koncentracije u ostatku rada izražene su u mmol/L.

#### 4.1.1. Koncentracije tiola bez utjecaja ispitivanih derivata

Za svaku seriju pripremljena je smjesa seruma i DMF u triplikatu te su izračunate i tri vrijednosti koncentracija tiola. Izračunate su aritmetičke sredine koje će se dalje koristiti u izračunavanju promjene koncentracije tiola.

**Tablica 2.** Izračunate koncentracije tiola u smjesama bez utjecaja ispitivanih derivata, njihove aritmetičke sredine i derivati koji su ispitani u toj seriji

temperatura inkubacije	derivati u seriji	$c_1(\text{serum})$	$c_2(\text{serum})$	$c_3(\text{serum})$	$\bar{c}(\text{serum})$
37 °C	V1, V6, CQ, PQ	0,259	0,243	0,253	0,252
	V8, V9, MI3, MI5, MI9	0,254	0,254	0,250	0,253
	V2, V3, V7, MI7, MQ	0,250	0,237	0,225	0,237
sobna temperatura	V1, V2, V6, MI7, CQ	0,257	0,274	0,280	0,270
	V8, MI9, PQ	0,239	0,249	0,206	0,231
	V9, MI3, MI5	0,250	0,237	0,225	0,237
	V3, V7, MQ	0,312	0,219	0,184	0,238

Zbog poteškoća s određivanjem koncentracija, za seriju koja uključuje V9, MI3 i MI5 inkubirane na sobnoj temperature korištene su iste vrijednosti  $c(\text{serum})$  kao i za seriju koja uključuje V2, V3, V7, MI7 i MQ inkubirane na 37 °C, a ispitivana je isti dan.

#### 4.1.2. Apsolutne promjene koncentracija tiola uzrokovane ispitivanim derivatima

Apsolutna promjena koncentracije tiola uzrokovana pojedinim derivatima izračunata je kao razlika  $\bar{c}(\text{serum})$  za odgovarajuću seriju i  $c(\text{derivat})$  smjese s tim derivatom. Za svaku aritmetičku sredinu izračunata je pripadajuća standardna devijacija (SD).

Zbog premalog broja mjerenja za korištenje statističkog testa, kao značajna promjena uzeta je svaka promjena čija je apsolutna vrijednost veća od dvije standardne devijacije odgovarajuće  $\bar{c}(\text{serum})$ .

**Tablica 3.** Prikaz apsolutne promjene koncentracije tiola (aps.  $\Delta c$ ) uzrokovane ispitivanim derivatima nakon inkubacije reakcijske smjese na 37 °C uz vrijednosti dvije standardne devijacije odgovarajućih  $\bar{c}(\text{serum})$

derivat	$\bar{c}(\text{serum})$	2SD	$c(\text{derivat})$	aps. $\Delta c$
V1	0,252	0,016	0,065	-0,187
V2	0,237	0,025	0,013	-0,225
V3	0,237	0,025	0,016	-0,222
V6	0,252	0,016	0,023	-0,229
V7	0,237	0,025	0,027	-0,211
V8	0,253	0,005	0,023	-0,230
V9	0,253	0,005	0,184	-0,069
MI3	0,253	0,005	0,001	-0,252
MI5	0,253	0,005	0,011	-0,242
MI7	0,237	0,025	0,020	-0,218
MI9	0,253	0,005	0,218	-0,035
PQ	0,252	0,016	0,237	-0,014
CQ	0,252	0,016	0,270	0,018
MQ	0,237	0,025	0,246	0,008

Nakon inkubacije reakcijske smjese na 37 °C, svih 11 derivata itakonske kiseline uzrokovalo je značajan pad koncentracije ukupnih tiola u serumu. Ispitani antimalarici nisu uzrokovali značajan pad, a kod klorokina je uočen i blagi porast koncentracije ukupnih tiola u serumu (Tablica 3).

**Tablica 4.** Prikaz apsolutne promjene koncentracije tiola (aps.  $\Delta c$ ) uzrokovane ispitivanim derivatima nakon inkubacije reakcijske smjese na sobnoj temperaturi uz vrijednosti dvije standardne devijacije odgovarajućih  $\bar{c}(\text{serum})$

derivat	$\bar{c}(\text{serum})$	2SD	c(derivat)	aps. $\Delta c$
V1	0,270	0,024	0,006	-0,265
V2	0,270	0,024	0,011	-0,259
V3	0,238	0,133	0,008	-0,230
V6	0,270	0,024	0,018	-0,252
V7	0,238	0,133	0,044	-0,195
V8	0,231	0,044	0,137	-0,094
V9	0,237	0,025	0,239	0,001
MI3	0,237	0,025	0,065	-0,172
MI5	0,237	0,025	0,048	-0,189
MI7	0,270	0,024	0,088	-0,183
MI9	0,231	0,044	0,276	0,044
PQ	0,231	0,044	0,264	0,033
CQ	0,270	0,024	0,267	-0,003
MQ	0,238	0,133	0,223	-0,015

Nakon inkubacije reakcijske smjese na sobnoj temperaturi, dva derivata itakonske kiseline nisu uzrokovala značajnu promjenu koncentracije ukupnih tiola u serumu (V9 i MI9), dok je preostalih devet (V1, V2, V3, V6, V7, V8, MI3, MI5 i MI7) uzrokovalo značajan pad. Niti jedan od ispitanih antimalarika nije uzrokovao značajnu promjenu koncentracije ukupnih tiola (Tablica 4).

#### 4.1.3. Relativne promjene koncentracija na različitim temperaturama

Kako bi se mogle međusobno uspoređivati, apsolutne promjene koncentracija preračunate su u relativne promjene izražene u postocima. Izračunati su i koeficijenti varijacije ( $K_v$ ), odnosno omjeri standardnih devijacija i aritmetičkih sredina, također izraženi u postocima. Značajnim relativnim promjenama koncentracija smatrane su one veće od dvostrukog  $K_v$ .

**Tablica 5.** Usporedba relativnih promjena koncentracija (rel.  $\Delta c$ ) ukupnih tiolnih skupina nakon inkubacija na različitim temperaturama

derivat	37 °C		sobna temperatura	
	rel. $\Delta c$ (%)	$2K_v$ (%)	rel. $\Delta c$ (%)	$2K_v$ (%)
V1	-74,2	6,3	-97,9	8,7
V2	-94,6	10,7	-95,8	8,7
V3	-93,5	10,7	-96,4	55,7
V6	-91,0	6,3	-93,2	8,7
V7	-88,7	10,7	-81,6	55,7
V8	-91,1	1,9	-40,7	19,2
V9	-27,4	1,9	0,6	10,7
MI3	-99,4	1,9	-72,6	10,7
MI5	-95,5	1,9	-79,8	10,7
MI7	-91,7	10,7	-67,6	8,7
MI9	-14,0	1,9	19,1	19,2
PQ	-5,6	6,3	14,3	19,2
CQ	7,3	6,3	-1,2	8,7
MQ	3,6	10,7	-6,3	55,7

Osam ispitanih derivata itakonske kiseline (V1, V2, V3, V6, V7, MI3, MI5 i MI7) uzrokovalo je izraženo ( $< -60\%$ ) smanjenje koncentracije tiola na obje temperature. V8 je također uzrokovao smanjenje koncentracije na obje temperature, ali je to smanjenje na sobnoj temperaturi puno slabije izraženo ( $-40,7\%$ ). S druge strane, V9 i MI9 uzrokovali su značajno smanjenje koncentracije samo na  $37\text{ °C}$  te je i to smanjenje slabije izraženo nego kod ostalih derivata. Nijedan od ispitanih antimalarika nije uzrokovao značajno sniženje koncentracije tiola ni nakon inkubacije na  $37\text{ °C}$  ni nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (Tablica 5).

## 4.2. Rasprava

Kovalentno vezanje Michaelovih akceptora za cisteinske ogranke pojedinih proteina može uzrokovati promjene u strukturi, funkciji i distribuciji proteina unutar stanice. Pozitivni učinci uočeni su kod vezanja endogenih i egzogenih Michaelovih akceptora. Primjerice, nitro masne kiseline su endogeni Michaelovi akceptori koji pokazuju terapijske učinke kod akutnih upalnih stanja, kardiovaskularnih bolesti, pojedinih tumora, plućne i jetrene fibroze. Vezanjem za cisteinske ostatke djeluje kao parcijalni agonist transkripcijskog faktora PPAR $\gamma$ , a s druge strane inhibira djelovanje NF- $\kappa$ B i 5-lipooksigenaze. Ibrutinib, neratinib, osimertinib i afatinib primjeri su egzogenih Michaelovih akceptora koji su odobreni kao lijekovi u terapiji različitih zloćudnih bolesti (Piesche i sur., 2020).

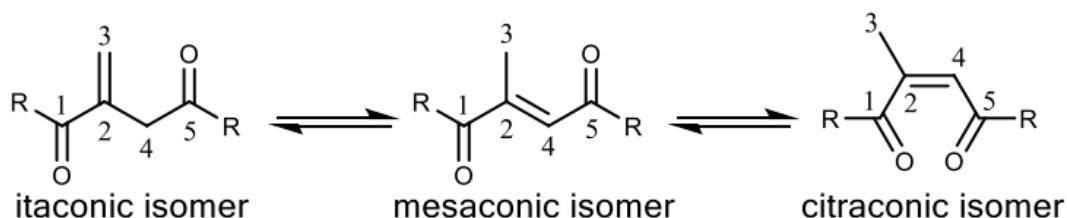
Perković i sur. ispitali su *in vitro* antikancerogena djelovanja serije derivata Michaelovog akceptora itakonske kiseline. Radi se u hibridima koji sadrže aromatske komponente fluoroanilin, piridin i indol, koje su prisutne u antikancerogenim sredstvima poput sorafeniba i imatiniba; te o hibridima s poznatim antimalaricima primakinom, klorokinom i meflokinom, koji su pokazali direktnu ili adjuvantnu antikancerogenu aktivnost. Hibridi su protiv devet različitih tumorskih staničnih linija pokazali antikancerogenu aktivnost pri niskim mikromolarnim koncentracijama (Perković i sur., 2020).

Kod lijekova koji svoj učinak postižu ireverzibilnim kovalentnim vezanjem za ciljne proteine, nespecifično vezanje može predstavljati problem u razvoju. Vezanjem za neželjene proteine mogu promijeniti njihova svojstva i funkciju i na taj način uzrokovati toksičnost. Tako modificirani proteini mogu biti imunogeni i uzrokovati reakcije preosjetljivosti (Dahal i sur., 2013.; Flanagan i sur., 2014). Glutation kao nukleofil koji konjugira elektrofilne ksenobiotike predstavlja mehanizam stanične obrane od takvih reakcija. Pri visokim koncentracijama ksenobiotika to može dovesti do deplecije reduciranoga glutaciona, supresije mehanizama antioksidacijske obrane i naposljetku oksidacijskog stresa. Deplecija reduciranoga glutaciona u crijevima, uz oksidacijski stres i oštećenja enterocita, uzrokuje i inhibiciju apsorpcije Ca<sup>2+</sup> (Moine i sur., 2018).

Rezultati ispitivanja u ovom radu pokazuju da 9 od 11 ispitanih derivata pri 37 °C uzrokuju smanjenje koncentracije ukupnih tiola u ljudskom serumu za više od 70 %, što ukazuje na nespecifično vezanje tih derivata na tiolne skupine serumskih proteina. Antimalarici PQ, CQ i MQ

nisu uzrokovali smanjenje koncentracije tiola što je u skladu s očekivanjima s obzirom da se radi o elektrofilima, odnosno Michaelovim akceptorima.

Jedini derivati itakonske kiseline koji nisu uzrokovali veliki pad koncentracije tiola su V9 (pad od 27,4 % pri 37 °C) i MI9 (pad od 14,0 % pri 37 °C). Ta dva derivata specifični su i po svojoj dimernoj strukturi. V9 se sastoji od dva indolna ostatka povezana itakonskom kiselinom, dok se MI9 sastoji od dva meflokinska ostatka povezana itakonskom kiselinom (Tablica 1). Druga specifičnost ovih derivata je prisutnost izomerizacije itakonske kiseline u mezaconski i citraconski izomer (Slika 4).



**Slika 4.** Izomerizacija itakonske kiseline (preuzeto iz Perković i sur., 2020.)

Izomerizaciju su Perković i sur. potvrdili NMR spektrima (Perković i sur., 2020). Može se pretpostaviti da su ta dva faktora utjecali na slabije vezanje na tiolne skupine serumskih peptida. Prisutnost dva ostatka indola odnosno meflokina potencijalno može smanjiti izloženost  $\beta$  ugljika, odnosno sterički ometati Michaelovu adiciju na serumske peptide. Izomerizacija s druge strane potencijalno smanjuje elektrofilnost  $\beta$  ugljika. Ipak, točan uzrok slabijeg vezanja ne može se sa sigurnošću zaključiti bez daljnjeg istraživanja. Iz rezultata se također može vidjeti da pri sobnoj temperaturi u potpunosti izostaje smanjenje koncentracije tiola kod V9 i kod MI9.

Iako su derivati V1 i MI5 uzrokovali smanjenje koncentracije tiola za preko 70 %, u ispitivanju Perković i sur. nisu pokazali utjecaj na održavanje homeostaze GSH (Perković i sur., 2020). Valja napomenuti ograničenja ispitivanja provedenog u ovom radu. Svaki od derivata ispitan je na pojedinoj temperaturi u jednoplikatu, što smanjuje pouzdanost rezultata. S obzirom da je pri ispitivanju određivana samo promjena koncentracije ukupnih tiola, korisno bi bilo provesti detaljniju analizu interakcija ispitivanih derivata s glutationom. Također su potrebna dodatna ispitivanja kako bi se mogao donijeti zaključak o *in vivo* opterećenju nespecifičnim



kovalentnim vezanjem. Precizniju karakterizaciju opterećenja moglo bi se dobiti istraživanjem koje bi uzelo u obzir terapijske koncentracije derivata i koje bi uključilo stanična ispitivanja.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Kao Michaelovi akceptori, derivati itakonske kiseline V1, V2, V3, V6, V7, V8, MI3, MI5 i MI7 uzrokuju smanjenje ukupne koncentracije tiolnih skupina u ljudskom serumu veće od 70 %.
2. Derivati itakonske kiseline V9 i MI9 uzrokuju manje izraženo smanjenje ukupne koncentracije tiolnih skupina u ljudskom serumu.
3. Antimalarici primakin bisfosfat, klorokin difosfat i meflokin hidroklorid ne uzrokuju smanjenje ukupne koncentracije tiolnih skupina u ljudskom serumu.
4. Za konkretniju karakterizaciju *in vivo* opterećenja nespecifičnim kovalentnim vezanjem uzrokovanog ispitivanim derivatima itakonske kiseline, potrebno je provesti dodatna istraživanja.

## 6. LITERATURA

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. New York, SAD, W. H. Freeman and Company, 2010, str. 30, 35, 555-560, 751.

Blay V, Tolani B, Ho SP, Arkin MR. High-throughput screening: today's biochemical and cell-based approaches. *Drug Discov Today*, 2020, S1359-6446.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxydant activity. *Lebensm Wiss u Technol*, 1995, 28, 25-30.

Brieger K, Shiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 2018, 142:w13659

Butina D. Unsupervised data base clustering based on Daylight's fingerprint and Tanimoto similarity: a fast and automated way to cluster small and large data sets. *J Chem Inf Comput Sci*, 1999, 39, 747-750.

Čepelak I. Slobodni radikali i antioksidansi. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 638-648.

Dahal UP, Obach RS, Gilbert AM. Benchmarking in vitro covalent burden as a tool to assess potential toxicity caused by nonspecific covalent binding of covalent drugs. *Chem Res Toxicol*, 2013, 26, 1739-1745.

Dahmer J, do Carmo G, Mostardeiro MA, Neto AT, da Silva UF, Dalcol II, Morel AF. Antibacterial activity of *Discaria americana* Gillies ex Hook (Rhamnaceae). *J Ethnopharmacol*, 2019, 239, 111635.

Dubuisson M, Vander Stricht D, Clippe A, Etienne F, Nauser T, Kissner R, Koppenol WH, Rees JF, and Knoops B. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett*, 2004, 571, 161–165.

Ferrer-Sueta G, Manta B, Botti H, Radi R, Trujillo M, Denicola A. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24, 434-450.

Filipovic MR, Koppenol WH. The Haber-Weiss reaction – the latest revival. *Free Radic Biol Med* 2019, 145, 221-222.

Flanagan ME, Abramite JA, Anderson DP, Aulabaugh A, Dahal UP, Gilbert AM, Li C, Montgomery J, Oppenheimer SR, Ryder T, Schuff BP, Uccelo DP, Walker GS, Wu Y, Brown MF, Chen JM, Hayward MM, Noe MC, Scott Obach R, Phillippe L, Shanmugadsudaram V, Shapiro MJ, Starr J, Stroh J, Che Y. Chemical and computational methods for characterization of covalent reactive groups for the prospective design of irreversible inhibitors. *J Med Chem*, 2014, 23, 10072-10079.

Flohé L, Toppo S, Cozza G, Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15, 763-780.

Flohé L. Selenium in mammalian spermiogenesis. *Biol Chem*, 2007, 388, 987–995.

Gladyshev VN, Jeang KT, Stadtman TC. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93, 6146–6151.

Guyton AC, Hall JE. Metabolički hormoni štitnjače. U: Medicinska fiziologija – udžbenik. Kukolja Taradi S, Andreis I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str. 907-920.

Hansen RE, Roth D, Winther JR. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106, 422–427.

Heppner DE, Hristova M, Ida T, Mijuskovic A, Dustin CM, Bogdándi V, Fukuto JM, Dick TP, Nagy P, Li J, Akaike T, van der Vliet A. Cysteine prethiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol-based redox signaling? *Redox Biology*, 2018, 14, 379-385.

Jarvis RA, Patrick EA. Clustering using a similarity measure based on shared near neighbors. *IEEE Trans Comput*, 1973, C-22, 1025-1034.

Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 2000, 149, 43–50.

Kortemme T, Creighton TE. Ionisation of cysteine residues at the termini of model  $\alpha$ -helical peptides. Relevance to unusual thiol pK<sub>a</sub> values in proteins of the thioredoxin family. *J Mol Biol*, 1995, 253, 799-812.

Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18, 165-207.

Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules—from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9, 25–47.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46, 3-26.

Martínez MD, Riva DA, Garcia C, Durán FJ, Burton G. Synthesis and antibacterial activity of difluoromethyl cinnamoyl amides. *Molecules*, 2020, 25, 789.

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.

Moine L, Rivoira M, de Barboza GD, Perez A, de Talamoni NT. Glutathione depleting drugs, antioxidants and intestinal calcium absorption. *World J Gastroenterol*, 2018, 24, 4979-4988.

Musa KH, Abdullah A, Kuswandi B, Hidayat MA. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chem*, 2013, 141, 4102-4106.

Nelson KJ, Parsonage D, Hall A, Karplus PA, and Poole LB. Cysteine pK(a) values for the bacterial peroxiredoxin AhpC. *Biochemistry*, 2008, 47, 12860–12868.

Netto LES, Antunes F. The roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and in signal transduction. *Mol Cells*, 2016, 39, 65-71.

Perković I, Beus M, Schols D, Persons L, Zorc B. Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents. *Mol Divers*, 2020, <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10147-6>

Piesche M, Roos J, Kühn B, Fettel J, Hellmuth N, Brat C, Maucher IV, Awad O, Matrone C, Steffensen SGC, Manolikakes G, Heinicke U, Zacharowski KD, Steinhilber D, Maier TJ. The emerging therapeutic potential of nitro fatty acids and other Michael acceptor-containing drugs for the treatment of inflammation and cancer. *Front Pharmacol*, 2020, 11, 1297.

Ponsero AJ, Igharia A, Darch MA, Miled S, Outten CE, Winther JR, Palais G, D'Autreaux B, Delaunay-Moisan A, Toledano MB. Endoplasmic reticulum transport of glutathione by Sec61 is regulated by Ero1 and Bip. *Mol Cells*, 2017, 67, 962–973.

Popović-Djordjević JB, Klaus AS, Žižak ŽS, Matic IZ, Drakulić BJ. Antiproliferative and antibacterial activity of some glutarimide derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31, 915-923.

unReyes AM, Pedre B, De Armas MI, Tossounian MA, Radi R, Messens J, Trujillo M. Chemistry and redox biology of mycothiol. *Antioxidants Redox Signal*, 2018, 28, 487–504.

Rhee SG. Overview on peroxiredoxin. *Mol Cells*, 2016., 39, 1-5.

Sirivibulkovit K, Nouanthavong S, Sameenoi Y. Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Anal Sci*, 2018, 34, 795-800.

SMILES, <https://daylight.com/smiles/index.html>, pristupljeno 13.1.2021.

Somberg JC, Molnar J. The pleiotropic effects of etacrynic acid. *Am J Ther*, 16, 102-104.

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. *Antioxydants*, 2019, 8, 90.

Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*, 2011, 740, 1-6.

Ulrich K, Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 140, 14-27.

Van Drie JH, Lajines MS. Approaches to virtual library design. *DDT*, 1998, 3, 274-283.

Verbanac D, Jelić D, Stepanić V, Tatić I, Žiher D, Koštrun S. Combined in silico and in vitro screening. *Croat Chem Acta*, 2005, 78, 133-139.

Verbanac D, Malik R, Chand M, Kushwaha K, Vashist M, Matijašić M, Stepanić V, Perić M, Čipčić Paljetak H, Saso L, Jain SC. Synthesis and evaluation of antibacterial and antioxidant activity of novel 2-phenyl-quinoline analogs derivatized at position 4 with aromatically substituted 4H-1,2,4-triazoles. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31, 104-110.

Wade LG. Thiols (mercaptans) U: Organic chemistry. Wade LG, urednici, Pearson, 2012, str. 458.-462.

Xiao Z, La Fontaine S, Bush AI, Wedd AG. Molecular mechanisms of glutaredoxin enzymes: versatile hubs for thiol-disulfide exchange between protein thiols and glutathione. *J Mol Biol*, 2019, 431, 158-177.

Žanić Grubišić T, Barišić K, Rumora L, Grdić Rajković M, Matokanović M, Somborac Bačura A. Vježbe iz biokemije za studente studija Farmacije i Medicinske biokemije. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 77-79.

## 7. SAŽETAK

Unatoč prednostima lijekova koji učinak postižu kovalentnim vezanjem za ciljne molekule, rizik od toksičnosti uzrokovane nespecifičnim vezanjem predstavlja komplikacije u njihovom razvoju. Neki od tih lijekova su Michaelovi akceptori. Radi se o elektrofilima koji se kovalentno vežu za cisteinske ostatke ciljnih proteina. Osim toksičnosti zbog promjene svojstava vezanih proteina, nespecifično kovalentno vezanje Michaelovih akceptora za tiole proteina i peptida dovodi i do deplecije glutationa. Deplecijom glutationa narušava se funkcija mehanizama antioksidacijske obrane i dolazi do stanja oksidacijskog stresa. U ovom radu ispitan je utjecaj jedanaest potencijalnih citostatika na koncentraciju tiolnih skupina ljudskog seruma. Ispitani spojevi derivati su itakonske kiseline i Michaelovi akceptori. Ispitan je i utjecaj antimalarika koji su strukturne komponente nekih derivata. Ispitani spojevi dodani su u uzorke ljudskog seruma te je nakon inkubacije od sat vremena određena koncentracija tiolnih skupina. Svaki spoj ispitan je uz inkubaciju pri temperaturi od 37 °C i uz inkubaciju pri sobnoj temperaturi. Za određivanje koncentracije tiolnih skupina korištena je metoda s Ellmanovim reagensom. Izraženo smanjenje koncentracije tiolnih skupina ukazuje na nespecifično vezanje ispitanog spoja. Od jedanaest ispitanih derivata itakonske kiseline, samo dva derivata, spojevi V9 i MI9, nisu uzrokovali pad koncentracije tiolnih skupina veći od 30% ni pri jednoj temperaturi. Nijedan od ispitanih antimalarika nije uzrokovao pad koncentracije tiolnih skupina veći od 10% ni pri jednoj temperaturi. Za detaljniju karakterizaciju *in vivo* opterećenja nespecifičnim kovalentnim vezanjem ispitanih derivata itakonske kiseline potrebno je provesti dodatna ispitivanja.

Ključne riječi: derivati itakonske kiseline, Michaelovi akceptori, nespecifično kovalentno vezanje, Ellmanov reagens



## SUMMARY

Although the drugs that achieve their effect by covalently binding the target molecules have their advantages, the risk of toxicity caused by nonspecific binding poses complications in their development. Some of those drugs are Michael acceptors. They are electrophiles that covalently bind cysteine residues of target proteins. In addition to toxicity caused by the modification of bound protein's properties, nonspecific covalent binding of Michael acceptors to protein and peptide thiol groups leads to glutathione depletion. Glutathione depletion damages the function of antioxidant defense mechanisms and causes the state of oxidative stress. In this paper, the effect of eleven potential cytostatics on the concentration of thiol groups in human serum was tested. The tested compounds are itaconic acid derivatives and Michael acceptors. Antimalarics that are structural components of some derivatives were also tested. The tested compounds were added to the samples of human serum. Thiol group concentration was determined after a one-hour incubation. Each compound was tested with an incubation at 37 °C and with an incubation at room temperature. Thiol group concentration was determined using the Ellman reagent method. Substantial decrease in thiol group concentration indicates nonspecific binding of the tested compound. Out of eleven tested itaconic acid derivatives, only two compounds, V9 and MI9, didn't cause a decrease in thiol group concentration greater than 30% at either temperature. None of the tested antimalarics caused a decrease in thiol group concentration greater than 10% at either temperature. Additional testing is required for further characterization of *in vivo* nonspecific covalent binding burden of the tested itaconic acid derivatives.

Key words: itaconic acid derivatives, Michael acceptors, nonspecific covalent binding, Ellman reagent

## 8. PRILOZI

### 8.1. Kratice

μPAD – mikrofluidični analitički uređaji bazirani na papiru (engl. *microfluidic paper-based analytical devices*)

ADMET – apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija i toksičnost (engl. *apsorption, distribution, metabolism, elimination and toxicity*)

ALS – amiotrofična lateralna skleroza (engl. *amiotrophic lateral sclerosis*)

ASK1 – apoptoza-signalizirajuća kinaza 1 (engl. *apoptosis signal-regulating kinase*)

C<sub>P</sub> – peroksidatski cistein (engl. *peroxidatic cysteine*)

CQ – klorokin difosfat (engl. *chloroquine diphosphate*)

C<sub>R</sub> – rješavajući cistein (engl. *resolving cysteine*)

DCFH-DA – 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (engl. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*)

DMF – dimetilformamid (engl. *dimethylformamide*)

DPPH – 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil (engl. *2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl*)

DTNB – 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. *5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid*)

EDTA – etilendiaminotetraacetat (engl. *ethylenediaminetetraacetate*)

ER – endoplazmatski retikulum (eng. *endoplasmic reticulum*)

GPx – glutation-peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)

GR – glutation-reduktaza (engl. *glutathione reductase*)

GSH – glutation (engl. *glutathione*)

HTS – probir visokog protoka (engl. *high throughput screening*)

K<sub>v</sub> – koeficijent varijacije (engl. *variation coefficient*)

LR5 – Lipinskijevo pravilo petorke (engl. *Lipinski rule of five*)

MIC – minimalna inhibirajuća koncentracija (engl. *minimum inhibitory concentration*)

MQ – meflokin hidroklorid (engl. *mefloquine hydrochloride*)

Msr – metionin-sulfoksid-reduktaza (engl. *methionine sulfoxide reductase*)

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (engl. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

NMR – nuklearna magnetska rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*)

NOX – NADPH-oksidaza (engl. *NADPH oxidase*)  
PDI – protein-disulfid-izomeraza (engl. *protein disulfide isomerase*)  
PQ – primakin bisfosfat (engl. *primaquine bisphosphate*)  
Prx – peroksiredoksin (engl. *peroxiredoxin*)  
PTEN – homolog fosfataze i tenzina (engl. *phosphatase and tensin homolog*)  
RNR – ribonukleotid-reduktaza (engl. *ribonucleotide reductase*)  
ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)  
RS – reprezentativni set (engl. *representative set*)  
SD – standardna devijacija (engl. *standard deviation*)  
Sec – selenocistein (engl. *selenocysteine*)  
SMILES – engl. *Simplified Molecular Input Line System*  
SOD – superoksid-dizmutaza (engl. *superoxide dismutase*)  
TNB – 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (eng. *5-thio-2-nitrobenzoic acid*)  
Trx – tioredoksin (engl. *thioredoxin*)  
TrxR – tioredoksin-reduktaza (engl. *thioredoxin reductase*)  
Txnip – tioredoksin-interakcijski protein (engl. *thioredoxin-interacting protein*)

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### UTJECAJ DERIVATA ITAKONSKE KISELINE NA KONCENTRACIJU TIOLNIH SKUPINA LJUDSKOGA SERUMA

Luka Mavrić

#### SAŽETAK

Unatoč prednostima lijekova koji učinak postižu kovalentnim vezanjem za ciljne molekule, rizik od toksičnosti uzrokovane nespecifičnim vezanjem predstavlja komplikacije u njihovom razvoju. Neki od tih lijekova su Michaelovi akceptori. Radi se o elektrofilima koji se kovalentno vežu za cisteinske ostatke ciljnih proteina. Osim toksičnosti zbog promjene svojstava vezanih proteina, nespecifično kovalentno vezanje Michaelovih akceptora za tiole proteina i peptida dovodi i do deplecije glutationa. Deplecijom glutationa narušava se funkcija mehanizama antioksidacijske obrane i dolazi do stanja oksidacijskog stresa. U ovom radu ispitan je utjecaj jedanaest potencijalnih citostatika na koncentraciju tiolnih skupina ljudskog seruma. Ispitani spojevi derivati su itakonske kiseline i Michaelovi akceptori. Ispitan je i utjecaj antimalarika koji su strukturne komponente nekih derivata. Ispitani spojevi dodani su u uzorke ljudskog seruma te je nakon inkubacije od sat vremena određena koncentracija tiolnih skupina. Svaki spoj ispitan je uz inkubaciju pri temperaturi od 37 °C i uz inkubaciju pri sobnoj temperaturi. Za određivanje koncentracije tiolnih skupina korištena je metoda s Ellmanovim reagensom. Izraženo smanjenje koncentracije tiolnih skupina ukazuje na nespecifično vezanje ispitanog spoja. Od jedanaest ispitanih derivata itakonske kiseline, samo dva derivata, spojevi V9 i MI9, nisu uzrokovali pad koncentracije tiolnih skupina veći od 30% ni pri jednoj temperaturi. Nijedan od ispitanih antimalarika nije uzrokovao pad koncentracije tiolnih skupina veći od 10% ni pri jednoj temperaturi. Za detaljniju karakterizaciju in vivo opterećenja nespecifičnim kovalentnim vezanjem ispitanih derivata itakonske kiseline potrebno je provesti dodatna ispitivanja.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 4 grafička prikaza, 5 tablica, 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: derivati itakonske kiseline, Michaelovi akceptori, nespecifično kovalentno vezanje, Ellmanov reagens

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

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

**Prof. dr. sc. Roberta Petlevski**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Doc. dr. sc. Lovorka Vujić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak 2021.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### EXAMINING THE EFFECT OF ITACONIC ACID DERIVATIVES ON THIOL GROUP CONCENTRATION IN HUMAN SERUM

Luka Mavrić

#### SUMMARY

Although the drugs that achieve their effect by covalently binding the target molecules have their advantages, the risk of toxicity caused by nonspecific binding poses complications in their development. Some of those drugs are Michael acceptors. They are electrophiles that covalently bind cysteine residues of target proteins. In addition to toxicity caused by the modification of bound protein's properties, nonspecific covalent binding of Michael acceptors to protein and peptide thiol groups leads to glutathione depletion. Glutathione depletion damages the function of antioxidant defense mechanisms and causes the state of oxidative stress. In this paper, the effect of eleven potential cytostatics on the concentration of thiol groups in human serum was tested. The tested compounds are itaconic acid derivatives and Michael acceptors. Antimalarics that are structural components of some derivatives were also tested. The tested compounds were added to the samples of human serum. Thiol group concentration was determined after a one-hour incubation. Each compound was tested with an incubation at 37 °C and with an incubation at room temperature. Thiol group concentration was determined using the Ellman reagent method. Substantial decrease in thiol group concentration indicates nonspecific binding of the tested compound. Out of eleven tested itaconic acid derivatives, only two compounds, V9 and MI9, didn't cause a decrease in thiol group concentration greater than 30% at either temperature. None of the tested antimalarics caused a decrease in thiol group concentration greater than 10% at either temperature. Additional testing is required for further characterization of in vivo nonspecific covalent binding burden of the tested itaconic acid derivatives.

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

Thesis includes: 40 pages, 4 figures, 5 tables and 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: itaconic acid derivatives, Michael acceptors, nonspecific covalent binding, Ellman reagent

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

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Robert Petlevski, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2021.