

# Usporedba metoda za određivanje mimetičke aktivnosti superoksid dismutaze cinkovih kompleksa

---

**Hefer, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:109202>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Marija Hefer

Usporedba metoda za određivanje mimetičke aktivnosti superoksid dismutaze  
cinkovih kompleksa

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2020. godine

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Martini Šrajer Gajdošik na strpljenju, savjetima i pomoći prilikom izvođenja teorijskog i praktičnog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Oliveri Galović i doc. dr. sc. Vlatki Gvozdić na konstruktivnim kritikama pri izradi diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se obitelji, prijateljima i naročito „Pasuljcima“ što su mi bili potpora tijekom svih ovih godina studiranja.*

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za kemiju  
Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer  
Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Kemija

## USPOREDBA METODA ZA ODREĐIVANJE MIMETIČKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE CINKOVIH KOMPLEKSA

Marija Hefer

Rad je izrađen na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

### Sažetak:

Enzim superoksid dismutaza (SOD) služi za obranu stanica protiv oksidacijskih oštećenja koja uzrokuju reaktivne kisikove vrste. SOD je metaloprotein koji pripada skupini oksidoreduktaza, a služi za regulaciju koncentracije ROS unutar organizma. S obzirom na metalne kofaktore koji su prisutni na aktivnom mjestu, postoji 4 oblika SOD: Cu,Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD i Ni-SOD. Iako je predodređen za obranu protiv ROS, enzim ima određena ograničenja te se upravo iz tog razloga koriste mimetici – sintetički spojevi koji imitiraju njegovo djelovanje. Primarno se istražuju radi terapijske primjene za antioksidacijsko djelovanje zbog manje veličine, dužeg vremena poluživota i sličnosti u djelovanju s nativnim enzimom. Za određivanje mimetičke aktivnosti SOD cinkovih kompleksa razvijeno je nekoliko metoda. U radu su uspoređene metode za određivanje SOD mimetičke aktivnosti cinkova kompleksa  $Zn_1L_1$ . Korištene su tri neenzimatske metode od kojih se dvije temelje na alkalnom DMSO kao izvoru superoksidnih aniona, te jedna koja koristi fotoredukciju u sustavu riboflavin-metionin kako bi se generirali superoksidni anioni. Metodom 1 nije bilo moguće odrediti SOD aktivnost ispitivanog spoja, dok je Metodom 2 određena  $IC_{50}$  koja je iznosila  $117 \mu M$ . Kod metode s fotoredukcijom riboflavina,  $IC_{50}$  vrijednost iznosi  $228 \mu M$  iz čega se može zaključiti da je ova metoda manje osjetljiva i time manje pogodna za određivanje SOD mimetičke aktivnosti ispitivanog spoja.

Diplomski rad obuhvaća: stranica: 33, slika: 18, tablica: 4, literaturnih navoda: 41

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: superoksid dismutaza, superoksidni anion, reaktivne kisikove vrste, SOD mimetici

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc.dr.sc. Olivera Galović, predsjednica
2. doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentor i član
3. doc.dr.sc. Vlatka Gvozdić, član
4. doc.dr.sc. Tomislav Balić, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Department of Chemistry  
Graduate University Study of Chemistry; research study  
Scientific Area: Natural Sciences  
Scientific Field: Chemistry

**COMPARISON OF METHODS FOR DETERMINING MIMETIC ACTIVITY OF  
SUPEROXIDE DISMUTASE ZINC COMPLEXES**

**Marija Hefer**

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., assistant prof.

**Abstract:**

The enzyme superoxide dismutase (SOD) defends cells against oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS). SOD is a metalloprotein that belongs to the group of oxidoreductases, and serves to regulate the concentration of ROS within the organism. Considering the metal cofactors present in the active site, SOD is classified into 4 types: Cu, Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD, and Ni-SOD. Although its main role is to defend against ROS, the enzyme itself has certain limitations, therefore mimetics (synthetic compounds that mimic its action) are used as a replacement. They are primarily investigated for therapeutic purposes due to their antioxidant activity, smaller size, longer half-life and similarity in action to the native enzyme. Several methods have been developed to determine the mimetic activity of SOD zinc complexes. This thesis compares methods for determining the SOD mimetic activity of zinc complex  $Zn_1L_1$ . Three non-enzymatic methods were used, two of which are based on alkaline DMSO as a source of superoxide anions, and one which uses photoreduction of the riboflavin-methionine system to generate superoxide anions. Method 1 did not determine the SOD activity of the test compound, while Method 2 determined an  $IC_{50}$  of 117  $\mu M$ . In the case of riboflavin photoreduction methods, the  $IC_{50}$  value is 228  $\mu M$ , from which it can be concluded that this method is less sensitive and less suitable for determining the SOD mimetic activity of the test compound.

**Thesis includes:** *pages: 33, figures: 18, tables: 4, references: 41*

**Original in:** Croatian

**Keywords:** superoxide dismutase, superoxide anion, reactive oxygen species, SOD mimetics

**Thesis accepted:**

**Reviewers:**

1. Olivera Galović, Ph.D., assistant prof., president
2. Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., assistant prof., supervisor
3. Vlatka Gvozdić, Ph.D., assistant prof.
4. Tomislav Balić, Ph.D., assistant prof.

**Thesis deposited in:** Library Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Literaturni dio.....	2
2.1 Superoksid dismutaza.....	2
2.1.1 Strukturna podjela superoksid dismutaza.....	5
2.1.2 Uloga i biološki značaj superoksid dismutaze.....	7
2.1.3 Uloga antioksidansa u regulaciji reaktivnih vrsta.....	8
2.2 Mimetici superoksid dismutaze.....	10
2.2.1 Mn-SOD mimetici.....	11
2.2.2 Cu,Zn-SOD mimetici.....	12
2.3 Metode za određivanje SOD mimetičke aktivnosti.....	15
2.3.1 Inhibicija redukcije citokroma <i>c</i> .....	15
2.3.2 Fotoredukcija riboflavin – metionin sustava.....	16
2.3.3 Uporaba alkalnog DMSO u prisutnosti NBT-a.....	18
3. Materijali i metode.....	19
3.1 Kemikalije i pribor.....	19
3.2 Ispitivani spoj.....	20
3.3 Metoda s alkalnim DMSO.....	21
3.3.1 Metoda 1.....	21
3.3.2 Metoda 2.....	21
3.4 Metoda s metionin – riboflavin sustavom.....	21
3.5 Izračun SOD aktivnosti.....	22
4. Rezultati i rasprava.....	23
4.1 Određivanje SOD mimetičke aktivnosti metodom s alkalnim DMSO.....	23
4.2 Određivanje SOD mimetičke aktivnosti metodom s riboflavin-metionin sustavom.....	27
5. Zaključak.....	29
6. Popis kratica.....	30
7. Literatura.....	31
8. Životopis.....	33

# 1. Uvod

Enzim superoksid dismutaza (SOD) jedan je od najznačajnijih antioksidansa koji se nalaze unutar i izvan gotovo svake stanice. SOD je prisutna kod prokariota i eukariota, a služi za obranu stanica protiv oksidacijskih oštećenja koja uzrokuju reaktivne kisikove vrste (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*). Oksidacijska oštećenja nastaju zbog promjene u ravnoteži oksidacijsko – redukcijskih procesa unutar organizma. Također, nastaju i kao posljedica prekomjernog stvaranja kisikovih radikala koji mijenjaju strukturu stanice te uzrokuju bolesti kao što su dijabetes, pojedine vrste karcinoma te autoimunih bolesti. ROS se proizvode u mitohondriju kao nusprodukt metaboličkih reakcija ili se unose u organizam iz okoliša [1, 2].

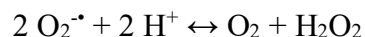
SOD postoji u 4 oblika, a svaki oblik sadrži različite metalne kofaktore koji održavaju funkcionalnost enzima. Enzim se može unositi u organizam putem hrane, ali zbog same veličine transport do stanica je otežan. Organizam u većini slučajeva sam proizvodi SOD no u pojedinim situacijama, gdje je proizvodnja otežana, koriste se njezini mimetici kako bi se izbjegli nedostaci nativnog enzima. Mimetici superoksid dismutaze sintetički su spojevi koji oponašaju nativni enzim SOD [2, 3].

Razna istraživanja se provode u svrhu otkrivanja funkcije, odnosno mehanizma SOD i njezinih mimetika. Cilj ovoga rada je odrediti podobnost određenih metoda za određivanje mimetičke aktivnosti SOD cinkovih kompleksa.

## 2. Literaturni dio

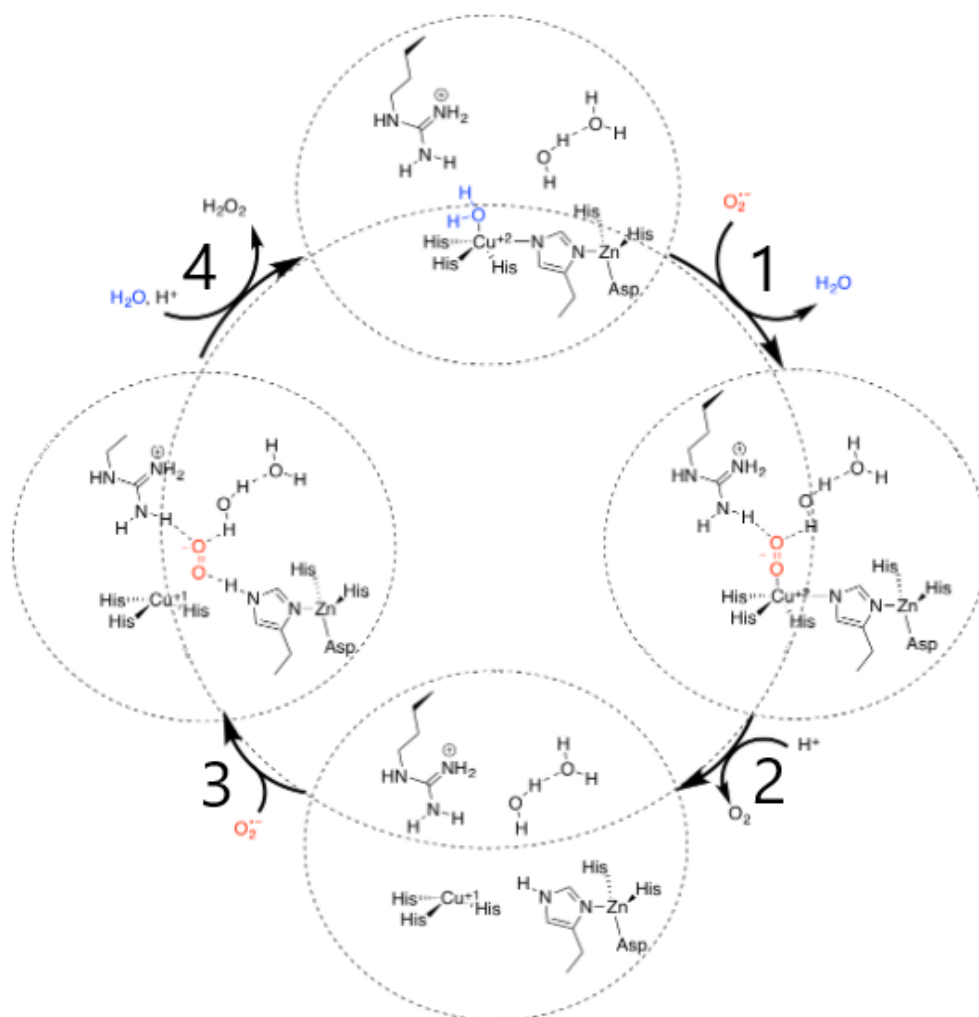
### 2.1 Superoksid dismutaza

SOD je metaloprotein koji pripada skupini oksidoreduktaza, a služi za regulaciju koncentracije ROS unutar organizma. Enzim SOD katalizira dismutaciju superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet-}$ ) u molekularni kisik i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Na taj način se smanjuje koncentracija  $O_2^{\bullet-}$  koji uzrokuje oštećenja na stanicama. Reakcija je popraćena oksidoredukcijom metalnih iona na aktivnom mjestu SOD. Dismutacija (disproporcioniranje) je reakcija gdje se na jednoj molekuli istovremeno događaju oksidacija i redukcija. Superoksid se proizvodi i slučajno i kao ROS koja je potrebna za brojne enzimske reakcije. Većina enzima koji proizvode i kojima je potreban superoksidni anion nalazi se u peroksisomima, zajedno sa SOD, katalazom i peroksidazama [4, 5, 6]. SOD regulira količinu superoksida i vodikovog peroksida kojega proizvode stanice reakcijom:



Na **Slici 1.** prikazan je mehanizam djelovanja Cu,Zn-SOD, jednog od oblika SOD. Cu,Zn-SOD je metaloprotein koji sadrži Cu i Zn ione u svakoj podjedinici. Svaka podjedinica sastoji se od 8 antiparalelnih  $\beta$  niti zajedno s 3 vanjske petlje. Zn(II) se nalazi u unutrašnjosti, Cu(II) na vanjskoj strani aktivnog mjesta, a okruženi su dvjema pozitivno nabijenim hidrofilnim aminokiselinama: histidin i arginin. U reakciji sudjeluje Cu(II), dok Zn(II) služi za stabilizaciju samog aktivnog mjesta. Jaki pozitivni naboj koji pružaju ove aminokiseline i metalni ioni privlači negativno nabijeni superoksid na aktivno mjesto gdje se odvija dismutacija [6, 7].

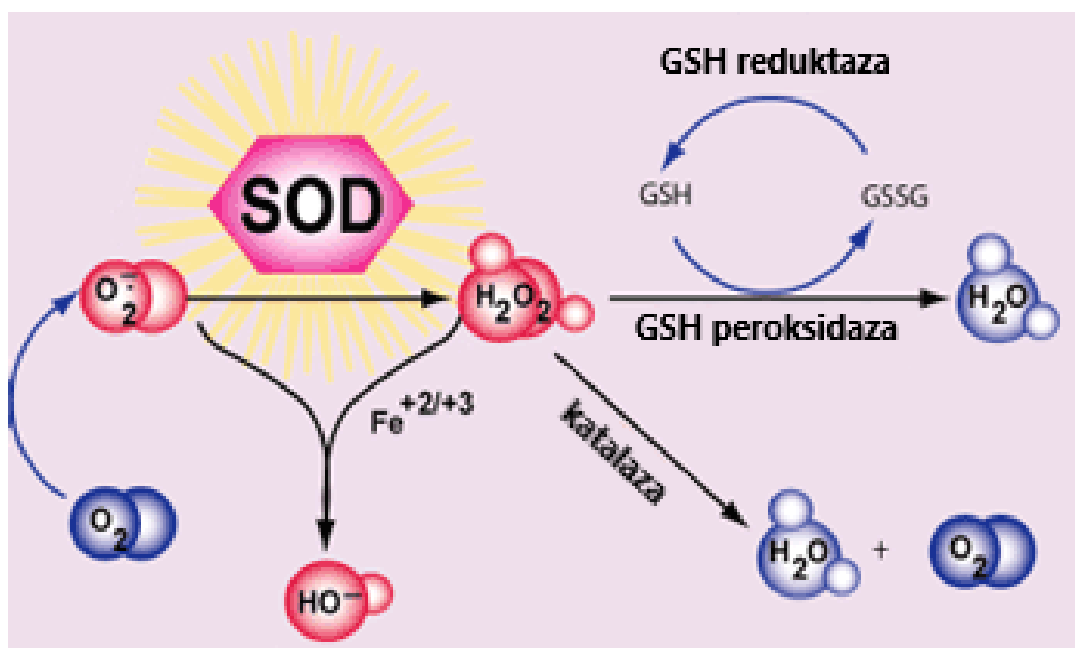




**Slika 1.** Shema mehanizma Cu,Zn-SOD, adaptirano iz [7].

1. Cu(II) metalni centar s četiri histidinska liganda i vodenim ligandom. Tada se molekula vode istiskuje dok se molekula superoksida veže za Cu(II). Ovo je reakcija supstitucije liganda pri čemu nastaje intermedijer.
2. Cu(II) oksidira jedan superoksidni anion pri čemu nastaje kisik. Kada se Cu(II) reducira u Cu(I), vezana su samo tri histidinska liganda.
3. Superoksid se veže u aktivnom mjestu H-vezom i elektrostatskim privlačenjem te dolazi do ponovnog nastanka intermedijera.
4. Cu(I) se oksidira u Cu(II), dok se molekula superoksida reducira u vodikov peroksid. Voda se veže za oksidirani Cu(II), enzim se vraća u prvobitno stanje. Ovaj kontinuirani ciklus pretvara molekulu superoksida u vodikov peroksid. Drugim riječima, destabilizacija Cu(II) omogućuje vraćanje enzima u prvobitno stanje i aktivno mjesto je slobodno za ponovnu dismutaciju.

Međutim, nastali vodikov peroksid je također toksičan i zahtjeva uklanjanje. Za uklanjanje vodikovog peroksida stanice koriste enzim katalazu, odnosno glutation peroksidazu (GSH peroksidazu). Na **Slici 2.** prikazana je shema uklanjanja  $H_2O_2$  nakon reakcije dismutacije pomoću SOD. Katalaza katalizira dismutaciju vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik, dok GSH peroksidaza razgrađuje  $H_2O_2$  pri čemu nastaje  $H_2O$ . GSH peroksidaza se regenerira putem redukcije oksidiranog oblika – GSH disulfida (GSSG) u GSH [8, 9].



**Slika 2.** Shema mehanizma uklanjanja nastalog  $H_2O_2$ , adaptirano iz [8].

Slobodni radikali poput superoksida su vrsta ROS koja može ukloniti elektrone iz proteina, lipida ili nukleinskih kiselina, uništavajući na taj način njihovu funkciju, rezultirajući staničnom disfunkcijom ili apoptozom<sup>1</sup>. To su visoko reaktivne molekule s nesparenim elektronom u vanjskoj orbitali, koje mogu pokrenuti lančane reakcije uklanjanjem elektrona iz druge molekule kako bi popunile vlastitu orbitalu. Ukoliko SOD nije u mogućnosti vršiti svoju funkciju, superoksid se ne razgrađuje te dolazi do oksidacije i oštećenja intracelularnih i ekstracelularnih struktura [9].

<sup>1</sup> Stanična smrt

### 2.1.1 Strukturna podjela superoksid dismutaza

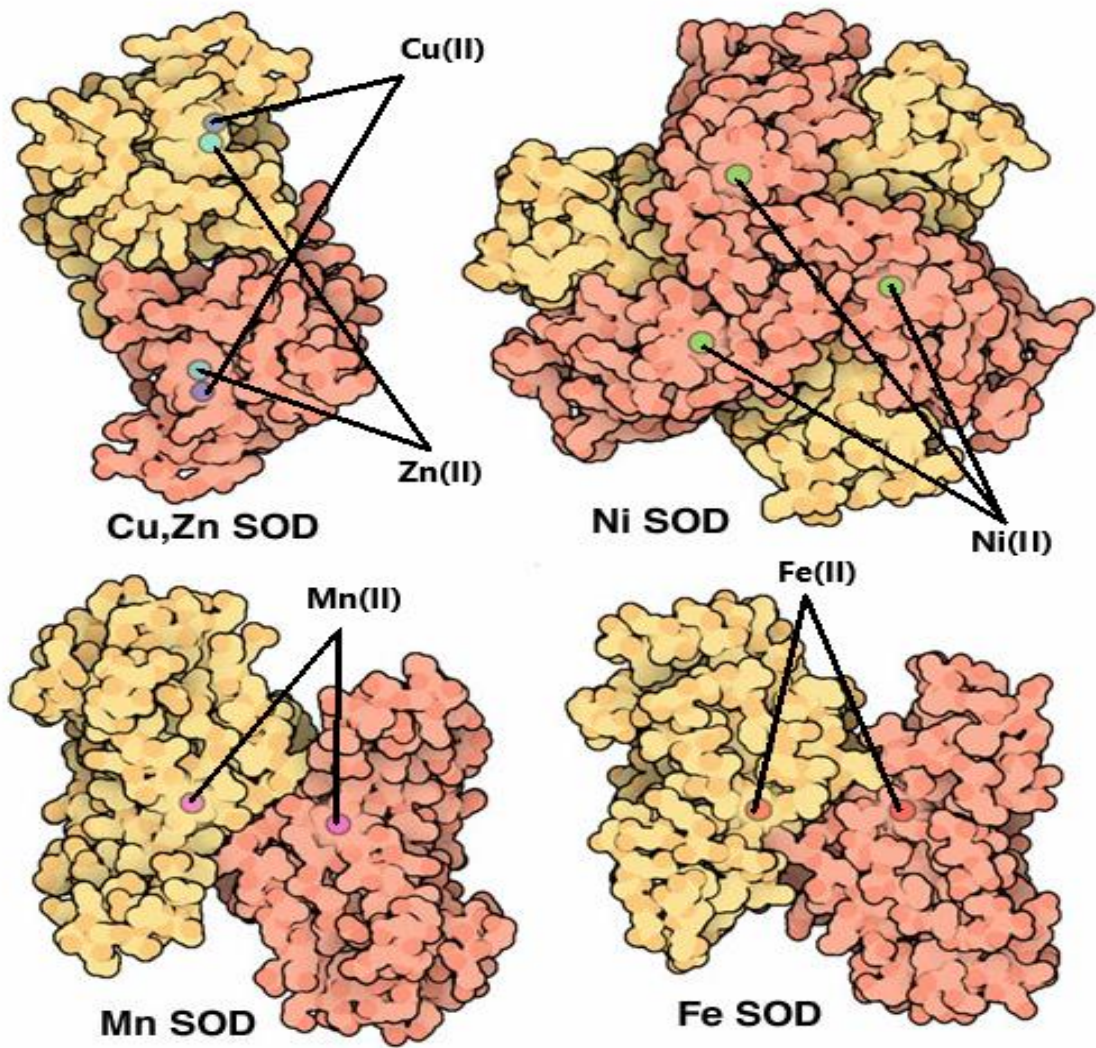
S obzirom na metalne kofaktore koji su prisutni na aktivnom mjestu, postoje 4 oblika SOD:

- Cu,Zn-SOD
- Fe-SOD
- Mn-SOD
- Ni-SOD

Svaki oblik SOD nejednako je raspoređen unutar organizma u različitim subcelularnim odjeljcima.

Kod eukariota postoje dvije vrste SOD: Cu,Zn-SOD i Mn-SOD. Cu,Zn-SOD nalazi se unutar stanice u citoplazmi no može se nalaziti i izvan same stanice (EcSOD, *eng. External SOD*), dok se Mn-SOD nalazi u samom mitohondriju. Oba enzima kataliziraju reakciju dismutacije sličnim mehanizmom [10].

S obzirom na učinkovitost enzima, smatra se da Cu,Zn-SOD ima veću mogućnost uklanjanja ROS nego Mn-SOD. Istraživanja su pokazala da 1 od 10 sudara između superoksidnog aniona i Cu,Zn-SOD dovode do reakcije, što je i više od očekivanog s obzirom da aktivno mjesto pokriva relativno mali dio enzima. Na **Slici 3.** prikazana je struktura 4 oblika SOD. Pozitivni naboj metalnih iona zajedno s nabijenim aminokiselinama služi za privlačenje negativno nabijenih superoksidnih aniona unutar enzima [10, 11].



Slika 3. Prikaz strukture četiri oblika SOD, adaptirano iz [10].

### **2.1.2 Uloga i biološki značaj superoksid dismutaze**

Uloga SOD izražena je u raznim bolestima poput raka, dijabetesa, plućne hipertenzije, fibroze izazvane zračenjem i artritisa. Postoji nekoliko istraživanja posvećenih SOD i razvoju tumora te upotrebi mimetika SOD kao terapijskih sredstava protiv progresije karcinoma [12].

Mn-SOD igra ključnu ulogu u održavanju redoks ravnoteže u mitohondrijama te na taj način pomaže u regulaciji staničnog metabolizma. Kod metaboličkih bolesti poput dijabetesa postoje velike količine ROS, zajedno s pojavom disfunkcionalnih mitohondrija. SOD mimetici sprječavaju oštećenja jetre, poboljšavaju osjetljivost na inzulin i smanjuju upale povezane s dijabetesom tipa 2 izazvanim pretilošću [12].

S druge strane, EcSOD, jedina superoksid dismutaza u izvanstaničnom prostoru, ima jedinstvene karakteristike i funkcije u prijenosu staničnih signala. Visoka koncentracija ovoga enzima pronalazi se unutar kardiovaskularnog endotela, pluća, bubrega, gušterače i maternice te mozga [13].

U usporedbi s druge dvije unutarstanične SOD, EcSOD je relativno nov u pogledu uloge u supresiji tumora, a mehanizmi koji su uključeni manje su poznati. Ipak, stupanj diferencijalne ekspresije ovog izvanstaničnog antioksidansa u karcinomu u odnosu na normalne stanice, odnosno tkiva izraženiji je i rašireniji od ostalih SOD. Značajna povezanost niske ekspresije EcSOD sa smanjenim preživljavanjem bolesnika s rakom sugerira da gubitak izvanstanične redoks regulacije potiče napredovanje raka [13, 14].

S obzirom da veliki niz mehanizama posreduje u deregulaciji ekspresije, funkcije i stanične distribucije EcSOD, gubitak ovog izvanstaničnog antioksidansa daje selektivnu prednost određenim stanicama karcinoma. Također, prekomjerna ekspresija EcSOD inhibira rast i metastaze tumora, što ukazuje na njegovu ulogu u supresiji tumora [13, 14].

### 2.1.3 Uloga antioksidansa u regulaciji reaktivnih vrsta

Superoksid dismutaza je endogeni enzim i enzim prve linije obrane koji sudjeluje u eliminaciji superoksida katalizirajući njegovu dismutaciju u  $O_2$  i  $H_2O_2$ . Najraniji sintetički antioksidativni spojevi izvorno su razvijeni kao SOD mimetici, pogotovo jer uloga peroksinitrita ( $ONOO^-$ ) i njegovih produkta razgradnje u to vrijeme nisu bili dobro definirani. Ranijim istraživanjima otkriveno je da niz lijekova, poput protuupalnih lijekova, statina i antibiotika, ima ulogu u regulaciji oksidativnog stresa, potencirajući ulogu ROS kod određenih bolesti. S obzirom da je oksidativni stres prisutan u mnogim patološkim stanjima, većina istraživanja temelji se na otkrivanju antioksidativnog potencijala nekoliko prirodnih, odnosno sintetičkih spojeva. Veće razumijevanje biološke aktivnosti SOD mimetika i ROS pružilo je bolji uvid u prirodu i ulogu ROS te RNS (*eng. Reactive Nitrogen Species*) u uvjetima oksidativnog stresa [15, 16].

RNS je skupina spojeva koji nastaju slijedom reakcija dušikovih spojeva, od kojih je prva reakcija nastanak peroksinitrita iz dušikovog oksida i superoksida. Dalje peroksinitrit može reagirati s drugim molekulama da bi stvorio dodatne RNS, uključujući dušikov dioksid ( $\cdot NO_2$ ) i dušikov trioksid ( $N_2O_3$ ), kao i druge vrste kemijski reaktivnih slobodnih radikala [15, 16, 17].

Reakcije koje uključuju nastanak RNS:

- (1)  $\cdot NO + O_2 \cdot \rightarrow ONOO^-$
- (2)  $ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH$  (peroksinitrozna kiselina)  $\rightarrow \cdot NO_2 + \cdot OH$
- (3)  $ONOO^- + CO_2 \rightarrow ONOOCO_2^-$  (nitrozoperoksikarbonat)
- (4)  $ONOOCO_2^- \rightarrow \cdot NO_2 + O=C(O\cdot)O^-$  (karbonatni radikal)
- (5)  $\cdot NO + \cdot NO_2 \rightleftharpoons N_2O_3$

Peroksinitrit može izravno reagirati s proteinima koji sadrže prijelazne metale. Stoga može modificirati proteine poput hemoglobina, mioglobina i citokroma c oksidacijom željeznog hema u odgovarajuće željezne oblike. Također, može promijeniti strukturu proteina reakcijom s raznim aminokiselinama u peptidnom lancu. Najčešća reakcija s aminokiselinama je oksidacija cisteina. Druga reakcija je nitriranje tirozina, međutim peroksinitrit ne reagira izravno s tirozinom. Tirozin reagira s drugim RNS koje stvara peroksinitrit. Navedene reakcije utječu na strukturu i funkciju proteina te na taj način mogu

potencijalno izazvati promjene u katalitičkoj aktivnosti enzima i prijenosu staničnih signala [18].

Redoks svojstva koja omogućuju SOD mimeticima da eliminiraju  $O_2^{\bullet-}$  čine ih potencijalno uspješnim u eliminaciji peroksinitrita,  $CO_3^{\bullet-}$ ,  $\bullet NO_2$  radikala i vjerojatno peroksi radikala i alkoksi radikala. Stoga, većina SOD mimetika nije specifična za  $O_2^{\bullet-}$  što ne ograničava njihovu upotrebu na ROS, već se koristi i za eliminaciju RNS [15].

Reaktivne vrste, kao što su  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  i  $\bullet NO$ , te oksidacijski modificirane biološke molekule (npr. nitrirani lipidi i nitrozirani proteini) uključeni su u prijenos signala, a njihovo uklanjanje utječe na primarno oksidativno oštećenje i staničnu redoks transkripcijsku aktivnost. Antioksidansi utječu i na upalne i na imunološke puteve te također moduliraju sekundarne procese oksidativnog stresa. Uklanjanje reaktivnih vrsta temelji se na redoks reakcijama. Iz tog razloga su istraživanja usmjerena na potragu primarno metalnih kompleksa koji posjeduju redoks aktivni metal i izražena koordinacijska svojstva. Prirodni metaloporfirini (npr. hem) glavne su prostetske skupine ugrađene u razne biomolekule kao što su hemoglobin, mioglobin, sintaza dušikovog oksida i citokrom c oksidaza. Kao prvi sintetički SOD mimetici pojavili su se Fe i Mn porfirini s obzirom da su kemijski dostupni, stabilni i nemaju antigeno djelovanje. Glavni razlog za korištenje SOD mimetika umjesto nativnog enzima je mogućnost modificiranja sintetičkih spojeva jer struktura SOD ograničava prolazak kroz membranu [15].

## 2.2 Mimetici superoksid dismutaze

Iako je predodređen za obranu protiv ROS, enzim SOD ima određena ograničenja te se upravo iz tog razloga koriste njegovi mimetici. To su sintetički spojevi koji imitiraju djelovanje superoksid dismutaze. Primarno se istražuju radi terapijske primjene za antioksidacijsko djelovanje zbog manje veličine, dužeg vremena poluživota i sličnosti u djelovanju s nativnim enzimom [15, 19].

Zbog svoje nestabilnosti, visoke imunogeničnosti, niske stanične apsorpcije i kraćeg vremena poluživota nativni enzim je ograničen za samu primjenu u liječenju. Upravo zbog toga koriste se SOD mimetici koji imaju duže vrijeme poluživota, visoku stabilnost i manju imunogeničnost. Uporaba native SOD predstavlja problem zbog manjeg nakupljanja u upaljenim područjima radi loše cirkulacije odnosno kraćeg vremena poluživota i brzog izlučivanja iz organizma. Među najčešće korištenim SOD mimeticima izdvajaju se metaloporfirini, Mn ciklički poliamini i nitroksidi [15, 19].

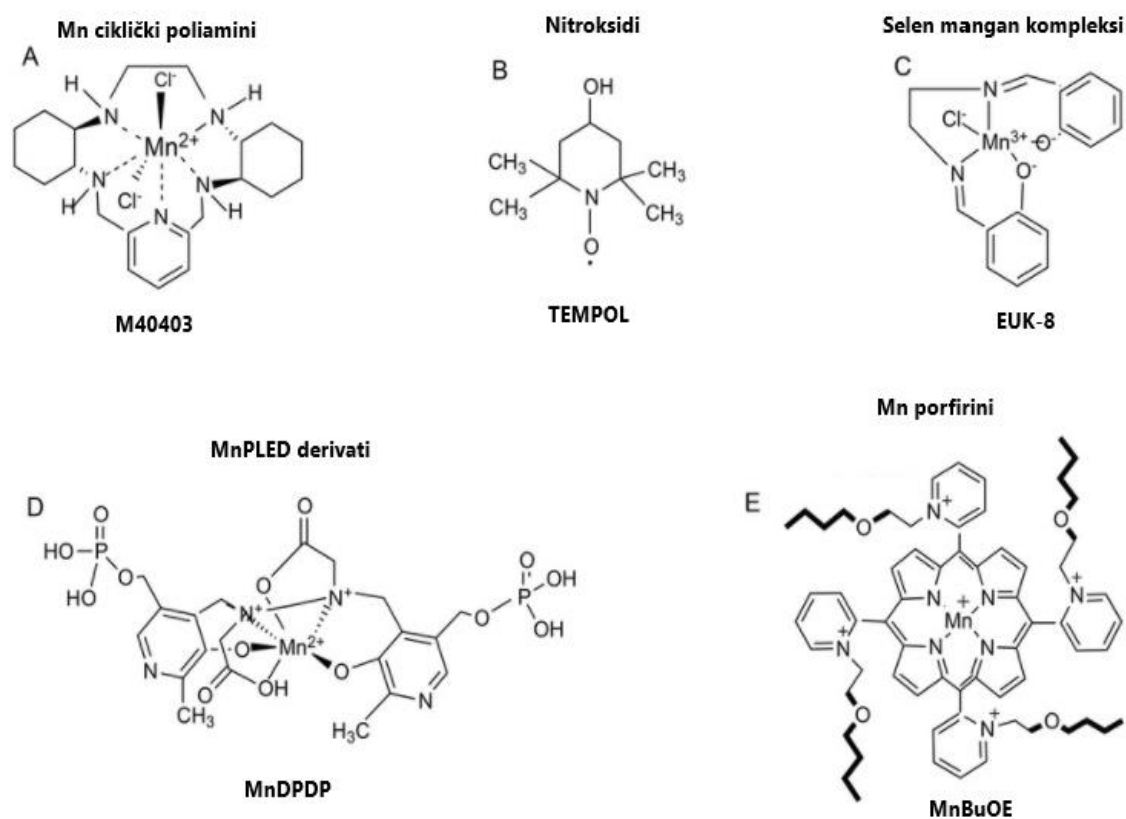
Kemijska struktura SOD mimetika uglavnom se sastoji od koordinacijskih kompleksa mangana, željeza ili bakra (i cinka). Metalni kompleks mora biti elektropozitivan, što mu omogućuje prihvaćanje elektrona iz superoksida. To se postiže koordinacijom liganda oko metalnog središta prilikom čega se ligand ponaša kao elektron akceptor. Budući da mehanizam SOD mimetike uključuje redoks ciklus, katalitička aktivnost SOD mimetika djelomično ovisi o redukcijskom potencijalu metalnog središta [19, 20].

Veličina native SOD uzrokuje otežan prolazak kroz membranu stanice, ograničeni poluživot prilikom cirkulacije u organizmu, njihovu antigenost, kao i visoke troškove proizvodnje samog proteina. Stoga su sintetizirani brojni mimetici SOD s niskomolekularnom masom kako bi uklonili nekoliko ovih ograničenja. SOD mimetici također reagiraju s reaktivnim dušikovim vrstama koje uključuju dušikov oksid. Mimetici SOD, koji generiraju dodatni vodikov peroksid kao nusprodukt reakcije dismutacije, mogu smanjiti proliferaciju tumorskih stanica i povećati učinkovitost kemoterapije i radioterapije prilikom liječenja. S druge strane, mimetici SOD također mogu potaknuti preživljavanje ili proliferaciju normalnih stanica, pružajući zaštitu od nuspojava prilikom tretiranja tumora radioterapijom i kemoterapijom. Osim toga, SOD mimetici pružaju daljnji uvid u ulogu ROS u karcinogenezi [19, 20, 21].



## 2.2.1 Mn-SOD mimetici

Kompleksi selen-mangana (III) sadrže aromatske prstenaste strukture koje povećavaju topljivost lipida i propusnost stanica za cijeli kompleks. Mangan (II) i željezo (III) kompleksi se obično koriste zbog visoke kinetičke i termodinamičke stabilnosti, povećavajući poluživot mimetika. Utvrđeno je da su mimetici na bazi mangana podobni za liječenje zbog niske toksičnosti, veće katalitičke aktivnosti i povećane stabilnosti. Najčešće korišteni Mn-SOD mimetici su kompleksi Mn porfirina. Na **Slici 4**, prikazane su neke od struktura različitih Mn-SOD mimetika [21, 22].



**Slika 4.** Prikaz različitih skupina Mn-SOD mimetika, adaptirano iz [22].

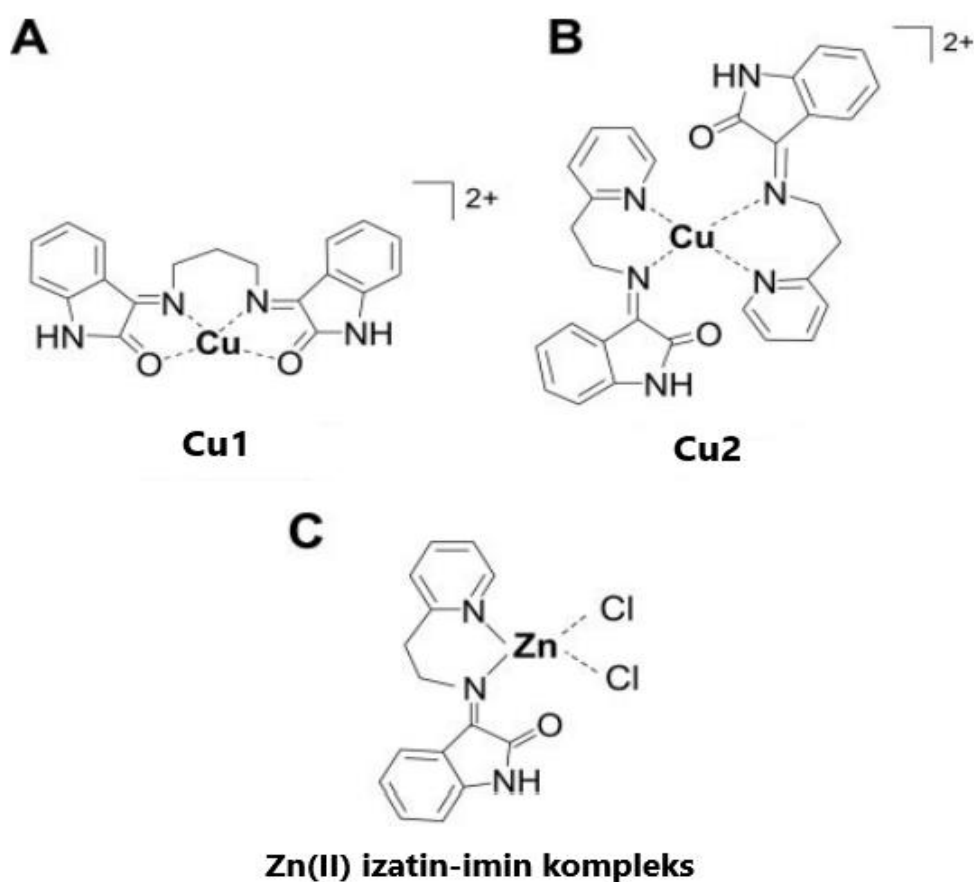
- A) M40403 (N,N'-bis{(1R,2R)-[2-(amino)]cikloheksil}-1,2-diaminoetan tetrahidroklorid) – skupina Mn cikličkih poliamina
- B) TEMPOL (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil) – skupina nitroksida
- C) EUK-8 N,N'-bis(saliciliden) etilendiamin klorid – skupina Mn selen kompleksa

D) MnDPDP (trinatrijev mangafodipir) – skupina MnPLED derivata

E) MnBuOE (Mn(III)mezo-tetrakis(N-n-butoksietilpiridin-2-il)porfirin) – skupina Mn porfirina

### 2.2.2 Cu,Zn-SOD mimetici

Zn-SOD i Cu-SOD mimetici pokazuju izraženu proapoptotsku aktivnost u mitohodrijima putem p53. Protein p53 ima izraženu ulogu u kontroli staničnog rasta i tumorskoj supresiji s obzirom da stvara tetramere koji vezanjem za određeni slijed na DNA (*eng. Deoxyribonucleic acid*) aktiviraju transkripciju [22, 23]. Među poznatim spojevima izdvajaju se kompleksi bakar (II) izatin Schiffove baze, dobivenih iz izatina i 1,3-diaminopropana ili 2-(2-aminoetil) piridina: Cu1 i Cu2 te Zn(II) izatin-imin kompleks. Na **Slici 5.** prikazane su strukture kompleksa bakra te cinka i izatina [24].



**Slika 5.** Prikaz strukture Cu1, Cu2 i Zn(II) izatin-imin kompleksa, adaptirano iz [24].

S obzirom da postoji u dva oksidacijska stanja, Cu(I) i Cu(II), ovaj je element izvrstan katalizator redoks ciklusa u prisutnosti kisika stvarajući ROS. Osim dobro poznatih štetnih učinaka, ROS može djelovati i kao drugi glasnik, koji, ovisno o njihovoj koncentraciji može pokrenuti različite puteve prijenosa signala koji u konačnici ili dovode do preživljavanja stanica ili do apoptoze [24].

Dokazano je da ti spojevi pokreću apoptozu u mitohondrijima putem p53 proteina. Široki opseg apoptoze je izražen zbog same kinetike unutarstanične apsorpcije bakra. Cu<sup>2+</sup> ulazi u stanice učinkovitije i oštećuje jezgru te mitohondrije. Suprotno tome, Cu<sup>1+</sup> iako je manje propusan, uzrokuje povećanje koncentracije ROS, što je dokazano analizama koncentracije ROS i oksidacijom proteina te lipida [24, 25].

Povećanje antioksidativne obrane, prekomjernom ekspresijom Cu,Zn-SOD, djelomično djeluje protiv stanične smrti. Međutim, apoptoza se značajno smanjila kada je korišten analogni cinkov kompleks, što dokazuje da se cinkovi kompleksi koriste većinom u obrani organizma od ROS [24, 25]. Navedeni spojevi Cu<sup>1+</sup> i Cu<sup>2+</sup> imaju dvostruku ulogu:

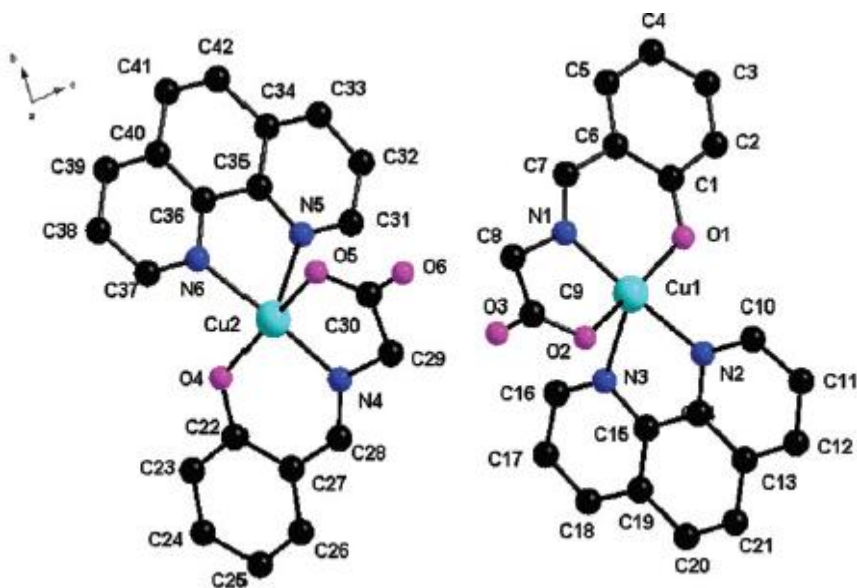
1. Transport bakra unutar stanice (stvaranje ROS)
2. Ponašaju se kao delokalizirane lipofilne molekule (selektivno otpuštanje ROS u tumorskim stanicama)

Bakar je neophodan za preživljavanje stanica, jer djeluje kao kofaktor nekoliko metaloenzima (npr. Cu,Zn-SOD i citokrom *c* oksidaza), ali je i otrovan kada je prisutan u visokim koncentracijama. Upravo iz tog razloga izbjegava se korištenje Cu-SOD mimetika za terapije. Usporedno s Cu-SOD, Zn-SOD mimetici te njihov način djelovanja nisu još u potpunosti istraženi, ali za sada nije dokazano da imaju veća štetna djelovanja [25, 26].

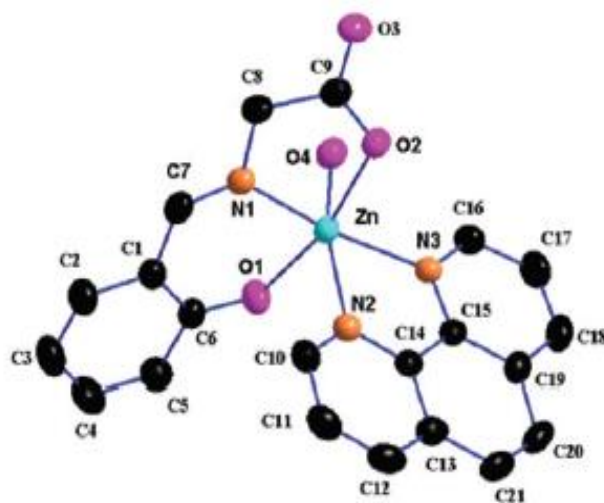
Među drugim spojevima ističu se Cu i Zn kompleksi sa Schiffovim bazama saliciliden glicina te 1,10 fenantrolina:

- Cu-1,10-fenantrolin :  $(C_9H_7NO_3)Cu(C_{12}H_8N_2)$
- Zn-saliciliden glicin :  $(C_9H_7NO_3)Zn(C_{12}H_8N_2)(H_2O)$

Na **Slici 6.** i **7.** prikazane su strukture kompleksa Cu-1,10-fenantrolin te Zn-saliciliden glicina.



**Slika 6.** Kristalna struktura Cu-1,10-fenantrolina, preuzeto iz [27].



**Slika 7.** Kristalna struktura Zn-saliciliden glicina, preuzeto iz [27].

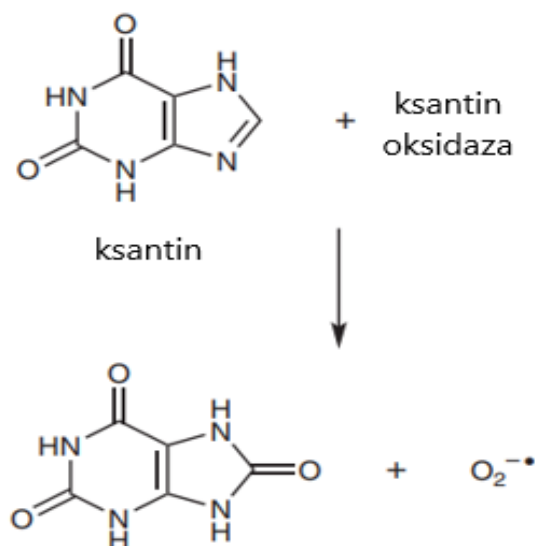
## 2.3 Metode za određivanje SOD mimetičke aktivnosti

Za određivanje mimetičke aktivnosti SOD cinkovih kompleksa razvijeno je nekoliko metoda. Prilikom određivanja aktivnosti koriste se mimetici umjesto native SOD. Među poznatijim metodama ističu se enzimatske i neenzimatske metode: inhibicija redukcije citokroma *c*, fotoredukcija riboflavin – metionin sustava te određivanje aktivnosti SOD mimetika s alkalnim DMSO u prisutnosti NBT-a.

U ovom istraživanju koriste se metode: fotoredukcija riboflavin – metionin sustava te određivanje aktivnosti SOD mimetika s alkalnim DMSO u prisutnosti NBT-a. Metode se koriste kako bi se odredila mogućnost određivanja mimetičke aktivnosti SOD cinkovih kompleksa.

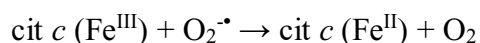
### 2.3.1 Inhibicija redukcije citokroma *c*

Navedena metoda je enzimatska te koristi sustav ksantin/ksantin oksidaza [28]. Sustav ksantin/ksantin oksidaza generira superoksidni anion reakcijom prikazanom na **Slici 8**.

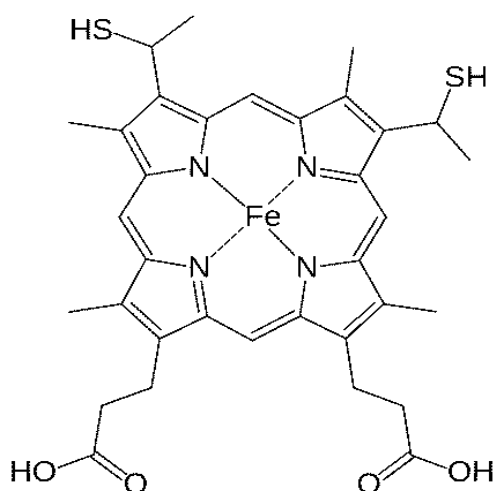


**Slika 8.** Reakcija oksidacije ksantina putem ksantin oksidaze pri čemu nastaje mokraćna kiselina te superoksidni anion, adaptirano iz [28].

Nastali superoksidni anion reducira citokrom *c* (cit *c*) reakcijom:



Citokrom *c* je enzim prisutan unutar stanice, a služi za transport elektrona te ima ulogu u apoptozi. Prilikom reakcije dolazi do redukcije  $\text{Fe}^{\text{III}}$  u  $\text{Fe}^{\text{II}}$  unutar enzima. Na **Slici 9.** prikazana je struktura citokroma *c* u oksidiranom obliku. Zn-SOD mimetik inhibira redukciju citokroma *c* uklanjajući superoksidni anion iz otopine. Određivanje mimetičke aktivnosti provodi se spektrofotometrijski pri 550 nm [28, 29].

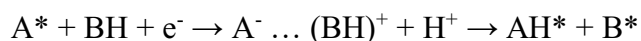


**Slika 9.** Prikaz strukture prostetičke skupine citokroma *c* u oksidiranom obliku, preuzeto iz [30].

### 2.3.2 Fotoredukcija riboflavin – metionin sustava

Riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) pripada skupini vitamina topljivih u vodi i osjetljiv je na svjetlost te visoke temperature. Fotoredukcijom u prisustvu metionina riboflavin stvara superoksidne radikale [31].

Fotoredukcija uključuje prijenos vodikovog atoma iz osnovnog stanja molekule (BH) do molekule u pobuđenom stanju ( $A^*$ ). Reakcija fotoredukcije:

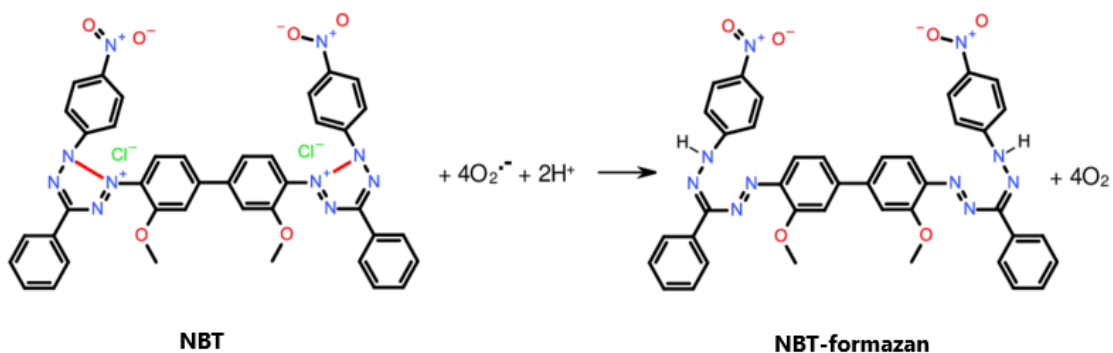


Proces se odvija u dva koraka:

- Prijenos elektrona
- Prijenos protona

U reakciji  $A^- \dots (BH)^+$  predstavljaju intermedijere, a kao rezultat fotoredukcije nastaju radikali  $AH^*$  i  $B^*$ . Reakcija je bolja ako jedan od reaktanata ima niski ionizacijski potencijal pa se ponaša kao elektron donor, što je u ovom slučaju metionin [32].

Nakon fotoredukcije metionina nastali superoksidni anion reducira nitroplavo tetrazolijev klorid (NBT) u NBT-formazan što je prikazano na **Slici 10**.

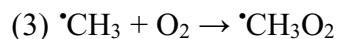
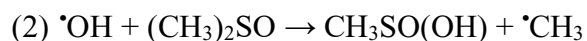
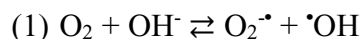


**Slika 10.** Redukcija NBT-a u NBT-formazan putem superoksidnog aniona, adaptirano iz [33].

Kolorimetrijsko/spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti se odrađuje pri 560 nm.

### 2.3.3 Uporaba alkalnog DMSO u prisutnosti NBT-a

Prilikom određivanja aktivnosti SOD mimetika, alkalni dimetilsulfoksid (DMSO) priprema se dodatkom NaOH u DMSO [33, 34]. Dodatak NaOH rezultira stvaranjem superoksidnih aniona čiji je mehanizam prikazan reakcijama (1) – (4):



Ukupna reakcija:  $2 \text{OH}^- + 3 \text{O}_2 + 2 (\text{CH}_3)_2\text{SO} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{SO}(\text{OH}) + \text{CH}_3\text{OOCH}_3 + 2 \text{O}_2^{\cdot-}$

Nastali superoksidni anioni reduciraju NBT u NBT – formazan. Promjena apsorbancije prati se UV-VIS spektrofotometrom pri 560 nm [35].



### 3. Materijali i metode

#### 3.1 Kemikalije i pribor

Sve kemikalije korištene u ovom radu su analitičke čistoće, a voda korištena za pripremu otopina je demineralizirana i deionizirana. Popis korištenih kemikalija:

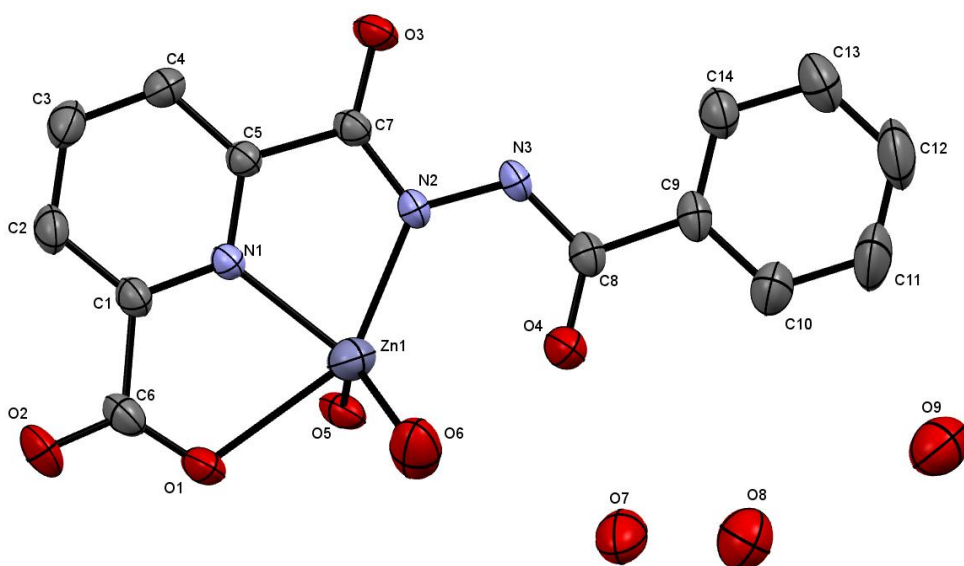
- $K_2HPO_4$ , dikalijev fosfat
- $KH_2PO_4$ , kalijev dihidrogen fosfat
- NaOH, natrijev hidroksid
- Riboflavin
- NBT, nitroplavo tetrazolijev klorid
- DMSO, dimetil sulfoksid
- EDTA, etilendiamintetraoctena kiselina
- Metionin
- Destilirana voda

Popis korištenog pribora:

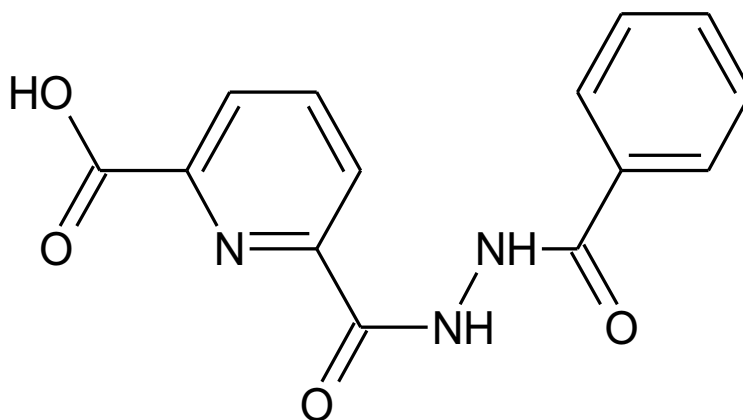
- Staklene kivete
- Mikroeprovete, 2 mL
- Staklene čaše, 25 mL i 50 mL
- Staklene epruvete, 15 mL
- Graduirane epruvete, 40 mL
- Menzure, 10 mL i 25 mL
- Okrugle tikvice s ravnim dnom, 50 mL

### 3.2 Ispitivani spoj

Mimetička aktivnost SOD određivana je za Zn kompleks označen  $Zn_1L_1$ , empirijske formule  $C_{14}H_{19}N_3O_9Zn$ , koji je prikazan na **Slici 11**. Oznaka L se odnosi na ligand 6-{[2-(fenilkarbonil)hidrazino]karbonil}piridin-2-karboksilnu kiselinu (**Slika 12**). Molekularna masa ispitivanog spoja iznosi  $438,69 \text{ g mol}^{-1}$ . Za analize je spoj otopljen u DMSO te je pripremljena osnovna otopina (*eng. "stock" solution*) spoja u koncentraciji  $c = 10 \text{ mM}$ .



**Slika 11.** Struktura Zn kompleksa kojemu je određivana SOD mimetička aktivnost.



**Slika 12.** Struktura Zn kompleksa kojemu je određivana SOD mimetička aktivnost.

### 3.3 Metoda s alkalnim DMSO

#### 3.3.1 Metoda 1

U epruvetama je pomiješano 2,1 mL 0,1 M kalijevo fosfatnog pufera (KPB, *eng. potassium phosphate buffer*), pH = 7,8 i 1 mL 56  $\mu\text{M}$  NBT. Potom je u svaku epruvetu dodano 400  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka različitih koncentracija u rasponu od 10 – 300  $\mu\text{M}$ . Epruvete su stavljene na led 20 min nakon čega je u svaku dodano 1,5 mL alkalnog DMSO reagensa (10 mL 5 mM NaOH pomiješan s 90 mL DMSO). Uzorci su kratko izmiješani na miješalici te im je, pomoću spektrofotometra (*Shimadzu UV-2600*) izmjerena apsorbanacija na valnoj duljini  $\lambda = 560 \text{ nm}$  [36].

#### 3.3.2 Metoda 2

U mikroeprevete je dodano po 1 mL alkalnog DMSO reagensa (10 mL 5 mM NaOH pomiješan s 90 mL DMSO) i 300  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka različitih koncentracija u rasponu od 10 - 300  $\mu\text{M}$ . Potom je u svaku epruvetu dodano 100  $\mu\text{L}$  NBT masene koncentracije  $\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Nulta proba je sadržavala samo alkalni DMSO (1 mL) i NBT (100  $\mu\text{L}$ ), dok je slijepu probu činio DMSO (ne alkalni, 1 mL) i i NBT (100  $\mu\text{L}$ ) [37].

### 3.4 Metoda s metionin – riboflavin sustavom

U mikroeprevete od 2 mL dodano je 900  $\mu\text{L}$  pufera za mjerenje aktivnosti SOD sastava: 50 mM KPB, pH 7,8; 0,1 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA); 13 mM metionin i 75  $\mu\text{M}$  NBT. Potom se doda 100  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka različitih koncentracija u rasponu od 10 - 300  $\mu\text{M}$ . U svaku se mikroeprevetu otpipetira 3  $\mu\text{L}$  osnovne otopine riboflavina koncentracije  $c = 1 \text{ mM}$ . Tako pripremljeni uzorci se kratko promiješaju na miješalici, preliju u kivete te stave u kutiju pod lampu od 15 W i osvijetle u trajanju 10 min. Uzorcima se mjeri apsorbanacija na valnoj duljini  $\lambda = 560 \text{ nm}$  [38].

### 3.5 Izračun SOD aktivnosti

SOD aktivnost izražava se pomoću  $IC_{50}$  vrijednosti koja opisuje količinu SOD ili SOD mimetika potrebnog za 50 %-tnu inhibiciju redukcije nekog indikatora (Deawati) [39]. Za određivanje SOD aktivnosti potrebno je odrediti % inhibicije za svaku koncentraciju ispitivanog spoja prema formuli:

$$\%inhib = \frac{Asp - Au}{Asp} \times 100$$

Pri čemu je  $Asp$  apsorbancija slijepe probe, a  $Au$  apsorbancija uzorka. Iz grafičke ovisnosti % inhibicije i koncentracije uzorka očita se  $IC_{50}$  [39].

## 4. Rezultati i rasprava

Superoksid dismutaze pripadaju obitelji enzima koji kataliziraju dismutaciju aniona superoksidnog radikala u vodikov peroksid i molekularni kisik štiteći time žive stanice od toksičnih kisikovih metabolita. Oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima povezana su s razvojem niza bolesti poput raka, neurodegenerativnih poremećaja, upala, moždanog udara i sl. U novije vrijeme, sve više raste interes za malim anorganskim kompleksima koji imaju sposobnost SOD mimetičke aktivnosti [2, 15].

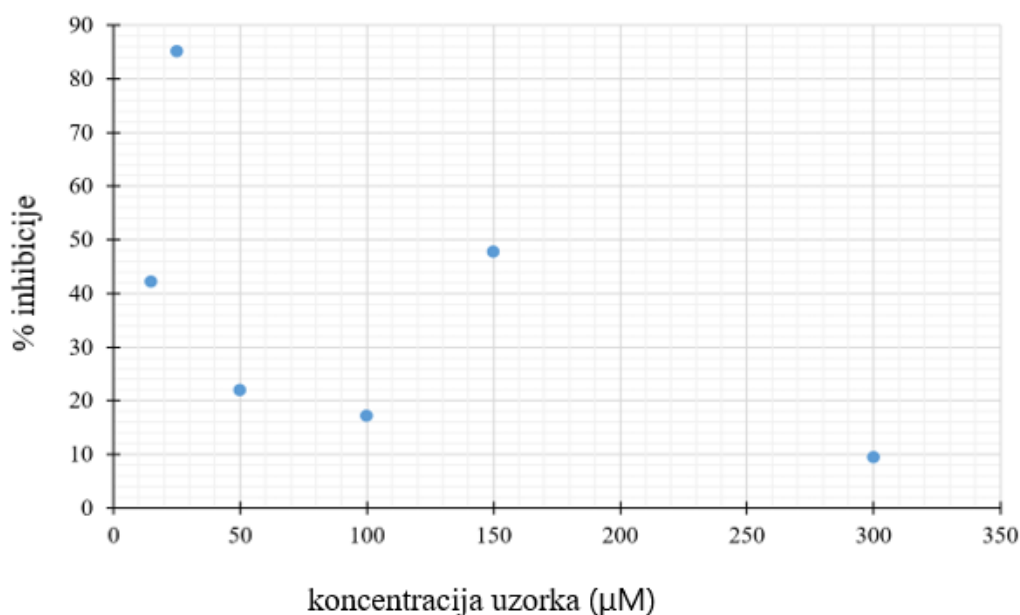
### 4.1 Određivanje SOD mimetičke aktivnosti metodom s alkalnim DMSO

Metoda u kojoj se koristi alkalni DMSO za stvaranje superoksidnih radikala jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje aktivnosti SOD. Kao „hvatač“ slobodnih radikala najčešće se koristi NBT kojeg nastali superoksidni anioni ( $O_2^{\cdot-}$ ) reduciraju u NBT-formazan. U određivanju aktivnosti SOD mimetika, mjeri se njihova sposobnost vezanja superoksidnih aniona što dovodi do smanjenja redukcije NBT. U ovom radu ispitana su dva postupka temeljena na ovoj metodi, nazvanih Metoda 1 i Metoda 2 [33, 34, 35].

U **Tablici 1.** prikazane su vrijednosti očitanih apsorbancija, dobivenih prema Metodi 1. Iz grafa na **Slici 13.** je vidljivo da su vrijednosti apsorbancija nasumične i iz njih nije bilo moguće odrediti % inhibicije za ispitivani spoj. Nakon dodatka NBT, nije opažen značajan razvoj plave boje, karakterističan za redukciju NBT u NBT-formazan. U uzorcima nije bilo vidljivo značajnije obojenje niti nakon modifikacije protokola u kojem je povećana koncentracija NBT kao indikatora promjene boje.

**Tablica 1.** Vrijednosti apsorbancije za spoj  $Zn_1L_1$ , dobivene metodom s alkalnim DMSO prema Metodi 1.

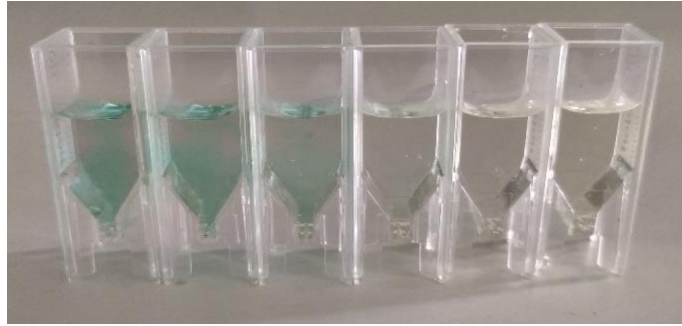
Koncentracija uzorka ( $\mu M$ )	0 (SP)	15	25	50	100	150	300
Apsorbancija ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ )	0,128	0,074	0,119	0,100	0,106	0,067	0,116
% inhibicije	-	-	-	-	-	-	-
IC <sub>50</sub>	-						



**Slika 13.** Grafički prikaz ovisnosti % inhibicije o koncentraciji uzorka ( $\mu\text{M}$ ) prema Metodi 1.

Ovu metodu koristili su Joseph i sur. [36] kako bi odredili  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti niza novosintetiziranih kompleksa s različitim metalima. Te su vrijednosti bile u rasponu od 85 - 98  $\mu\text{M}$ , pri čemu je upravo kompleks sa Zn imao najmanju vrijednost,  $\text{IC}_{50} = 85 \mu\text{M}$ . U navedenom radu određena je i  $\text{IC}_{50}$  vrijednost Cu,Zn-SOD nativnog enzima koja je iznosila 0,04  $\mu\text{M}$ . Patel i sur. [40] ovom su metodom odredili SOD mimetičku aktivnost Ni-kompleksa koja je iznosila od 40 - 65  $\mu\text{M}$ . Međutim, opisana metoda nije bila pogodna za naš uzorak što može biti posljedica slabije SOD mimetičke aktivnosti ispitivanog spoja.

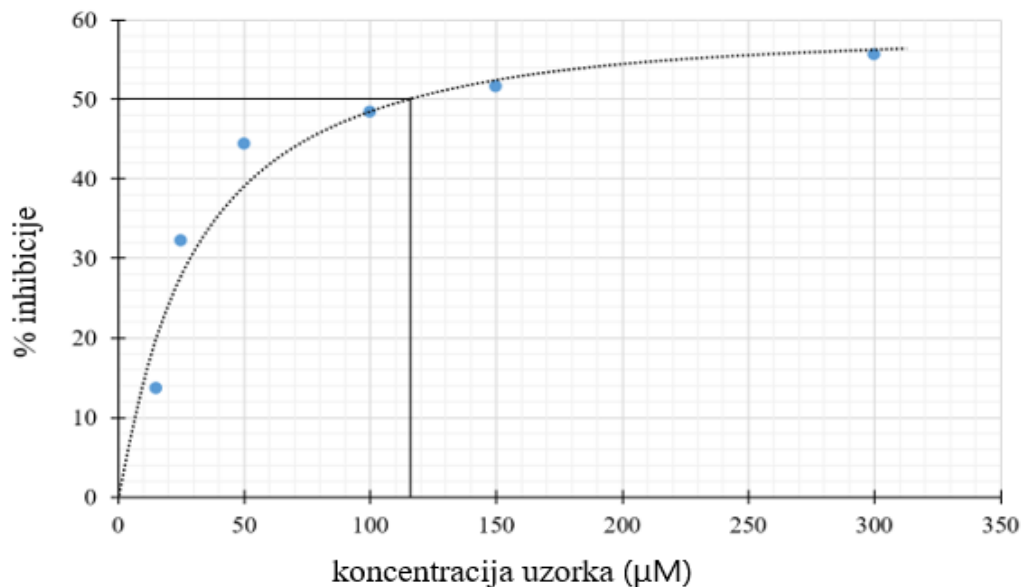
Metoda 2 je nešto pojednostavljena u odnosu na Metodu 1. Značajno je povećana koncentracija NBT u sustavu, te je istodobno smanjena ukupna količina same reakcijske smjese. Na **Slici 14.** vidljiva je promjena boje uzoraka od tirkizno plave za uzorke s manjom koncentracijom ispitivanog spoja do gotovo gubitka boje pri većim koncentracijama. U **Tablici 2.** su prikazane vrijednosti apsorbancije ispitivanog spoja kao i izračunati % inhibicije i  $\text{IC}_{50}$  vrijednost SOD mimetičke vrijednosti dobivene Metodom 2. Vrijednost  $\text{IC}_{50}$  određena je iz grafičkog prikaza na **Slici 15.** i iznosila je 117  $\mu\text{M}$ .



**Slika 14.** Promjena boje uzorka ovisno o koncentraciji ispitivanog spoja dobivena Metodom 2.

**Tablica 2.** Vrijednosti apsorbancije te izračunati % inhibicije i  $IC_{50}$  vrijednost SOD mimetičke vrijednosti  $Zn_1L_1$ , dobivene metodom s alkalnim DMSO prema Metodi 2.

Koncentracija uzorka ( $\mu M$ )	0 (SP)	15	25	50	100	150	300
Apsorbancija ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ )	0,116	0,107	0,084	0,069	0,064	0,060	0,055
% inhibicije	-	13,71	32,26	44,35	48,39	51,61	55,65
$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	117						

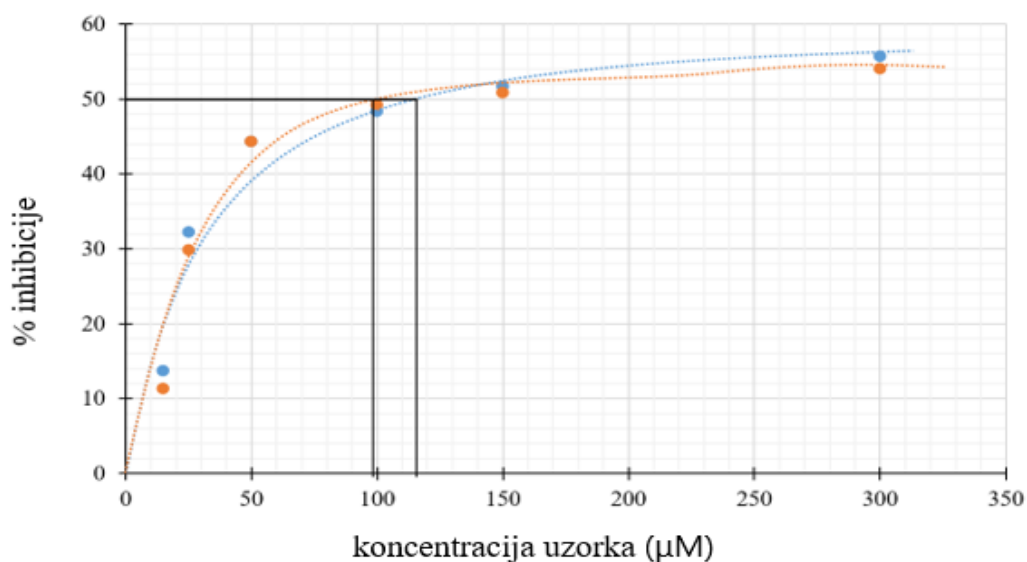


**Slika 15.** Grafički prikaz ovisnosti % inhibicije o koncentraciji uzorka prema Metodi 2.

Kako bi se ispitao utjecaj vremena na sposobnost spoja da veže nastale superoksidne anione, uzorcima je ponovno izmjerena apsorbanacija nakon inkubacije od 10 min. Vrijednosti % inhibicije kao i određena IC<sub>50</sub> vrijednost, prikazane su u **Tablici 3.** i na grafičkom prikazu na **Slici 16.** Iz rezultata se može zaključiti da vrijeme nije značajnije utjecalo na IC<sub>50</sub> vrijednost ispitivanog spoja, koja je nakon 10 min iznosila 98 μM.

**Tablica 3.** Vrijednosti apsorbanacije te izračunati % inhibicije i IC<sub>50</sub> vrijednost SOD mimetičke vrijednosti Zn<sub>1</sub>L<sub>1</sub>, dobivene metodom s alkalnim DMSO prema Metodi 2 nakon inkubacije od 10 min.

Koncentracija uzorka (μM)	0 (SP)	15	25	50	100	150	300
Apsorbancija (λ = 560 nm)	0,124	0,111	0,087	0,069	0,063	0,061	0,057
% inhibicije	-	11,29	29,84	44,35	49,19	50,81	54,03
IC <sub>50</sub> (μM)	98						

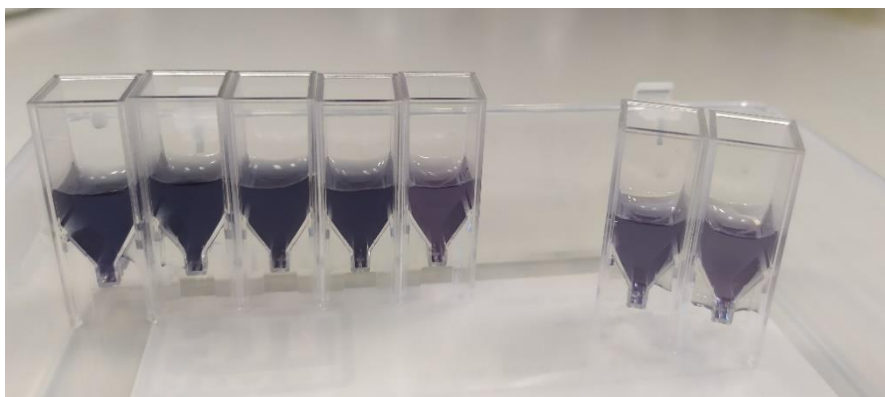


**Slika 16.** Grafički prikaz ovisnosti % inhibicije o koncentraciji uzorka prema Metodi 2 nakon 10 minuta inkubacije.



## 4.2 Određivanje SOD mimetičke aktivnosti metodom s riboflavin-metionin sustavom

Neenzimatska metoda koja se zasniva na fotoredukciji riboflavina u prisutnosti metionina često se koristi za određivanja SOD mimetičke aktivnosti [29, 31]. Prilikom fotoredukcije, nastaju slobodni superoksidni anioni koji reduciraju NBT koji služi kao indikator. Na **Slici 17.** prikazana je promjena boje iz tamno plave u svjetliju s porastom koncentracije ispitivanog uzorka, a samim time raste i njegova učinkovitost vezanja slobodnih radikala.



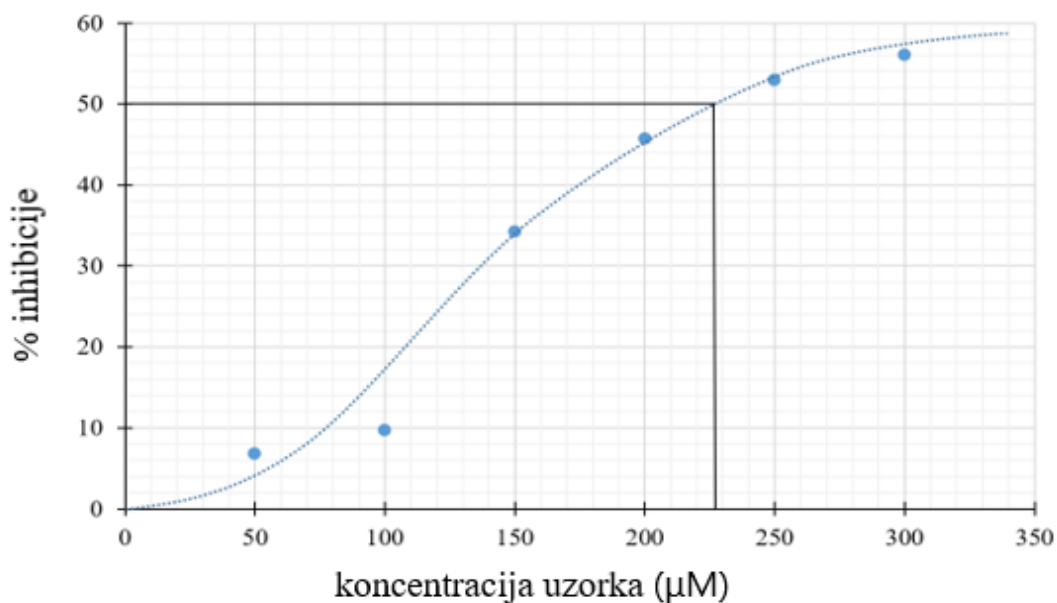
**Slika 17.** Promjena boje uzorka ovisno o koncentraciji ispitivanog spoja dobivena fotoredukcijom u riboflavin – metionin sustavu.

U **Tablici 4.** su prikazane vrijednosti apsorbancije ispitivanog spoja kao i izračunati % inhibicije i  $IC_{50}$  vrijednost SOD mimetičke vrijednosti dobivene fotoredukcijom u riboflavin – metionin sustavu. Vrijednost  $IC_{50}$  određena je iz grafičkog prikaza na **Slici 18.** i iznosila je  $228 \mu\text{M}$ . Ovom metodom dobivene su gotovo dvostruko veće vrijednosti za  $IC_{50}$  u odnosu na Metodu 2 s alkalnim DMSO što može biti rezultat manje osjetljivosti ove metode.

Zhao i sur. [41] su metodom s riboflavin-metionin sustavom određivali SOD aktivnost tri niklova kompleksa, pri čemu je ona iznosila 31, 44 i  $56 \mu\text{M}$ . Istom su metodom Deawati i sur. određivali SOD aktivnost manganova kompleksa kojemu je utvrđena vrlo niska vrijednost  $IC_{50}$  od  $2,7 \mu\text{M}$  što upućuje na vrlo visoku mimetičku sposobnost takvoga spoja.

**Tablica 4.** Vrijednosti apsorbancije te izračunati % inhibicije i IC<sub>50</sub> vrijednost SOD mimetičke vrijednosti Zn<sub>1</sub>L<sub>1</sub>, dobivene metodom s riboflavin – metionin sustavom.

Koncentracija uzorka (μM)	0 (SP)	50	100	150	200	250	300
Apsorbancija (λ = 560 nm)	1,187	1,106	1,072	0,781	0,645	0,559	0,522
% inhibicije	-	6,82	9,69	34,20	45,66	52,91	56,02
IC <sub>50</sub> (μM)	228						



**Slika 18.** Grafički prikaz ovisnosti % inhibicije o koncentraciji uzorka (μM) prema metodi s riboflavin – metionin sustavom.

## 5. Zaključak

U radu su uspoređene metode za određivanje SOD mimetičke aktivnosti cinkova kompleksa  $Zn_1L_1$ . Korištene su tri neenzimatske metode od kojih se dvije temelje na alkalnom DMSO kao izvoru superoksidnih aniona, te jedna koja koristi fotoredukciju u sustavu riboflavin-metionin kako bi se generiralo superoksidne anione. U svim metodama je NBT služio kao indikator, tj. „hvatač“ nastalih superoksidnih aniona. Metodom 1 nije bilo moguće odrediti SOD aktivnost ispitivanog spoja, dok je Metodom 2 određena  $IC_{50}$  koja je iznosila  $117 \mu M$ . Vrijeme inkubacije reakcijske smjese nije imalo znatan utjecaj na dobivenu  $IC_{50}$  vrijednost. Kod metode s fotoredukcijom riboflavina,  $IC_{50}$  vrijednost iznosila je  $228 \mu M$  iz čega se može zaključiti da je ova metoda manje osjetljiva i time manje pogodna za određivanje SOD mimetičke aktivnosti ispitivanog spoja. Usporedbom dobivenih vrijednosti, neovisno o metodi, s literaturnim podacima, vidljivo je da spoj  $Zn_1L_1$  pokazuje slabiju SOD aktivnost.

## 6. Popis kratica

Cu1 - kompleks bakra s izatinom i 1,3-diaminopropanom

Cu2 - kompleks bakra s izatinom i 2-(2-aminoetil) piridinom

DMSO - dimetilsulfoksid

DNA - *eng. Deoxyribonucleic acid*

EcSOD - *eng. External SOD*

EUK-8 - N,N'-bis(saliciliden) etilendiamin klorid

GSH peroksidaza - glutation peroksidaza

GSSG - GSH disulfid

KPB - kalij-fosfatni puffer

L - 6-[2-(fenilkarbonil)hidrazino]karbonil}piridin-2-karboksilna kiselina

M40403 - (N,N'-bis{(1R,2R)-[2-(amino)]cikloheksil}-1,2-diaminoetan tetrahidroklorid)

MnBuOE - (Mn(III)mezo-tetrakis(N-n-butoksietilpiridin-2-il)porfirin

MnDPDP - trinatrijev mangafodipir

NBT - nitroplavo tetrazolijev klorid

ROS - *eng. Reactive Oxygen Species*

RNS - *eng. Reactive Nitrogen Species*

SP - slijepa proba

SOD - superoksid dismutaza

TEMPOL - (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil)

## 7. Literatura

1. R. G. Alscher, E. Neval, S. H. Lenwood, *Journal of experimental botany* 53.372 (2002), 1331-1341.
2. S. Srivastava, S. Deependra, P. Satish, R. S. Manju, *International journal of biological macromolecules* 101 (2017), 502-517.
3. D. Salvemini, D. P. Riley, S. Cuzzocrea, *Nature Reviews Drug Discovery* 1.5 (2002), 367-374.
4. <https://bit.ly/2GptxlG> (24.8.2020)
5. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin, A. Lomri, *Join Bone Spine* 74 (2007), 324-329.
6. Y. Wang, R. Branicky, A. Noë, S. Hekimi, *Journal of Cell Biology* 217.6 (2018), 1915-1928.
7. <https://bit.ly/2QRhBet> (24.8.2020)
8. <https://bit.ly/3gTJUDt> (26.8.2020)
9. D. G. Nicholls, S. L. Budd, *Physiological Reviews* 80 (2000), 315-360.
10. <https://bit.ly/34UipYe> (29.8.2020)
11. Y. Kobayashi, Y. Nojima, T. Sakamoto, K. Iwabuchi, T. Nakazato, H. Bono, A. Toyoda, A. Fujiyama, M. R. Kanost, H. Tabunoki, *Scientific Reports* 2170.9 (2019), 1-11.
12. G. E. O. Borgstahl, R. E. Oberley-Deegan, *Antioxidants (Basel)* 7.11 (2018), 156-157.
13. B. Griess, E. Toma, F. Domann, M. Teoh-Fitzgeralda, *Free radical biology & medicine* 112 (2017), 464-479.
14. D. P. Jones, *Redox biology* 5 (2015), 71-79.
15. I. Batinić-Haberle, J. S. Rebouças, I. Spasojević, *Antioxidants & Redox Signaling* 13.6 (2010), 879-889
16. L. Y. Chang, J. D. Crapo, *Free Radical Biology and Medicine* 33 (2002), 379–386.
17. L. G. Squadrito, W. A. Pryor, *Free Radical Biology and Medicine* 25.4-5 (1998): 392-403.
18. P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet. *Physiological reviews* 87.1 (2007), 315-424.
19. H. Younus, *International Journal of Health Sciences* 12.3 (2018), 88-93.
20. V. A. Kangralkar, S. D. Patil, R. M. Bandivadekar, *International Journal of Pharmaceutical Applications* 1.1 (2010), 38-45.
21. J. S. Rebouças, G. De Freitas-Silva, I. Spasojević, Y. M. Idemori, L. Benov, I. Batinić-Haberle, *Free radical biology & medicine* 45.2 (2008), 201-210.

22. A. Zorić, A. Horvat, N. Slade, *Med Fluminens* 46.2 (2010), 135-145.
23. R. Bonetta, *Chemistry - A European Journal* 24.20 (2017), 5032–5041.
24. G. Filomeni, G. Cerchiaro, A. M. Da Costa Ferreira, A. De Martino, J. Z. Pedersen, G. Rotilio, M. R. Ciriolo, *Journal of Biological Chemistry* 282.16 (2007), 12010-12021.
25. S. Khatun, M. B. Ali, E. Hahna, K. Paeka, *Environmental and Experimental Botany* 64 (2008), 279–285.
26. M. A. Sahawneh, K. C. Ricart, B. R. Roberts, V. C. Bomben, M. Basso, Y. Ye, J. Sahawneh, M. C. Franco, J. S. Beckman, A. G. Estévez, *Journal of Biological Chemistry* 285.44 (2010), 33885-33897.
27. F. Ying, B. Xiao, T. Li, H. Y. Zhao, J. Han, Y. Xing, *Journal of Coordination Chemistry* 62.5 (2009), 745-756.
28. G. Vecchio, V. Lanza, *Journal of chemical education* 86.12 (2009), 1419.
29. K. Hyland, E. Voisin, H. Banoun, C. Auclair, *Analytical biochemistry* 135.2 (1983), 280-287.
30. R. Schweitzer-Stenner, *New Journal of Science* 2014 (2014), 2.
31. J. H. Powers, *The American journal of clinical nutrition* 77.6 (2003), 1352-1360.
32. <https://bit.ly/3boOF6Y> (2.9.2020)
33. A. R. Bakr, S. Ramahan, *Chemosphere* 153 (2016), 508-520.
34. C. Beauchamp, I. Fridovich, *Analytical biochemistry* 44.1 (1971), 276-287.
35. X. Qiao, S. Chen, L. Tan, H. Zheng, Y. Ding, Z. Ping, *Magnetic Resonance in Chemistry* 39.4 (2001), 207-211.
36. J. Joseph, G. A. B. Rani, *Arabian Journal of Chemistry* 10 (2017), 1963-1972.
37. E. Kunchandy, M.N.A. Rao, *International Journal of Pharmaceutics* 58 (1990), 237-240.
38. Z. You, L. Ni, P. Hou, J. Zhang, C. Wang, *Journal of Coordination Chemistry* 63 (2010) 515-523.
39. Y. Deawati, D. Onggo, I. Mulyani, I. Hastiawan, D. Kurnia. *Molekul* 12 (2017), 61-69.
40. R.N. Patel, S.P. Rawat, M. Choudhary, *International journal of inorganic chemistry* 3 (2013), 1-8.
41. P. Zhao, S. Zhai, J. Dong, L. Gao, X. Liu, L. Wang, J. Kong, L. Li, *Bioinorganic Chemistry and applications* 1 (2018), 1-16.

## 8. Životopis

**Marija Hefer**

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

**Odjel za kemiju**

Sveučilišni diplomski studij, istraživački smjer

Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

### **Osobni podaci:**

Adresa: Kneza Branimira 23, 31431 Čepin (Hrvatska)

Kontakt: +385915772896, [hefer.marija@gmail.com](mailto:hefer.marija@gmail.com)

Datum rođenja: 21.8.1996.

### **Obrazovanje:**

2018. – 2020. Sveučilišni diplomski studij na Odjelu za kemiju; istraživački smjer, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2015. – 2018. Sveučilišni preddiplomski studij na Odjelu za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2011. – 2015. Jezična gimnazija Osijek

2003. – 2011. Osnovna škola Miroslava Krleže, Čepin

### **Ostale aktivnosti:**

2019./2020. članica Studentskog zbora Odjela za kemiju