

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tajana Perić

**CITOTOKSIČNOST I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KVATERNIH
AMONIJEVIH SPOJEVA PIRIDINIJEVA-4-ALDOKSIMA**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, pod vodstvom doc. dr. sc. Matilde Šprung. Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

CITOTOKSIČNOST I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KVATERNIH AMONIJEVIH SPOJEVA PIRIDINIJEVA-4-ALDOKSIMA

Tajana Perić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kvaterni amonijevi spojevi (QAC) amfifilni su antimikrobni lijekovi široke primjene u mnogim industrijskim okruženjima. Zbog svoje široke upotrebe i kemijske stabilnosti, ovi spojevi dugo se zadržavaju u okolišu, što rezultira razvojem bakterijske rezistencije. S ciljem rješavanja ovog problema, mnoge su znanstveno-istraživačke skupine pokušale modificirati strukturu komercijalno dostupnih QAC-ova, ali samo nekoliko studija do sada objavilo je sintezu QACs kemijskom pretvorbom prirodnih prekursora. Kao strukturni dio mnogih prirodnih proizvoda, piridinski prstenovi dugo su bili inspiracija sintetičkim kemičarima. Stoga je u središtu ovog diplomskog rada istraživanje biološkog potencijala novo sintetiziranih QAC-ova izvedenih iz piridina. Antioksidativna aktivnost procijenjena je dvjema neovisnim metodama *in vitro*, a to su kapacitet za apsorbciju kisikovih radikala (ORAC) i metoda oksidativnog oštećenja molekule DNA, otkrivajući *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij fluorid (Py-4-BnF) kao spoj s najboljim antioksidativnim potencijalom. Citotoksičnost ovih spojeva prema zdravim ljudskim staničnim linijama, HaCat i RPE1, sugerira da su spojevi potencijalno sigurni za ljude i da bi mogli predstavljati dobro polazište za razvoj novih QAC-a u primjeni protiv gljivica. Antimikrobna aktivnost ovih spojeva ispitana na kulturama bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* pokazala je nešto niži antibakterijski potencijal.

Rad sadrži: 40 stranica, 26 slika, 2 tablice, 19 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: kvaterni amonijevi spojevi, piridin, *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij bromid, *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij fluorid, antioksidans, antimikrobnost, citotoksičnost

Voditelj: Dr. sc. Matilda Šprung, doc.

Suvoditelj: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

Dr. sc. Dubravko Pavoković, doc.

Rad prihvaćen: 19.2.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

CYTOTOXICITY AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF PYRIDINIUM-4-ALDOXIME QUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS

Tajana Perić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Quaternary ammonium (QACs) are amphiphilic antimicrobials with wide application in many different industrial environments. Due to their widespread use and chemical stability, these compounds remain in the environment for a longer period of time resulting in the development of bacterial resistance. To overcome this problem, many scientific research groups have attempted to modify the structure of commercially available QACs, but only a few studies so far report QACs synthesized from natural precursors. As a structural part of many natural products, pyridine rings have long been an inspiration for synthetic chemists. Therefore, in the scope of this diploma thesis is an investigation of the biological potential of newly synthesized QACs derived from pyridine. The antioxidative activity was assessed by two independent *in vitro* methods, namely Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and DNA nicking assays, revealing candidate *N*-benzyl-4-hydroxyiminomethylpyridinium fluoride (Py-4-BnF) with the best antioxidative potential. The cytotoxicity of these compounds toward healthy human cell lines, HaCat and RPE1, suggests that the compounds are potentially safe for humans and that they might present a good starting point for the development of new QACs with antifungal application. The antimicrobial activity testing of new compounds against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* revealed low antibacterial potential.

Thesis consists of: 40 pages, 26 figures, 2 tables, 19 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Quaternary ammonium compounds, pyridine, *N*-benzyl-4-hydroxyiminomethylpyridinium bromide, *N*-benzyl-4-hydroxyiminomethylpyridinium fluoride, antioxidants, antimicrobial activity, cytotoxicity

Supervisor: Dr. Matilda Šprung, Asst. Prof.

Assistant supervisor: Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Dr. Dubravko Pavoković, Asst. Prof.

Thesis accepted: 19.2.2020.

1	UVOD	1
1.1	Struktura i fizikalna svojstva kvaternih amonijevih spojeva.....	2
1.2	Primjena kvaternih amonijevih spojeva.....	3
1.3	Mehanizam djelovanja i bakterijske rezistencije prema kvaternim amonijevim spojevima.....	4
1.4	Komercijalno dostupni kvaterni amonijevi spojevi	6
1.5	Piridin kao dio strukture biološki aktivnih prirodnih produkata	7
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3	MATERIJALI I METODE	11
3.1	Kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala.....	11
3.1.1	Priprema mikrotitarske pločice	13
3.2	Metoda oksidativnog oštećenja molekule DNA	15
3.2.1	Izolacija plazmida	15
3.2.2	Priprema otopina.....	16
3.2.3	Priprema reakcijskih smjesa i elektroforeza u gelu agaroze	16
3.3	Ispitivanje citotoksičnosti.....	17
3.3.1	Priprema stanica	18
3.3.2	Postavljanje eksperimenta i obrada podataka	19
3.4	Ispitivanje antimikrobnog potencijala.....	21
4	REZULTATI	22
4.1	Rezultati određivanja kapaciteta za apsorpciju kisikovih radikala, ORAC	22
4.2	Rezultati ispitivanja oksidativnog oštećenja molekule DNA.....	24
4.3	Rezultati ispitivanja citotoksičnosti	25
4.4	Rezultati ispitivanja antimikrobnog potencijala	31
5	RASPRAVA	34
6	ZAKLJUČAK	37

7	LITERATURA	38
---	-------------------------	----

1 UVOD

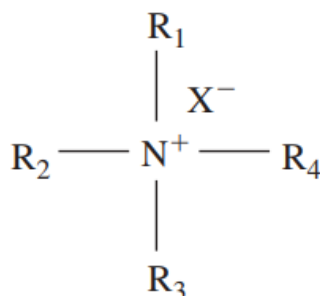
Kvaterne amonijeve soli (engl. *Quaternary Ammonium Compounds*, QACs) su amfipatske molekule koje svoju primjenu pronalaze u brojnim industrijama, kao surfaktanti, boje, neuromuskulotorni blokatori, antiseptici, anestetici, itd. Zbog svog jakog antimikrobnog djelovanja osnovno su sredstvo u borbi protiv bakterija u medicinskom, industrijskom i kućnom okruženju. Antimikrobno djelovanje QACs zasniva se na elektrostatskoj interakciji između pozitivno nabijenog dušikovog atoma i negativno nabijenih skupina na staničnoj membrani bakterije. Dolazi do prožimanja nepolarnih bočnih alkilnih QACs lanaca u bakterijsku membranu, curenja citoplazme i naposljetku, lize stanice. S obzirom na razlike u građi stijenke između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, varira i njihova otpornost na QACs. Gram-pozitivne bakterije posjeduju samo stijenku građenu od debelog sloja peptidoglikana, dok Gram-negativne bakterije imaju kompleksniju staničnu stijenku građenu od dva dijela, unutarnjeg tankog sloja peptidoglikana, te debljeg vanjskog sloja bogatog lipopolisaharidima. Smatra se, da je upravo ovaj drugi sloj razlog smanjene aktivnosti djelovanja QACs protiv Gram-negativnih bakterija [1].

S obzirom da su QACs amfipatski spojevi s djelovanjem na bakterijsku membranu, dugo se smatralo da je rezistencija na ovakve spojeve gotovo nemoguća. Međutim, novija istraživanja ukazuju da je rezistencija na QACs široko rasprostranjena zbog pumpi koje izbacuju navedene spojeve, ali i drugih, još nerazjašnjenih mehanizama otpornosti. Spojevi benzalkonijev klorid (BAC), cetrimonijev bromid (CTAB), cetilpiridinijev klorid (CPC) i didecildimetilamonijev klorid (DDAC), najčešće su korišteni komercijalno dostupni QACs. Zbog slabe reaktivnosti dolazi do njihova nakupljanja u okolišu. Kao posljedica toga, bakterije su im stalno izložene, razvijajući otpornost na njih, što predstavlja prijetnju za ljudsko zdravlje [1, 2].

Do sada su mnoge istraživačke skupine pokušale modificirati strukture raspoloživih komercijalnih QACs, a samo je nekoliko dosadašnjih studija objavilo sintezu QACs derivatizacijom prirodnih prekursora. Kao dio strukture mnogih prirodnih spojeva, piridin je dugo vremena bio i još je uvijek inspiracija sintetskim kemičarima. Tako se ovaj spoj može naći kao dio strukture pesticida i brojnih lijekova poput deferoksamina, pentazocina, i esomeprazola, a u prirodi dolazi kao dio strukture vitamina B6 i niacina te kao dio kofaktora NAD⁺ i NADPH [3, 4, 5].

1.1 Struktura i fizikalna svojstva kvaternih amonijevih spojeva

Kvaterni amonijevi spojevi (engl. QACs) spadaju u skupinu amina, a nastaju u reakciji između tercijarnih amina i metil-halogenida (CH₃X) ili primarnih alkil-halogenida (RCH₂X), pri čemu uz kvaternu amonijevu sol nastaje i odgovarajući halid. Riječ je o relativno velikim molekulama, čije se molekularne mase kreću od 250 g/mol do 400 g/mol. Karakteriziraju ih visoko talište, te odsutnost boje i mirisa. Opća formula takvih soli je R₄N⁺X⁻. Sadrže četiri funkcionalne grupe vezane kovalentno za centralni, pozitivno nabijeni dušikov atom (Slika 1.) [6].



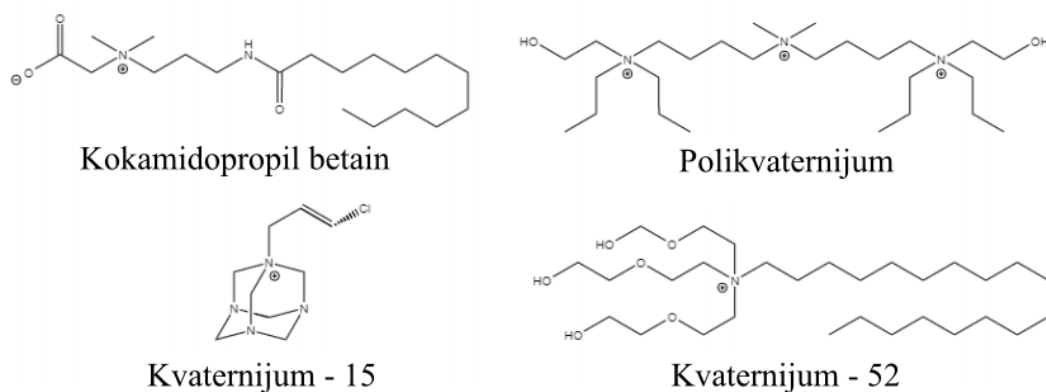
Slika 1. Struktura kvaternih amonijevih soli; R predstavlja funkcionalnu grupu, a X⁻ predstavlja halid (izvor: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118156247.ch20>).

QACs imaju polarnu „glavu“ i nepolarni „rep“ pa mogu tvoriti micide i zbog toga se često testiraju na kritičnu micelarnu koncentraciju (engl. *Critical Micelle Concentration, CMC*). Odlikuje ih stabilnost i visoka topljivost u vodi. QACs spojevi s kraćim nepolarnim lancem slabije su topljivi u nepolarnim otapalima. Spojeve s dugim nepolarnim lancem karakterizira povećana topljivost u nepolarnim otapalima te iznimna emulgirajuća svojstva. Većina sintetiziranih spojeva su kloridi i bromidi, dok jodidi pokazuju trend smanjene topljivosti. Daljnja podjela QACs je s obzirom na prirodu R grupe. Ovisno o tome, razlikuje se i njihova antimikrobna aktivnost. Primjerice, dužina alkilnog lanca R grupe govori o jačini antimikrobnog utjecaja, pa su tako QACs s dužinom lanca od C₁₂ do C₁₆ dokazani kao najučinkovitiji u borbi protiv mikroorganizama [1, 7, 8].

1.2 Primjena kvaternih amonijevih spojeva

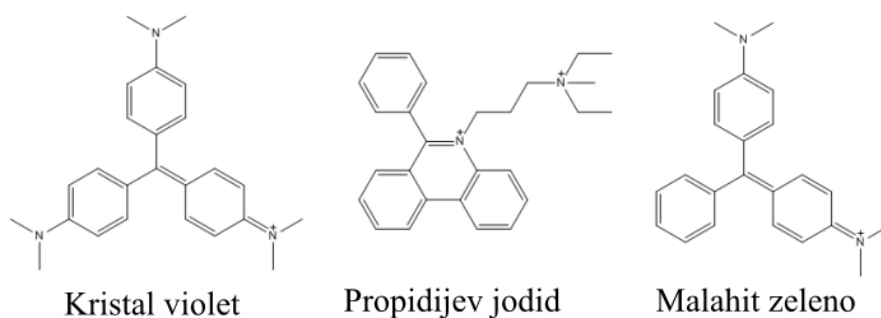
Kao što je već spomenuto, QACs pripadaju skupini amfipatskih molekula, koje svojom polarnom „glavom“ privlače vodu, a nepolarnim „repom“ ju odbijaju. Zbog svojih raznolikih fizikalnih svojstava, primjenu nalaze u brojnim industrijama – kao surfaktanti, boje, antiseptici, anestetici, itd. [1].

Surfaktanti ili površinski aktivne tvari su molekule građene od dva dijela, hidrofilne glave i hidrofobnog repa, odnosno dugog alkilnog lanca. Imaju sposobnost smanjenja napetosti koja nastaje na granici između zraka i tekućine, te igraju važnu ulogu u emulzifikaciji. U ovisnosti o naboju kojeg posjeduje hidrofilna skupina, surfaktanti se dijele u četiri skupine: anionske surfaktante, kationske surfaktante, amfoterne surfaktante i neionske surfaktante. Kvaterni amonijevi spojevi djeluju kao kationski surfaktanti, a među njima se posebno ističu kokamidopropil betain i polikvaterni spojevi (Slika 2.). Polikvaterni spojevi nezaobilazan su sastojak proizvoda za njegu kose, sapuna, dekorativne kozmetike, losina za brijanje i sl. Kokamidopropil betain se uglavnom koristi u kozmetici kao glavni sastojak šampona, dezodoransa, pasti za zube, ali i u kućanstvu kao deterdžent [1, 9].



Slika 2. Kemijske strukture kvaternih amonijevih spojeva koji imaju ulogu kao kationski surfaktanti (izvor: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsinfecdis.5b00047>).

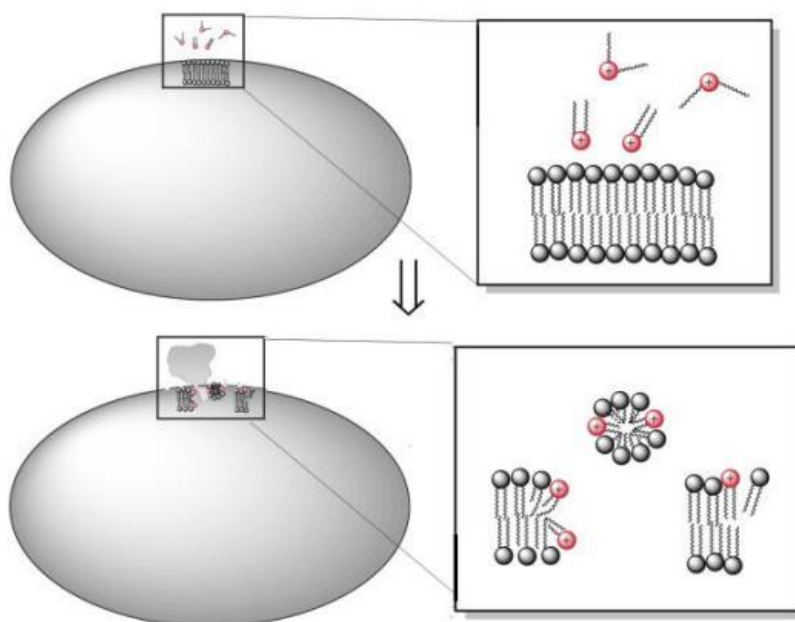
Nadalje, QACs imaju primjenu i kao biološke boje i indikatori. Boje kao što su kristal violet, propidium jodid i malahit zelena (Slika 3.) su QACs s visoko konjugiranim aromatskim sustavima pa se koriste kao biološki indikatori. Mogu sudjelovati u interakciji sa staničnom stijenkom bakterija (kristal violet kod bojanja po Gramu) ili interkalirati s DNA (propidium jodid kod laserske skenirajuće konfokalne mikroskopije) [1].



Slika 3. Kemijske strukture kvaternih amonijevih spojeva koji se koriste kao biološke boje (izvor: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsinfecdis.5b00047>).

1.3 Mehanizam djelovanja i bakterijske rezistencije prema kvaternim amonijevim spojevima

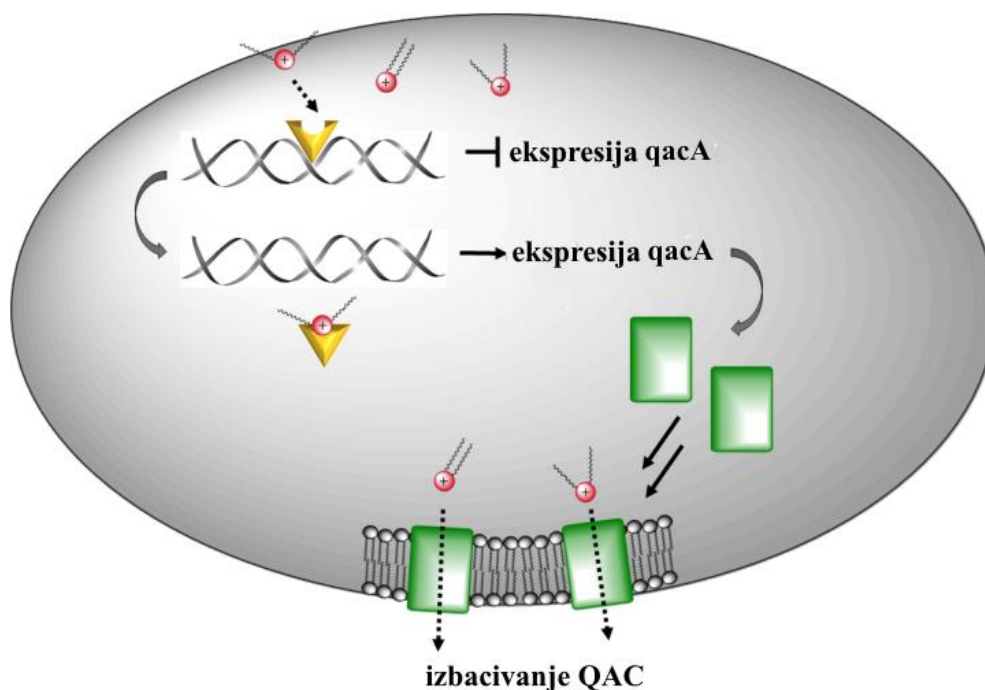
Zbog svoje amfipatske prirode, QACs imaju sličan antimikrobni mehanizam djelovanja kao detergents. Prilikom interakcije pozitivno nabijenog dušikovog atoma QACs s negativno nabijenom membranom bakterije, dolazi do prodiranja alkilnog „repa“ QACs u unutarstanični prostor bakterije. To za posljedicu ima curenje citoplazmatskog sadržaja i u konačnici dovodi do smrti stanice (Slika 4.). Zbog navedenog, QACs imaju potencijal kao antibiotici s pojačanom aktivnošću protiv Gram-pozitivnih bakterija i kao fungicidi [1].



Slika 4. Mehanizam djelovanja QACs protiv bakterija; interakcija između pozitivno nabijenog dušikovog atoma u građi QACs i negativno nabijene membrane bakterije (izvor: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsinfecdis.5b00047>).

Zahvaljujući svojoj kemijskoj stabilnosti, ovi se spojevi lako nakupljaju u okolišu, što dovodi do razvitka bakterijske rezistencije. Bakterije mogu biti urođeno rezistentne ili mogu steći rezistenciju kroz mutacije genetskog materijala, odnosno horizontalnim prijenosom gena. S obzirom da QACs djeluju na membranu, smatralo se da je razvitak rezistencije na iste gotovo nemoguć. Međutim, bakterije su usavršile mehanizme obrane, počevši od promjena u građi stanične stijenke i membrane, do razvitka pumpi za izbacivanje QACs. Geni koji omogućavaju rezistenciju na QACs najčešće se nalaze na plazmidima koji sadrže nekolicinu gena za rezistenciju na antibiotike, kao što su pripadnici plazmidne obitelji pSK1.

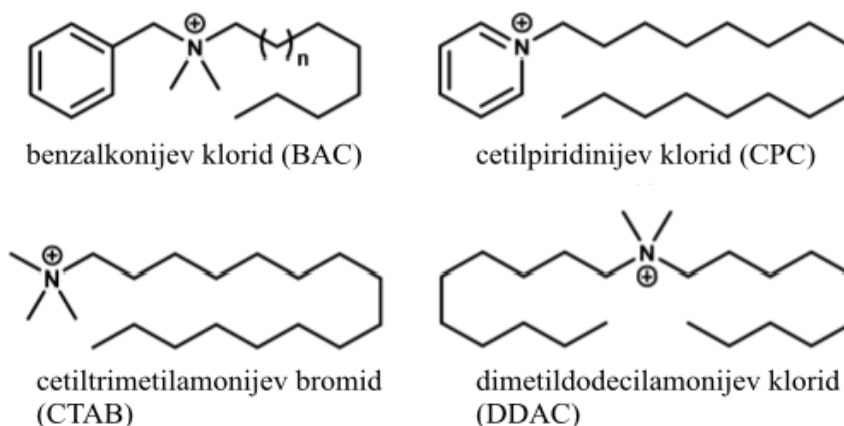
Najzastupljeniji gen za rezistenciju na QACs kod Gram-pozitivnih bakterija je *qacA*. On, zajedno sa svojih devet homolognih gena, *qacB-Z*, kodira pumpu za izbacivanje QacA. Riječ je o transmembranskom proteinu sa 14 uzvojnica. Kada QAC dođu u citoplazmu, veže ih QacR, negativni transkripcijski regulatorni protein gena *qacA*. Nakon što je supstrat vezan za QacR, on disocira s regulatornog mjesta što potiče ekspresiju efluks pumpe QacA koja izbacuje QACs iz stanice (Slika 5.) Novija istraživanja pokazala su da uz navedene, postoje i drugi, još nerazjašnjeni mehanizmi otpornosti [1].



Slika 5. Mehanizam rezistencije na QACs djelovanjem sistema qacA/R; QACs u citoplazmi (crveno), vezuju se za protein qacR (žuto), koji nakon što je supstrat vezan, potiče ekspresiju gena qacA (zeleno). QacA potom koristi proton pokretačku silu za izbacivanje QACs iz stanice (izvor: <https://www.semanticscholar.org/paper/Quaternary-Ammonium-Compounds%3A-An-Antimicrobial-and-Jennings-Minbiole/593612f0b48d6f31f1d91433ff569ca6f0754ccf/figure/17>).

1.4 Komercijalno dostupni kvaterni amonijevi spojevi

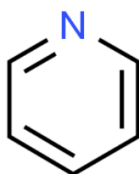
Nakon što je 1935. godine prvi put objavljen rad o benziliranim i alkiliranim QACs i njihovoj antimikrobnoj aktivnosti, našli su primjenu kao antiseptici u raznim industrijama. Zahvaljujući relativno niskoj toksičnosti, mnoštvu kemijskih struktura i jednostavnosti pripreme, QACs se učestalo koriste u kućanstvu, medicini, agrikulturi i sl. Neki od najčešće dostupnih komercijalnih QACs su benzalkonijev klorid (BAC), dimetildodecilamonijev klorid ili bromid (DDAC ili DDAB), cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) i cetilpiridinijev klorid (CPC) (Slika 6.). Kako bi se pojačao njihov učinak prema specifičnim grupama mikroorganizama, većina antiseptika koje pronalazimo na tržištu, sadrži kombinaciju različitih QACs [1, 10].



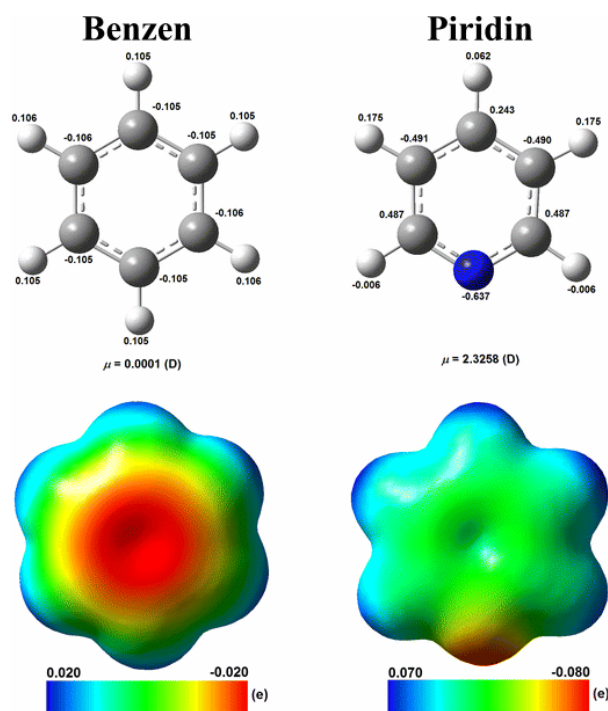
Slika 6. Kemijske strukture uobičajenih komercijalnih kvaternih amonijevih spojeva (izvor: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsinfecdis.5b00047>).

1.5 Piridin kao dio strukture biološki aktivnih prirodnih produkata

Po svojoj strukturi, piridin je tipičan tercijalni amin. Riječ je o šesteročlanom aromatskom heterocikličnom spoju strukturne formule C_5H_5N (Slika 7.). Struktura piridina analogna je strukturi benzena, u kojoj je jedna metinska C-H skupina zamijenjena atomom dušika. Taj dušik posjeduje nepodijeljeni elektronski par koji ne ulazi u π sustav budući da se nalazi u ravnini s prstenom. Zbog činjenice da je elektronegativnost dušika veća od elektronegativnosti ugljika, dušik privlači π elektrone iz prstena (Slika 8.). Ovakva elektronska konfiguraciju čini piridin dobrom bazom. Zbog navedenog, kemijska svojstva piridina slična su onima tercijalnih amina [3].



Slika 7. Struktura piridina (izvor: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1020.html>).



Slika 8. Usporedba elektronske konfiguracije benzena i piridina; raspodjela elektronske gustoće ravnomjerna je u benzenskom prstenu, dok kod piridina atom dušika privlači π elektrone iz prstena (izvor: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11224-015-0732-3>).

Piridin je prvi put izoliran 1851 godine iz koštanog ulja, a zatim iz katrana kamenog ugljena 1854. godine. U današnje vrijeme dobiva se isključivo sintetskim putem, od acetilena i amonijaka. Riječ je o stabilnoj bezbojnoj do blijedo žutoj tekućini opojna mirisa. Temperatura vrenja mu je 115 °C, a temperature taljenja -42 °C. Toksičan je inhalacijom i oralnim konzumiranjem. Zbog svojih fizikalnih karakteristika, kao što su slaba bazičnost, topljivost u vodi, stabilnost strukture, mala molekularna veličina i sposobnost formiranja vodikovih veza, piridin služi kao jako dobro otapalo za anorganske soli i organske spojeve i kemikalije, za proizvodnju bojila, dezinfekcijskih sredstava, lijekova, pesticida, prehrambenih aditiva i dr. [11].

Piridin je rijetko prisutan u prirodi, osim u lišću i korijenu velebilja (lat. *Atropa belladonna*) te pitomog sljeza (lat. *Althaea officinalis*). Ipak, derivati piridina su često dio biomolekula kao što su alkaloidi (trigonelin), vitamini (vitamin B3, vitamin B6) i koenzimi (nikotinamid adenin dinukleotid). U svakodnevnom životu, tragovi piridina mogu se pronaći u hlapljivim organskim produktima procesa pečenja, crnom čaju, vaginalnom sekretu, slini oboljenih od gingivitisa, suncokretovom medu itd. [11].

Oksimi su tekući ili kristalni organski spojevi funkcionalne skupine $R_2C=NOH$. Dobivaju se kondenzacijom aldehida ili ketona s hidroksilaminom. Ukoliko su izvedeni od

aldehida nazivaju se aldoksimi, dok se oni izvedeni od ketona nazivaju ketoksimi. Piridinijevi oksimi su derivati piridina s važnom biološkom primjenom. Koriste se kao protuotrovi kod trovanja organofosforim spojevima uključujući pesticide ili živčane bojne otrove. Ovi se otrovi zbog svoje strukture vežu na aktivno mjesto enzima acetilkolinesteraze (AChE), pri čemu je inaktiviraju. Piridinijevi oksimi djeluju kao reaktivatori acetilkolin transferaze na način da se natječu s organofosforim spojevima za aktivno mjesto enzima ili pak imaju sposobnost obnavljanja biokemijska oštećenja enzima [12].

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je istražiti biološki potencijal i toksičnost novosintetiziranih kvaternih amonijevih spojeva *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinijevih bromida i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinijevih fluorida (Py-4-BnBr, Py-4-BnF). Određivanjem antioksidacijskog i antimikrobnog potencijala, kao i ispitivanjem citotoksičnosti na zdravim humanim stanicama, dobit ćemo informacije o mogućoj primjeni ovih novih kvaternih amonijevih spojeva.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala

Kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala ili metoda ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC) služi za ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta spoja od interesa. Metoda mjeri vremenski ovisno opadanje intenziteta fluorescencije fluorescentne probe, a koje nastaje kao posljedica sudaranja probe i slobodnih radikala. Reakcijska smjesa u ovoj metodi sadrži izvor peroksi radikala, fluorescentnu probu te pufer (negativna kontrola), standard ili spoj koji ispitujemo.

Za otapanje svih kemikalija korišten je natrij-fosfatni pufer (pH 7,0) pripremljen miješanjem 19,5 mL otopine natrij-dihidrogenfosfata (0,2 M), 30,5 mL otopine natrij-hidrogenfosfata (0,2 M) i 5 mL vode.

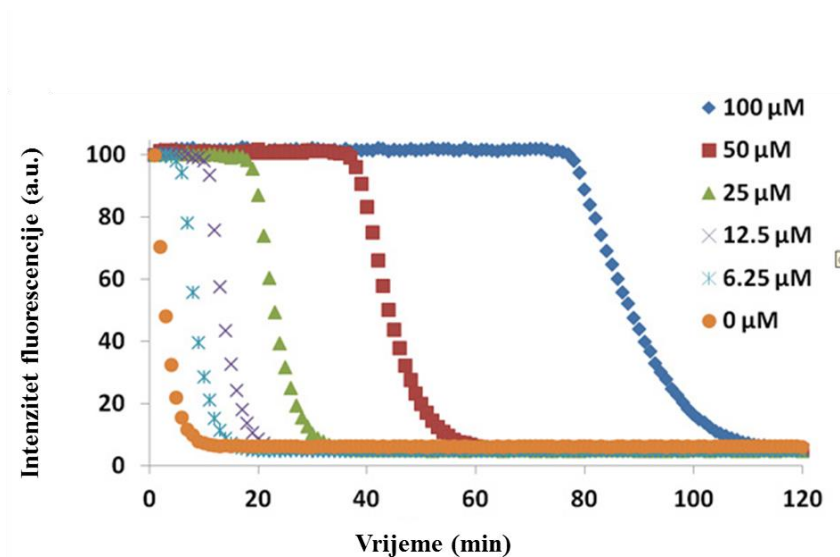
Izvor peroksi radikala, 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH), koncentracije 0,15 M, svježe se pripremi na dan provođenja eksperimenta. U vodi topljiv analog vitamina E, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), služi kao standard. Matična otopina Troloxa (25 mM) čuva se do tri mjeseca na -80 °C, a prije provođenja eksperimenta pripremi se razrijeđenje (1 mM) od kojeg se naknadno prirede reakcijske otopine standarda koncentracija: 50, 25, 12,5 i 6,25 μM. Fluorescentna proba, fluorescein (200 μM) čuva se od svjetla na temperaturi do 5 °C te se prije provođenja eksperimenta razrijedi do koncentracije 0,18 μM. Eksperiment se provodi u mikrotitarskoj pločici, temperiranoj na 37 °C mjereći intenzitet fluorescencije probe (λ_{ex} 485 nm/ λ_{em} 528 nm).

Ukoliko ispitivani spoj ima antioksidacijsku aktivnost, bilježit će se sporije opadanje fluorescencije u odnosu na negativnu kontrolu koja sadrži samo pufer (Slika 9.). Nakon što se dobiju podaci za otopine standarda, baždarni dijagram izrađuje se oduzimanjem površine krivulje slijepe probe od površine krivulje standarda. Rezultati se izražavaju kao μmol Trolox ekvivalenta (TE) po litri ili gramu uzorka (μmol TE/g ili μmol TE/L) [13, 14].

Za statističku obradu i vizualizaciju podataka korišteni su softverski alati Excel (*Microsoft*) i FL WinLab (*PerkinAlmer*). Provode se četiri mjerenja, nakon čega se podaci dobiveni u FL WinLab spremaju u Excel datoteku. Za svako mjerenje vrijedi:

broj ciklusa (28) x broj jažica = broj očitavanja fluorescencije

pri čemu je vremenski interval između svakog idućeg očitavanja fluorescencije tri minute. Podaci se obrađuju u Excelu tako da je izračunata srednja vrijednost fluorescencije slijepe probe, četiriju koncentracija standarda i devet koncentracija Py-4-BnBr/Py-4-BnF, u pojedinim vremenskim intervalima.



Slika 9. Ovisnost intenziteta fluorescencije reakcijskih otopina standarda (Trolox) inkubiranih s izvorom slobodnih radikala (AAPH) o vremenu (izvor: <https://www.biotek.es/es/resources/application-notes/determination-of-antioxidant-potential-using-an-oxygen-radical-absorbance-capacity-orac-assay-with-synergy-h4/>).

Nadalje, potrebno je u programu FL WinLab izračunati vrijednosti površina ispod normaliziranih krivulja. Neto površine (NetAUC) za pojedine otopine standarda i spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF, dobiju se na način da se od iznosa površine ispod krivulje (AUC, engl. *Area under the curve*) za otopinu standarda ili spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF oduzme iznos površine ispod krivulje slijepe probe. AUC vrijednost se izračuna po dolje navedenoj formuli, gdje F_0 označava očitavanje fluorescencije u nultoj minuti, dok je F_i fluorescencija u vremenu t .

$$\text{NetAUC} = \text{AUC (uzorka/standarda)} - \text{AUC (slijepe probe)}$$

$$\text{AUC} = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_i/f_0$$

Nakon toga, izdvajaju se vrijednosti koncentracije standarda i spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF (μM), množine standarda i spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF (μmol), AUC i NetAUC, te se izrađuje baždarni dijagram. U konačnici, antioksidacijska aktivnost ispitivanih spojeva izražava se u Trolox ekvivalentima, a izračunava se prema idućoj formuli:

$[(AUC \text{ spoj} - AUC \text{ slijepa proba}) / (AUC \text{ Trolox} - AUC \text{ slijepa proba})] \times (\text{množina Troloxa} / \text{množina spoja})$.

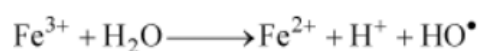
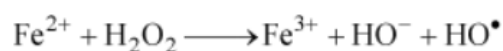
3.1.1 Priprema mikrotitarske pločice

Metoda ORAC provodi se u bijelim 96-mikrotitarskim pločicama (Porvair Sciences) pa se metodom u jednom mjerenju može dobiti velika količina informacija.

Jažice mikrotitarske pločice, popunjavaju se u kvadripletima na način da svaka jažica sadrži: 30 μL pufera (samo kod slijepa probe), 30 μL standarda Trolox (50, 25, 12,5 i 6,25 μM) ili 30 μL serijski razrijeđenog ispitivanog spoja, 180 μL otopine fluoresceina (0,18 μM) i 70 μL otopine AAPH (0,15 M). Otopina AAPH se dodaje u reakcijsku smjesu pred sam početak testa i to pipetiranjem s multikanalnom pipetom kako bi se skratilo vrijeme dodavanja. Dodavanjem AAPH u reakcijsku smjesu započinje reakcija, stoga je bitno što prije početi mjeriti fluorescenciju. Mikrotitarska pločica s dodanom probom i slijepom probom/standardnom/spojem termostatirana je desetak minuta pri 37 °C prije dodatka otopine AAPH. U svakom mjerenju u prvi red je dodana reakcijska smjesa sa slijepom probom (u četiri jažice), u drugi, treći, četvrti i peti red dodana je reakcijska smjesa sa standardnom probom (u 4 jažice), te je u šesti, sedmi i osmi red dodana reakcijska smjesa s ispitivanim spojem (Tablica 1.).

3.2 Metoda oksidativnog oštećenja molekule DNA

Metoda oksidativnog oštećenja molekule DNA (engl. *DNA nicking assay*) je metoda *in vitro* koja mjeri zaštitni učinak tvari nad molekulom DNA. Premda je riječ o metodi *in vitro*, ona omogućava prikaz stanja organizma *in vivo*. Metoda se bazira na Fentonovoj reakciji u kojoj se vodikov peroksid, u prisustvu dvovalentnog željeza, reducira do hidroksilnih radikala (Slika 10.). Nastali radikali imaju snažan oksidacijski potencijal i mogu oksidirati širok raspon organskih tvari, između ostalog i DNA pri čemu uzrokuju promjenu strukture molekule.



Slika 10. Fentonova reakcija (izvor: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322006000300007).

Tako se početna namotana konfiguracija molekule DNA, mijenja u otvorenu kružnu te u nazubljenu linearnu. Svaki od ovih oblika pokazuje specifičnu elektroforetsku pokretljivost na gelu. U prisustvu antioksidansa, hidroksilni radikali, umjesto s organskim unutarstaničnim molekulama, reagiraju s antioksidansima koji na taj način sprječavaju nepovoljno djelovanje na strukturu molekule DNA [15].

3.2.1 Izolacija plazmida

Za mjerenje oksidativnog oštećenja molekule DNA poslužio je plazmid pET21a kojim su bile transformirane stanice bakterije *Echerichia coli*, DH5 α . Za izolaciju plazmida korišten je komercijalno dostupni kit, *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich), a izolacija je provedena slijedeći upute proizvođača.

Kultura bakterije *E.coli* koja sadrži plazmid pET21a inokulirana je u 100 mL svježeg Luria-Bertani (LB) hranjivog medija s ampicilinom (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Za pripremu LB medija, u 1 l vode otopilo se 10 g natrijeva klorida, 10 g triptona i 5 g ekstrakta kvasca. Kultura je uzgajana na 37 °C u tresilici na 220 rpm. Nakon ≥ 16 sati od inokulacije, biomasa je prikupljena centrifugiranjem na 4500 rpm, u trajanju od 10 minuta. Stanični talog resuspendiran je u 400 μL pufera za resuspenziju, 400 μL pufera za lizu te 700 μL pufera za neutralizaciju. Sadržaj je

centrifugiran 10 min na 12 000 rpm. Kolone za vezanje plazmidne DNA, pripremljene su dodatkom 500 μ L otopine za pripremu kolone. Plazmidna DNA vezana je na kolonu centrifugiranjem pri 12 000 rpm. Kolonu se ispiralo dodatkom 500 μ L otopine za ispiranje 1 i 750 μ L otopine za ispiranje 2, te centrifugiranjem na 12 000 rpm. Plazmidna DNA eluirana je s kolone dodatkom 50 μ L otopine za eluaciju i centrifugiranjem 1 min na 12 000 rpm.

3.2.2 Priprema otopina

Prije provođenja svakog eksperimenta, svježe je pripremljeno 2 ml Fentonovog reagensa. Reagens je pripremljen miješanjem 1 μ L askorbinske kiseline (koncentracije 50 μ M), 200 μ L željezovog (III) klorida (koncentracije 80 μ M), 755 μ L 30% vodikova peroksida i 1044 μ L destilirane vode. DNA marker pripremljen je miješanjem 4,8 μ L 1 kb DNA ladder (New England Biolabs, NEB), 4 μ L boje i 15,2 μ L destilirane vode. Otopina spoja (Py-4-BnBr/Py-4-BnF) koncentracije 10 mg/mL služila je za pripremu radnih koncentracija od 16 mM, 8 mM i 4 mM.

3.2.3 Priprema reakcijskih smjesa i elektroforeza u gelu agaroze

Serijska razrjeđenja spoja pripremljena su u koncentracijama od 16 mM, 8 mM i 4 mM, u volumenu 5 μ L, te su zajedno s DNA plazmidom pET21a stavljena na inkubaciju 10 min na sobnoj temperaturi. Reakcijske smjese pripremljene su u Ependorf tubicama, dodatkom DNA plazmida pET21a i spoja (Py-4-BnBr/Py-4-BnF) predhodno, te potom Fentonova reagensa, katalaze, vode i boje. Sve su tubice potom inkubirane u trajanju od 30 min na 37 °C. Za analizu uzoraka, korišten je 1% agarozni gel, pripremljen otapanjem 0,5 g agaroze (Sigma-Aldrich) u 50 mL 1x TAE pufera, (Tris acetat EDTA; 40 mM Tris baza, 20 mM octena kiselina i 1 mM EDTA), te se dodalo 4 μ L etidijevog bromida, koncentracije 10 mg/mL. Uzroci su nanošeni na gel idućim redoslijedom:

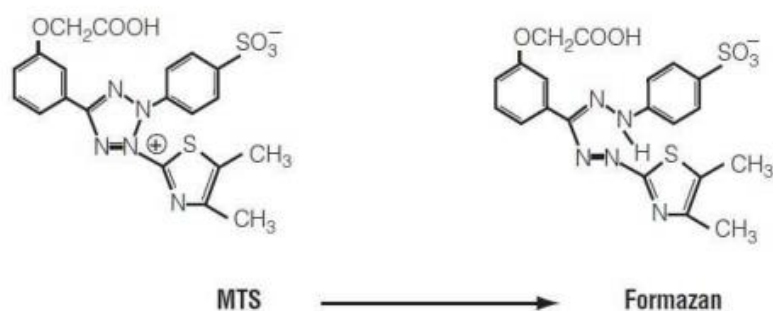
1. 5 μ L 1 kb DNA ladder
2. 10 μ L 1 kb DNA plazmida pET21a + 6 μ L vode + 4 μ L boje
3. 10 μ L 1 kb DNA plazmida pET21a + 2,5 μ L Fentonova reagensa + 3,5 μ L vode + 4 μ L boje

4. 10 μ L 1 kb DNA plazmida pET21a + 2,5 μ L Fentonova reagensa + 1 μ L katalaze + 2,5 μ L vode + 4 μ L boje
5. 10 μ L 1 kb DNA plazmida pET21a + 2,5 μ L Fentonova reagensa + 2,5 μ L katalaze + 1 μ L vode + 4 μ L boje
6. 10 μ L 1 kb DNA plazmida pET21a + 2,5 μ L Fentonova reagensa + 5 μ L 16 mM Py-4-BnBr/ Py-4-4BnF + 2,5 μ L boje
7. 10 μ L 1 kb DNA plazmida pET21a + 2,5 μ L Fentonova reagensa + 5 μ L 8 mM Py-4-BnBr/ Py-4-4BnF + 2,5 μ L boje
8. 10 μ L 1 kb DNA plazmida pET21a + 2,5 μ L Fentonova reagensa + 5 μ L 4 mM Py-4-BnBr/ Py-4-4BnF + 2,5 μ L boje

Nakon elektroforeze u trajanju od 45 minuta pri naponu od 75 V, gel se prebacuje u uređaj Bio-Rad Gel Doc Universal Hood II Molecular Imager za vizualizaciju rezultata, te dokumentira.

3.3 Ispitivanje citotoksičnosti

Test citotoksičnosti zasniva se na mjerenju viabilnosti stanica, koja se mjeri uz pomoć kita CellTiter 96® *Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega). CellTiter 96® *Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* je kolorimetrijska metoda čiji reagens sadrži sol tetrazolija MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) i PES (fenazin etosulfat), akceptor elektrona. Tetrazolijeva sol MTS se reducira u prisutnosti NADH i NADPH, djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u živim stanicama. Produkt je ljubičasto obojeni formazan, koji je topljiv u staničnom mediju (Slika 11.) [16].



Slika 11. Redukcija MTS u formazan (izvor: <https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay- mts /?catNum=G3582>).

Test se provodi tako da se određena količina reagensa doda direktno u jažicu nakon čega slijedi inkubacija od 1-4 sata. Intenzitet razvijene boje određuje se spektrofotometrijski u čitaču mikrotitarskih pločica (BioTek EL808), pri valnoj duljini od 490 nm. Količina izmjenog formazana direktno je proporcionalna broju živih stanica u kulturi [16].

3.3.1 Priprema stanica

Citotoksičnost spojeva Py-4-BnBr i Py-4-BnF ispitivala se na stanicama RPE1 (humane epitelne stanice retine) i HaCat (humani epidermalni keranociti). Stanice, pohranjene na -80 °C odmrznute su grijanjem u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 °C. Odmrznutim stanicama dodalo se 10 ml medija temperiranog na 37 °C. Stanice su se uzgajale u hranjivom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Lonza) koji sadrži 10% FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*) i 10 mL pripremljene mješavine antibiotika penicilin/streptomycin (100x; Capricorn Scientific). Stanice se istalože centrifugiranjem na 1 500 rpm 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Pripremljene su Petrijeve posude za uzgoj staničnih kultura, u koje je dodano 10 mL temperiranog medija. Nakon centrifugiranja, vakuum pumpom uklonjen je medij iznad istaloženih stanica, a talog resuspendiran u 1 mL medija iz pripremljenih ploča. Ploče s nasadenim stanicama stavljene su u inkubator s vlažnim strujanjem zraka pri 37 °C i 5% CO₂.

Za eksperiment citotoksičnosti koriste se zdrave, 90-100% konfluentne stanice. Kako bi ih se odlijepilo s Petrijeve ploče, potrebno je ukloniti medij te dodati 2 mL tripsina koji se, potom, zajedno sa stanicama inkubira nekoliko minuta na temperaturi od 37 °C. Djelovanje

tripsina zaustavlja se dodatkom 8 mL svježeg medija. Stanice se prebroje pomoću automatskog brojača stanica (Scepter, Merck) te, ukoliko je potrebno, razrijede do koncentracije 1×10^5 stanica/ mL.

3.3.2 Postavljanje eksperimenta i obrada podataka

Eksperiment citotoksičnosti provodi se u mikrotitarskim (96-well) pločicama pri čemu se prvo u kvadripletu pipetira 100 μ L ispitivanog spoja početne koncentracije 10 mg/mL (Tablica 2). U ostale jažice mikrotitarske pločice, pipetira se po 50 μ L DMEM medija. Serijska razrjeđenja spoja Py-4-BnBr/Py-4-BnF, dobiju se sukcesivnim prebacivanjem i miješanjem 50 μ L spoja iz prethodne u narednu jažicu. Potom se, u ovako pripremljene jažice mikrotitarske pločice, doda 50 μ L stanica koncentracije 1×10^5 stanica/ mL. Posljednji red mikrotitarske pločice popuni se čistim medijem (slijepa proba) te medijem i stanicama (kontrola). Stanice se uzgajaju narednih 48 sati u inkubatoru s vlažnim strujanjem zraka pri 37 °C i 5% CO₂, nakon čega se stanicama doda 20 μ L MTS reagensa. Nakon dodatna 3 sata inkubacije u inkubatoru s vlažnim strujanjem zraka pri 37 °C i 5% CO₂, izmjeri se količina razvijene boje reagensa mjerenjem apsorbancije pri 490 nm u čitaču mikrotitarskih pločica (BioTek EL808).

Za obradu i vizualizaciju podataka koriste se softverski alati Excel (*Microsoft*) i Grafit 6.0 (*Erithacus Software*). Rezultati se prikazuju grafički, u obliku IC₅₀ vrijednosti (engl. *half maximal inhibitory concentration*). IC₅₀ vrijednost predstavlja koncentraciju inhibitorne tvari (Py-4-BnBr/Py-4-BnF) koja je potrebna da bi se u *in vitro* uvjetima inhibirao rast 50% stanica (RPE1/HaCat) (Stewart & Watson, 1983).

3.4 Ispitivanje antimikrobnog potencijala

Antimikrobni potencijal spojeva Py-4-BnBr i Py-4-BnF ispitan je klasičnom metodom mikrodilucije, na predstavnicima Gram-negativnih (*Escherichia coli*) i Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*) bakterija. Napravljene su prekonoćne kulture *E. coli* i *S. aureus* u 10 mL svježe pripremljenog Luria-Bertani hranjivog medija. Prekonoćne kulture su sutradan razrijeđene 10x i to tako da je 300 µL kulture dodano u 3 mL LB medija. Nakon sat vremena inkubacije u tresilici pri 37 °C i 220 rpm, izmjerena je gustoća kulture uz pomoć denzitometra (BioSan). Kad su stanice dostigle gustoću od 0,3 McFarlanda, stanice su pripremljene razrjeđenjem na način da se 12,5 µL kulture dodalo u 10 mL LB medija. Ovakvom pripremom dobije se suspenzija stanica koncentracije 1×10^5 stanica/mL.

Postupak postavljanja eksperimenta sličan je onome za ispitivanje citotoksičnosti. Eksperiment se provodi u mikrotitarskim (96-well) pločicama. Jažice mikrotitarske pločice popunjavaju se ispitivanim spojevima (Py-4-BnBr, Py-4-BnF) od kojih se dalje pripreme serijska razrjeđenja. Serijska razrjeđenja spojeva pripremljena su u rasponu koncentracija od 0,78 mM do 0,762 µM. U prve četiri jažice zadnjeg stupca pipetiran je čisti medij (slijepa proba), a u posljednje četiri stanice sa samim medijem (kontrola). Svakoj jažici (osim slijepoj probi) potom je dodano 50 µL stanica koncentracije 1×10^5 stanica/mL (*E. coli* ili *S. aureus*). Slijedila je inkubacija u standardnim uvjetima rasta u trajanju od 24 sata, nakon čega se očitavala apsorbancija pri 590 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica.

Optička gustoća očitava se uz pomoć denzitometra (McFarland), te se dobiveni podaci potom obrađuju u Excelu (*Microsoft*)

4 REZULTATI

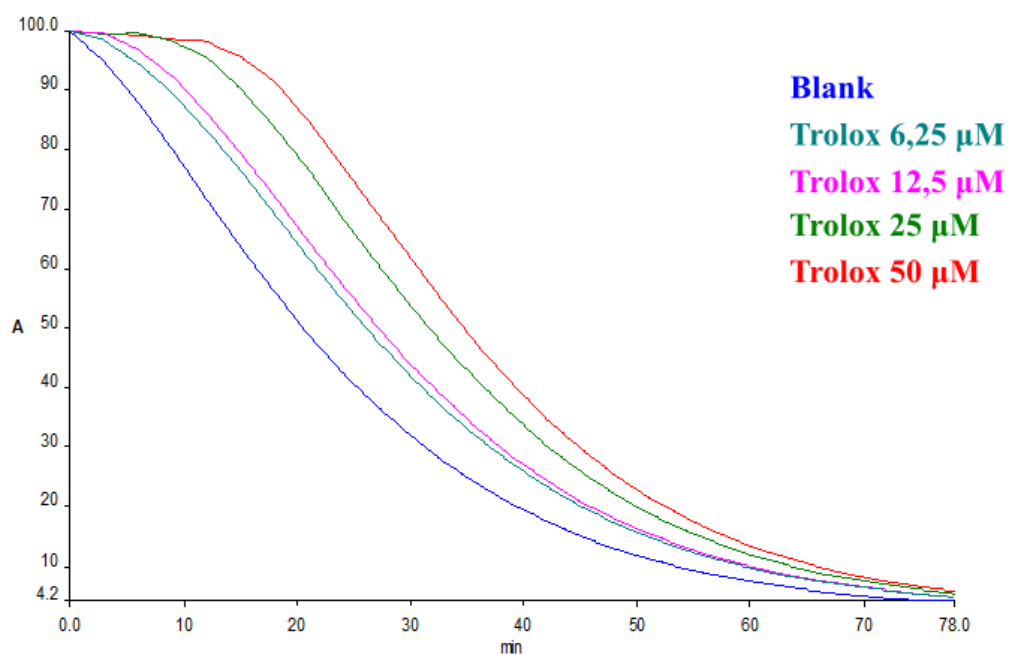
4.1 Rezultati određivanja kapaciteta za apsorpciju kisikovih radikala, ORAC

Rezultati određivanja kapaciteta za apsorpciju kisikovih radikala te izračun srednje vrijednosti fluorescencije slijepe probe, četiriju koncentracija standarda i devet koncentracija Py-4-BnBr/Py-4-BnF, u pojedinim vremenskim intervalima prikazani su na slici 12.

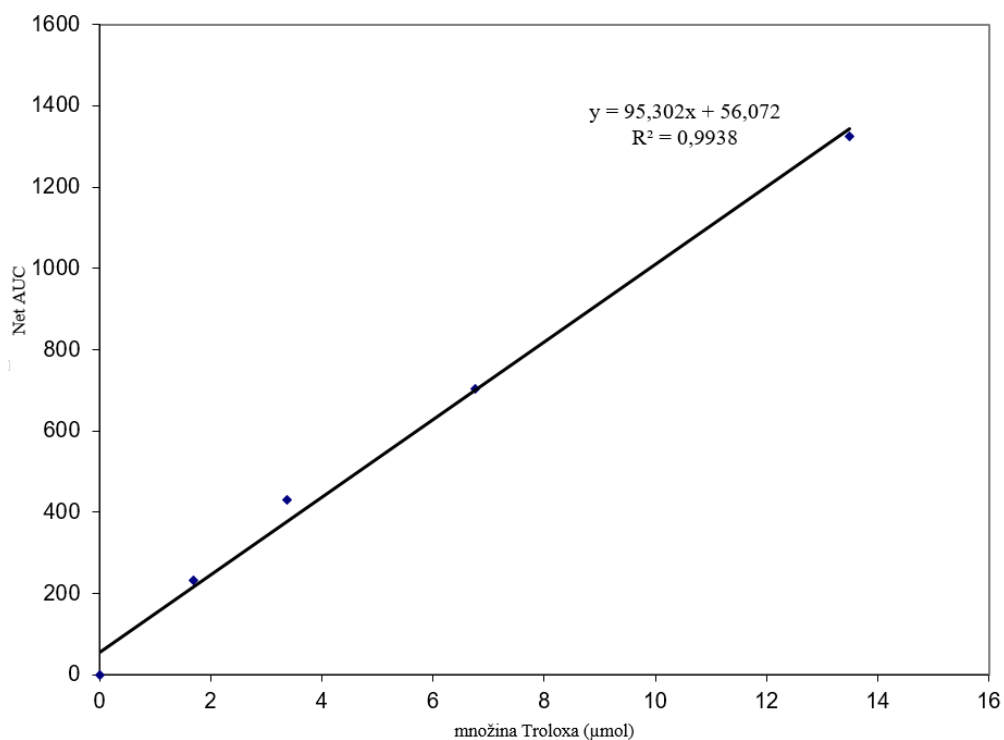
Time/min	Blank	Trolox 50 μ M	Trolox 25 μ M	Trolox 12,5 μ M	Trolox 6,25 μ M	Py4BnBr 0,78 μ M
0	111,803	117,9185	115,8145	115,1035	116,0565	115,2575
3	111,368	118,445	116,306	114,922	115,469	113,53
6	109,074	118,544	116,013	114,562	114,3785	111,1795
9	105,809	118,2815	115,9935	113,565	112,5925	107,8655
12	100,981	118,0685	114,9575	110,829	109,72	103,1605
15	94,913	117,274	112,6835	106,745	105,1865	98,239
18	89,014	115,482	109,0845	101,56	100,1985	92,821
21	82,561	112,435	104,7885	95,9885	94,6565	87,083
24	75,695	108,0695	98,418	90,0995	88,324	81,328
27	69,7855	104,5495	92,2855	84,1605	82,352	75,682
30	63,291	100,179	85,9545	77,48	75,9225	69,8755

Slika 12. Izračun srednje vrijednosti 10 ciklusa mjerenja za slijepu probu, Trolox koncentracije 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M i 6,25 μ M i Py-4-BnBr koncentracije 0,78 μ M .

Izrađeni normalizirani graf za standarde Troloxa prikazan je na slici 13., a baždarni dijagram dobiven obradom eksperimentalnih podataka za standarde Troloxa prikazan je na slici 14.



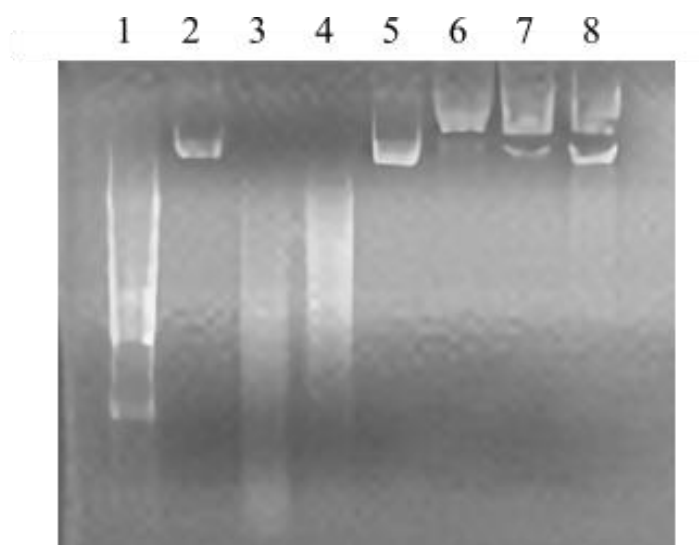
Slika 13. Normalizirani graf za standarde Troloxa u koncentraciji od 50 µM (crveno), 25 µM (zeleno), 12,5 µM (ljubičasto) i 6,25 µM (tirkizno) te blank, natrij-fosfatni pufer (plavo).



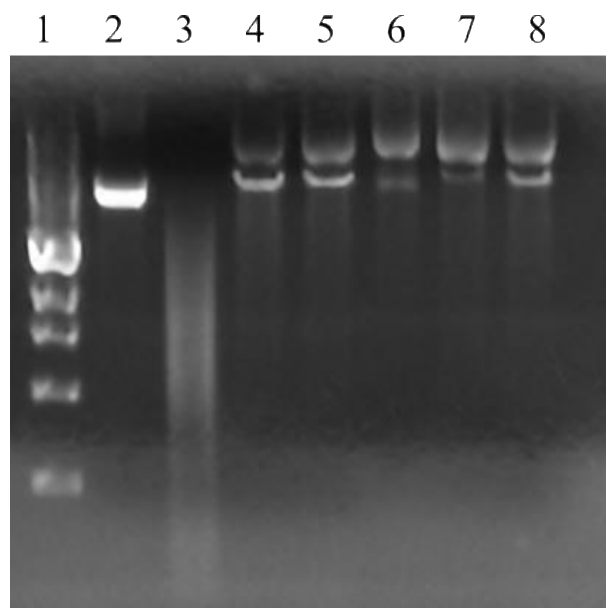
Slika 14. Baždarni dijagram dobiven obradom eksperimentalnih podataka za standarde Troloxa s istaknutom jednažbom pravca i kvadratom koeficijenta linearne korelacije, R^2 .

4.2 Rezultati ispitivanja oksidativnog oštećenja molekule DNA

Rezultati ispitivanja oksidativnog oštećenja molekule DNA prikazani su na slikama 15. i 16. Uočava se potpuno očuvana DNA u 2. jažici, dok u 3. jažici vidimo degradaciju DNA uzrokovanu Fentonovim reagensom. U 5. jažici, s većom koncentracijom enzima katalaze, vidimo bolje očuvanu DNA u odnosu na 4. jažicu. Katalaza djeluje kao antioksidans i štiti DNA od djelovanja slobodnih radikala. Kod oba spoja (Slika 15. i Slika 16.) vidljivo je da je DNA najbolje očuvana u 6. jažici, odnosno pri najvećoj koncentraciji ispitivanog spoja. Kod 7. i 8. jažice uočava se fragmentacija DNA što potvrđuje slabiju antioksidacijsku aktivnost spojeva pri nižim koncentracijama.



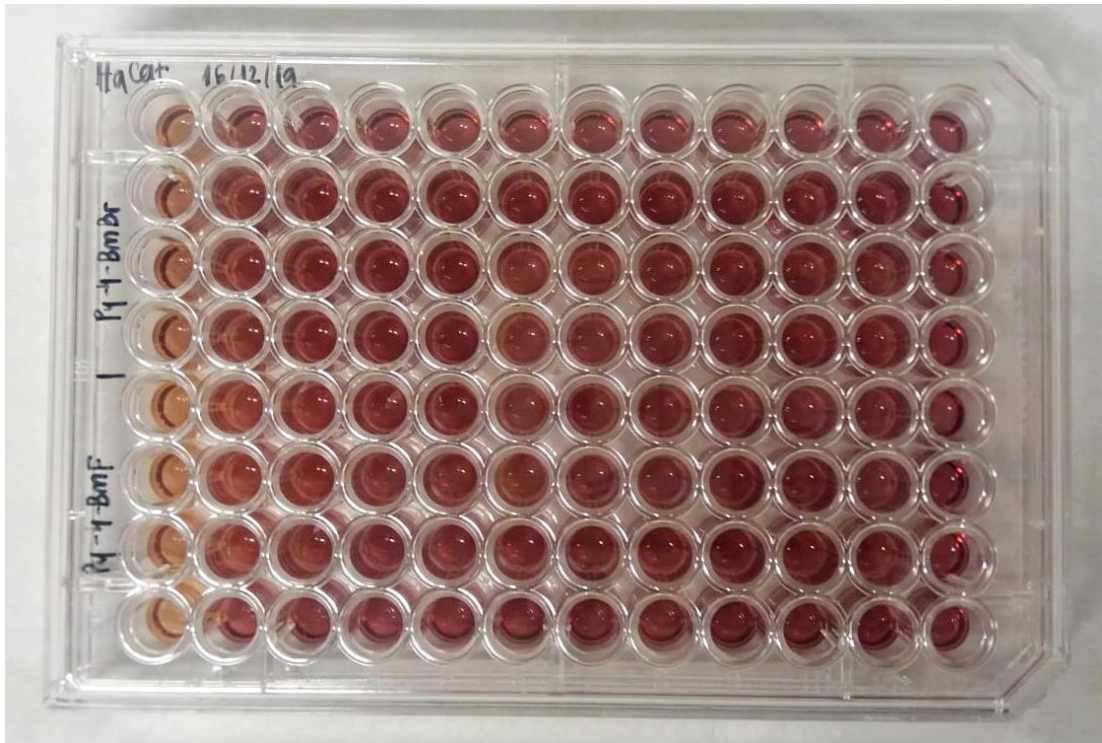
Slika 15. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze fragmenata DNA sa ispitivanim spojem Py-4-BnF; 1. jažica = DNA marker, 2. jažica = slijepa proba, 3. jažica = pozitivna proba, 4. jažica = manja koncentracija katalaze (1 μ L), 5. jažica = veća koncentracija katalaze (2,5 μ L), 6. 7. i 8. jažica = Py-4-BnF u koncentraciji od 16 mM, 8 mM i 4 mM.



Slika 16. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze fragmenata DNA sa ispitivanim spojem Py-4-BnBr; 1. jažica = DNA marker, 2. jažica = slijepa proba, 3. jažica = pozitivna proba, 4. jažica = manja koncentracija katalaze (1 μ L), 5. jažica = veća koncentracija katalaze (2,5 μ L), 6. 7. i 8. jažica = Py-4-BnBr u koncentraciji od 16 mM, 8 mM i 4 mM.

4.3 Rezultati ispitivanja citotoksičnosti

Reprezentativni prikaz citotoksičnosti spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF na kulturi stanica HaCat nalazi se na slikama 17. i 18.



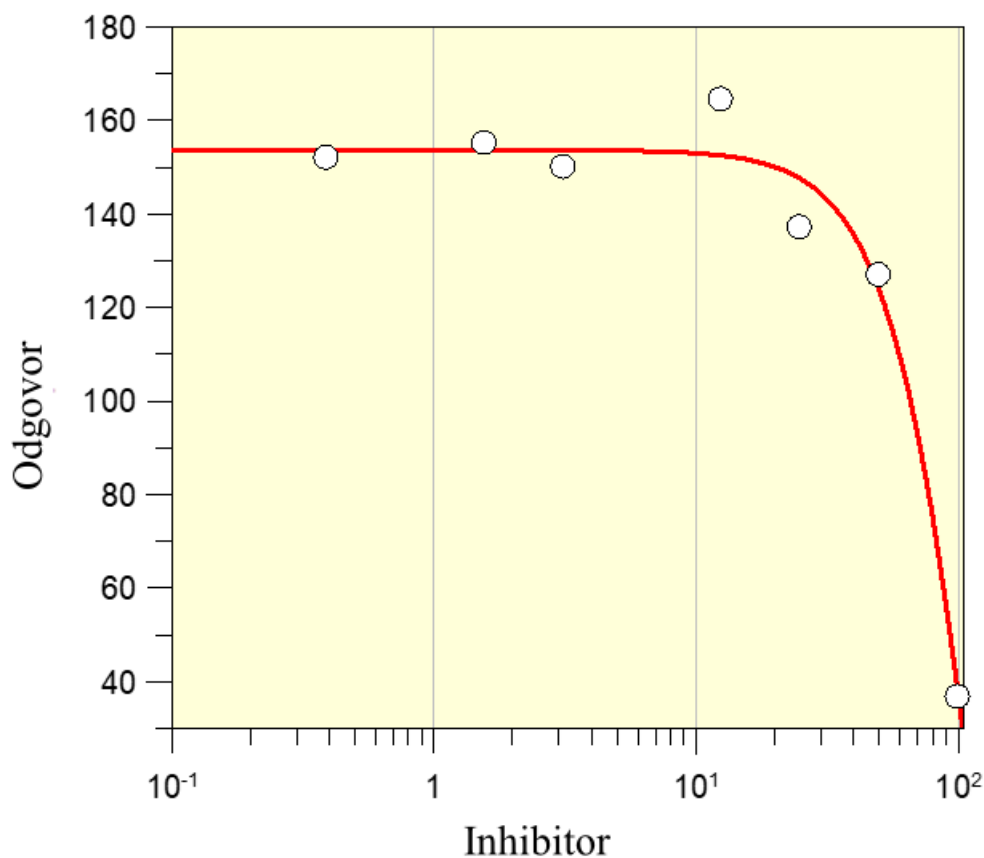
Slika 17. Mikrotitarska pločica nakon inkubacije u trajanju od tri sata, u testu citotoksičnosti spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF na kulturi stanica HaCat (humani epidermalni keranociti).



Slika 18. Mikrotitarska pločica nakon inkubacije u trajanju od tri sata, u testu citotoksičnosti spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF na kulturi stanica RPE1 (humane epitelne stanice retine).

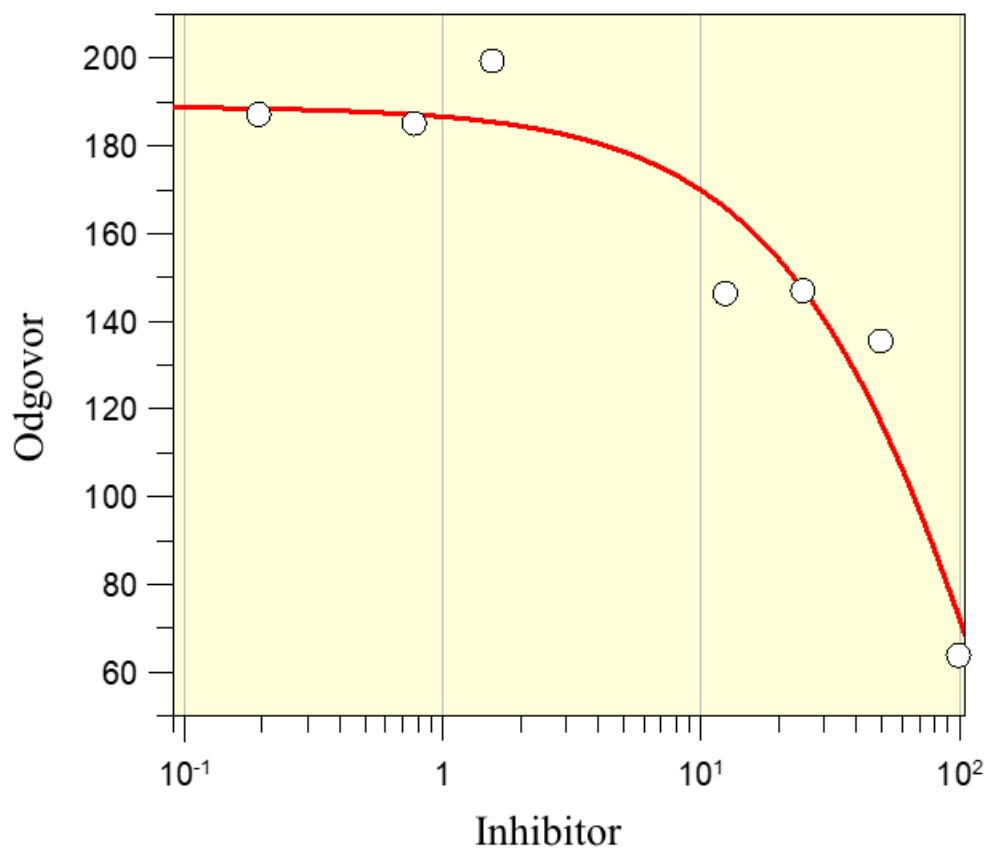
Grafički prikaz rezultata u obliku IC₅₀ vrijednosti (engl. *half maximal inhibitory concentration*) dan je u slikama 19.-22.

IC₅₀ vrijednosti pokazale su veću osjetljivost HaCat stanica na ispitivane spojeve u odnosu na RPE1 stanice. RPE1 stanice pokazale su manju osjetljivost na spoj Py-4-BnBr, u odnosu na spoj Py-4-BnF, dok je kod HaCat stanica osjetljivost manja na spoj Py-4-BnF u odnosu na Py-4-BnBr.



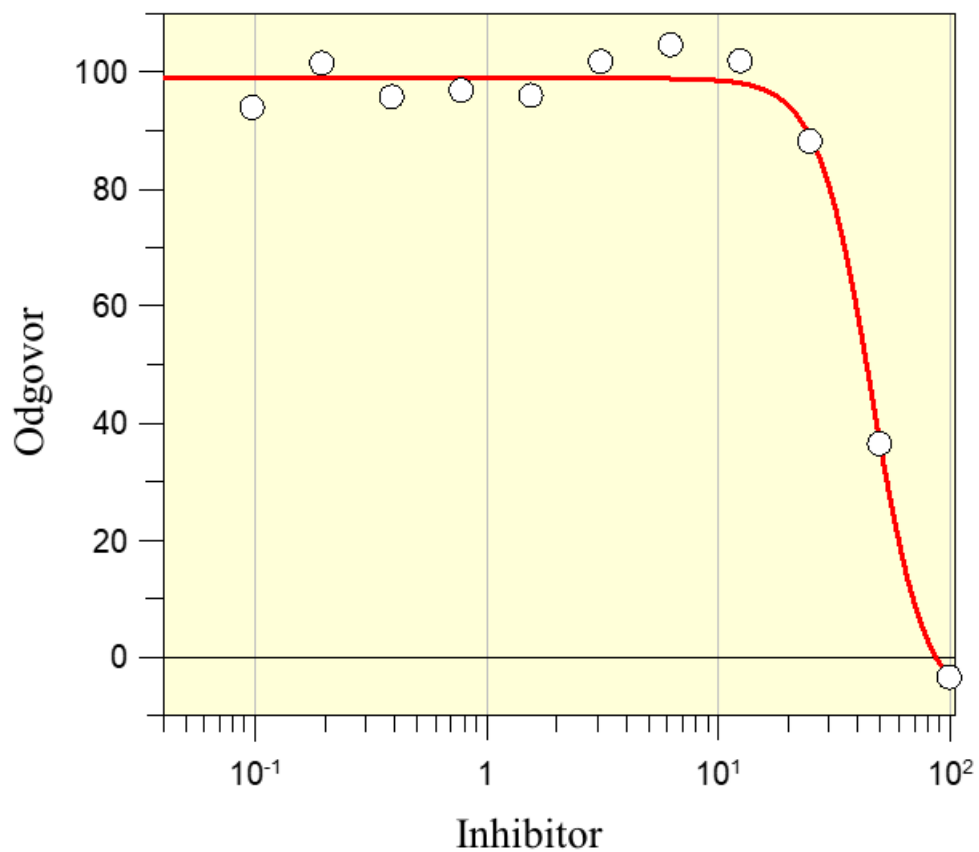
Stanična linija	IC ₅₀	Standardna devijacija
RPE1	137,936	+/- 70,438

Slika 19. IC₅₀ (engl. *half maximal inhibitory concentration*; μg/mL) vrijednosti za RPE1 stanice na spoj Py-4-BnF (uzorci na ploči od A-D).



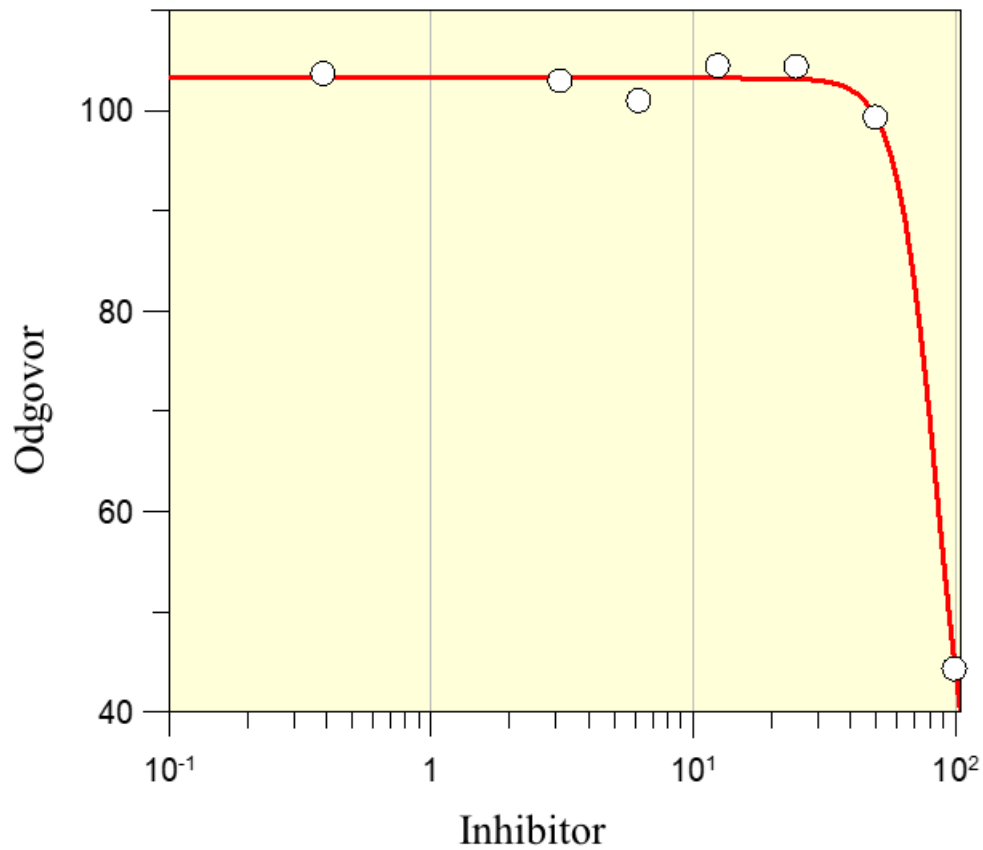
Stanična linija	IC ₅₀	Standardna devijacija
RPE1	225,189	+/- 189.981

Slika 20. IC₅₀ (engl. *half maximal inhibitory concentration*; µg/mL) vrijednosti za RPE1 stanice na spoj Py-4-BnBr (uzorci na ploči od E-H).



Stanična linija	IC ₅₀	Standardna devijacija
HaCat	45,814	+/- 2,518

Slika 21. IC₅₀ (engl. *half maximal inhibitory concentration*; μg/mL) vrijednosti za HaCat stanice na spoj Py-4-BnBr (uzorci na ploči od A-D).

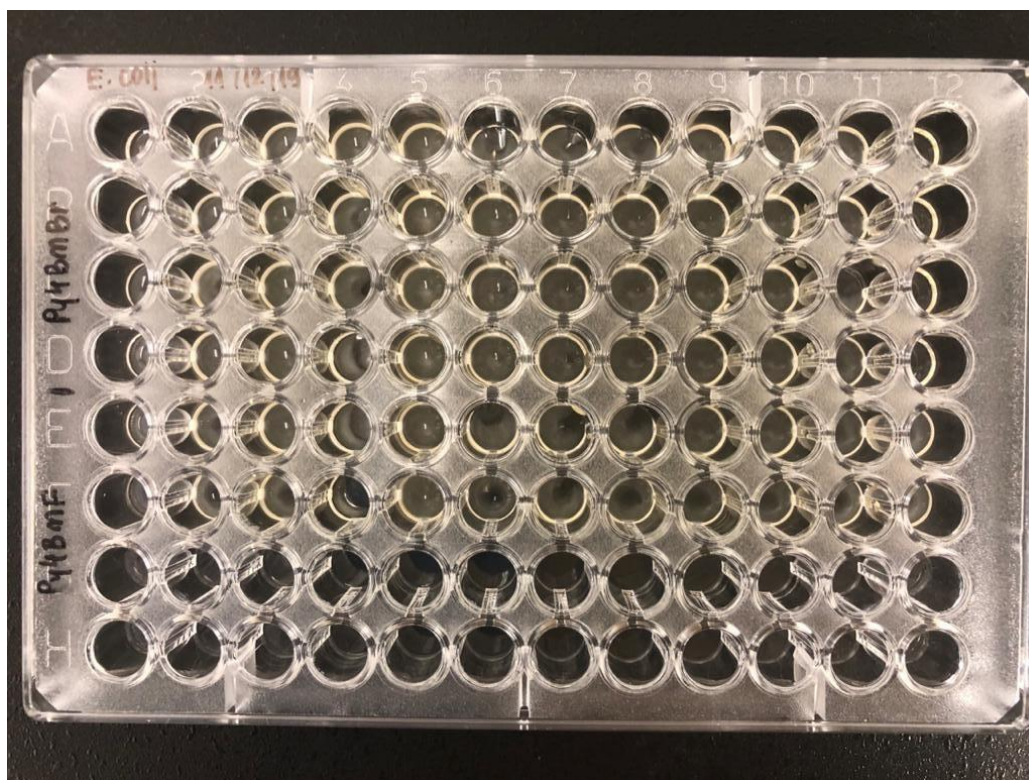


Stanična linija	IC ₅₀	Standardna devijacija
HaCat	85,592	+/- 23,181

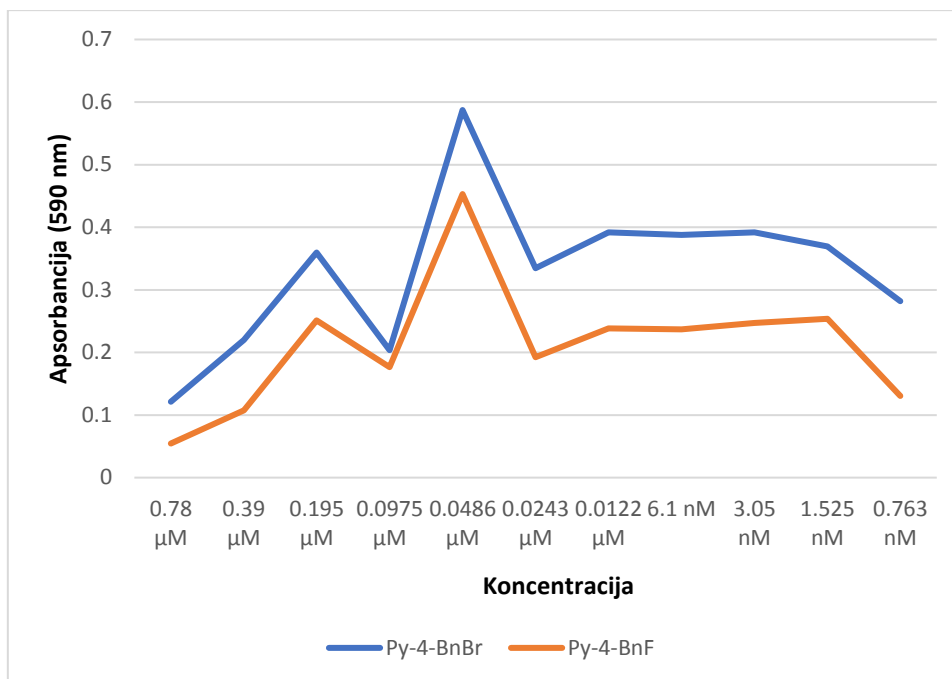
Slika 22. IC₅₀ (engl. *half maximal inhibitory concentration*; μg/mL) vrijednosti za HaCat stanice na spoj Py-4-BnF (uzorci na ploči od E-H).

4.4 Rezultati ispitivanja antimikrobnog potencijala

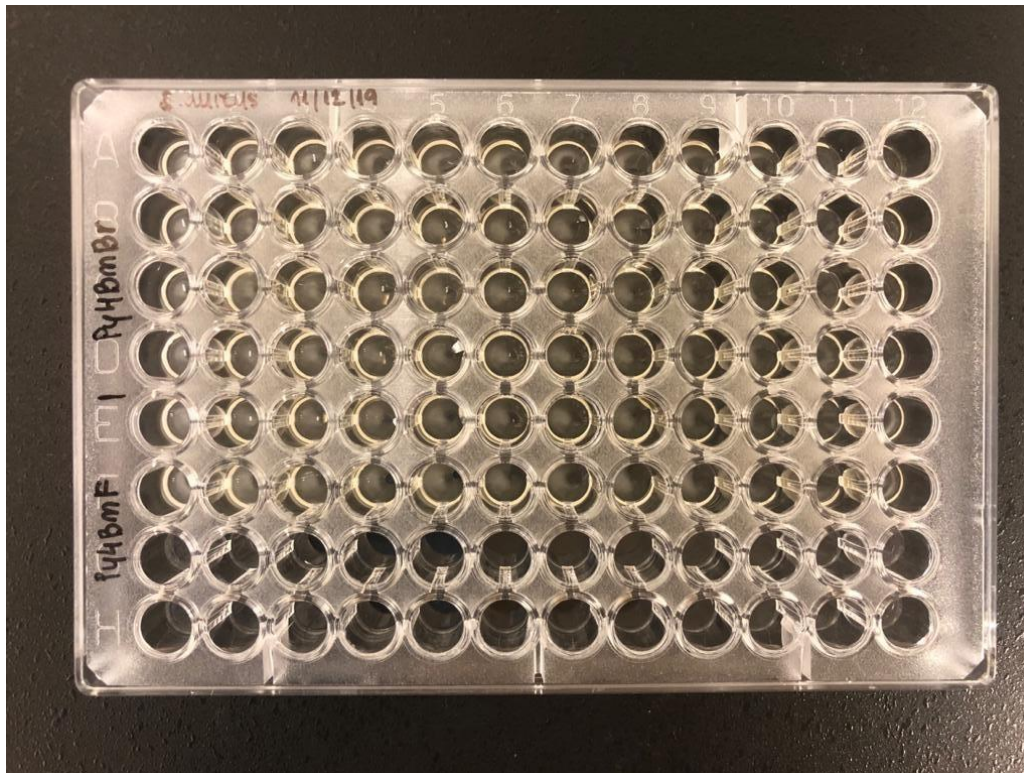
Nakon 24 sata inkubacije, na mikrotitarskim pločama s kulturom bakterije *E.coli* bilo je vidljivo da se bakterijski talog u obliku zamućenja pojavljuje u jažicama petog stupca (Slika 23.). Rezultati očitavanja vrijednosti optičke gustoće pokazali su da se minimalna inhibitorna koncentracija spojeva (MIC) Py-4-BnBr i Py-4-BnF na kulturu bakterije *E. coli* može procijeniti na $0.0975\mu\text{M}$ (Slika 24.). Kod inkubacije kulture bakterije *S. aureus* bakterijski talog i zamućenje pojavili su se već u jažicama drugog stupca (Slika 25.), te je nakon očitavanja vrijednosti optičke gustoće minimalnu inhibitorna koncentracija spojeva (MIC) Py-4-BnBr i Py-4-BnF na kulturu bakterije *S. aureus* procijenjena na $0.78\mu\text{M}$ (Slika. 26.).



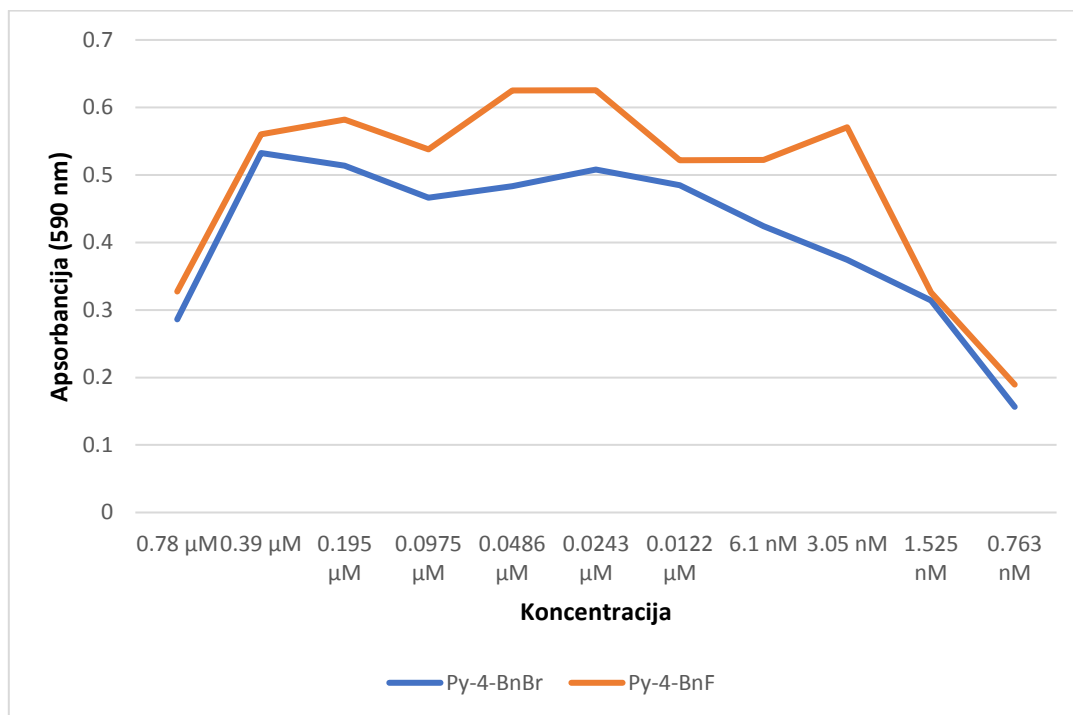
Slika 23. Mikrotitarska pločica nakon 24 sata inkubacije, u testu antimikrobne aktivnosti spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF na kulturi bakterije *Escherichia coli*.



Slika 24. Prikaz ovisnosti optičke vrijednosti o koncentraciji spoja, na kulturi bakterije *Escherichia coli*; na apcisi naznačene su koncentracije spoja *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij bromid (plavo) i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij fluorid (narančasto), dok su na ordinati naznačene vrijednosti apsorbancije pri 590 nm.



Slika 25. Mikrotitarska pločica nakon 24 sata inkubacije, u testu antimikrobne aktivnosti spojeva Py-4-BnBr/Py-4-BnF na kulturi bakterije *Staphylococcus aureus*.



Slika 26. Prikaz ovisnosti optičke vrijednosti o koncentraciji spoja na kulturi bakterije *Staphylococcus aureus*; na apcisi naznačene su koncentracije spoja *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij bromid (plavo) i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij fluorid (narančasto), dok su na ordinati naznačene vrijednosti apsorbancije pri 590 nm.

5 RASPRAVA

Kao jedan od rastućih problema današnjice, nameće se i problem bakterijske rezistencije. Interesi znanstvenika usmjereni su k pronalasku učinkovitijih metoda suočavanja s navedenom rezistencijom. Velik potencijal za rješavanje ovakvih pitanja pripisuje se sintezi novih kvaternih amonijevih spojeva, s unaprijeđenim svojstvima i načinima djelovanja u biološkim sustavima.

U sklopu ovog diplomskog rada, novosintetiziranim kvaternim amonijevim solima, *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinijskom fluoridu i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinijskom bromidu, nastalim kvaternizacijom pozitivno nabijenog dušikovog atoma u strukturi piridinijske-4-aldoksima, ispitana su biološka svojstva u svrhu novih saznanja o potencijalnom razvoju antimikrobnih, odnosno antifungalnih agensa. Ispitivanja su izvršena koristeći se nekolicinom metoda koje daju uvid u širok spektar važnih bioloških svojstava, i to, antioksidacijska aktivnost, metoda oksidativnog oštećenja DNA molekule, antimikrobna svojstva i, na kraju, citotoksičnost istih na zdrave linije humanih stanica.

Nedavno su Odžak i sur. [18] pokazali da kvaternizacija kinuklidina benzilnim prstenom sa različitim supstituentima na para položaju rezultira kvaternim amonijevim spojevima poboljšanih antimikrobnih svojstava. Vodeći se tom pretpostavkom, smatrali smo da će kvaternizacija piridinijske-4-aldoksima benzilnom skupinom i različitim supstituentima na para položaju također imati pozitivan efekt na biološku aktivnost. Vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) prethodno spomenutih kvaternih soli, pokazuje da spojevi ne posjeduju izraženo djelovanje na Gram-pozitivne niti Gram-negativne bakterije (neobjavljeni podaci), pa se može zaključiti da je alkilni lanac esencijalni preduvjet za antimikrobnu aktivnost. Kod ispitivanja antimikrobnih svojstava, ostaje dakle pretpostavka da bolje izražena antimikrobna svojstva imaju kvaterni amonijevi soli čija se kvaternizacija temelji na vezanju dugih i nepolarnih ugljikovodičnih lanaca na pozitivno nabijeni dušikov atom nekog heterocikličkog sustava. Ovo omogućava jednostavnije „umetanje“ nepolarnih „repova“ unutar dvosloja bakterijske stanične membrane što dovodi do destabilizacije membranske strukture i naposljetku lize bakterijske stanice [1, 18].

Budući da spojevi *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinijski fluorid i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinijski bromid, nastali kvaternizacijom piridinijske-4-aldoksima s različitim supstituentima na benzilnom prstenu, nisu pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost u usporedbi s minimalnim inhibitornim vrijednostima (MIC vrijednostima)

komercijalnih kvaternih amonijevih spojeva, može se zaključiti da sama kvaternizacija piridinijeva-4-aldoksima nije dovoljan preduvjet za antibakterijsko djelovanje. Pretpostavljamo da bi dodatak alkilnih supstituenata, umjesto aromatskih, više pridonio antibakterijskom djelovanju kvaternizirane okosnice piridina. Međutim, minimalna inhibitorna koncentracija za spojeve Py-4-BnBr i Py-4-BnF, prema plijesni *Aspergillus niger*, iznosi 62,5 µg/mL, što znači da spoj ima dobra antifungalna svojstva (neobjavljeni podaci). Budući da je jedan od predloženih mehanizama antifungalnog djelovanja i prooksidativno djelovanje, u okviru bioloških testova ispitali smo antioksidacijski učinak novosintetiziranih spojeva, ali i citotoksičnost prema zdravim humanim stanicama u kulturi. Svrha ovih bioloških testiranja je razotkrivanje potencijalne primjene spojeva kao antifungalnih agensa s mogućom primjenom u biomedicini i zdravstvu [19].

Antioksidacijska aktivnost ispitana ORAC metodom, pokazuje veliku antioksidacijsku moć obaju spojeva, od kojih nešto izraženija antioksidacijska svojstva posjeduje kvaterna sol s fluoriranim supstituentom, u usporedbi s komercijalno dostupnim sintetskim antioksidansom Troloxom. Naime, i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij fluorid i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij bromid, razrijeđeni na nM koncentracije, bilježe pad intenziteta fluorescencije, što upućuje na njihovu sposobnost vezanja slobodnih radikala. Ovakva svojstva spojeva dodatno su potvrđena metodom oksidativnog oštećenja molekule DNA (engl. *DNA nicking assay*). Detekcija agaroznog gela nakon provedene elektroforeze ukazala je da spojevi, vezanjem slobodnih radikala koji nastaju raspadom Fentonovog reagensa, „štite“ molekulu DNA od dvolančanih lomova. Dosad objavljena istraživanja na kvaternim amonijevim spojevima kinuklidin-3-ola, pokazala su kako se bolja antioksidacijska svojstva pripisuju spojevima sa alkilnim supstituentima. Dobra antioksidacijska svojstva spojeva Py-4-BnBr i Py-4-BnF ukazuju na to kako alkilni lanac nije esencijalni preduvjet za antioksidacijsku aktivnost kao što je to slučaj sa antimikrobnom aktivnosti [18, 19].

Budući da je svrha sinteze i ispitivanja bioloških svojstava svih novosintetiziranih spojeva potencijalno otkriće novih lijekova, svakako je potrebno ispitati učinak istih na staničnim linijama zdravih humanih stanica. U dosad objavljenim istraživanjima, izmjerena je IC₅₀ vrijednost > 53,4 µg/mL za prekursor u sintezi kvaternih amonijevih soli kinuklidin-3-ola, što ukazuje na izostanak toksične aktivnosti prema ispitivanim staničnim linijama HEK293, HeLa i RPE1. IC₅₀ vrijednosti za kvaterne amonijeve soli kinuklidin-3-ola s alkilnim lancima dužine 12 ili 14 C atoma iznose 1 µg/mL za HEK293, 3,98 µg/mL za HeLa i >5 µg/mL za RPE1. Ispitivanje citotoksičnosti prethodno spomenutih kvaternih amonijevih soli ispitano je

na dvjema staničnim linijama – HaCat i RPE1, od kojih su HaCat pokazale nešto veću osjetljivost, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima. IC_{50} vrijednosti na RPE1 staničnoj liniji iznose 137,9 $\mu\text{g/mL}$ za spoj Py-4-BnF, odnosno 225,2 $\mu\text{g/mL}$ za spoj Py-4-BnBr, a na HaCat staničnoj liniji iznose 45,8 $\mu\text{g/mL}$ za spoj Py-4-BnBr, odnosno 85,6 $\mu\text{g/mL}$ za spoj Py-4-BnF. Iz navedenog zaključujemo kako spojevi ne pokazuju osobitu toksičnu aktivnost [2].

6 ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1. Ispitivanjem antioksidacijske aktivnosti putem ORAC testa i metodom oksidativnog oštećenja DNA molekule, dokazana su dobra antioksidacijska svojstva za oba kandidata, *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij bromid i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij fluorid, od kojih nešto izraženija antioksidacijska svojstva posjeduje kvaterna sol s fluoriranim supstituentom.
2. Ispitivanjem citotoksičnosti na RPE1 i HaCat staničnim linijama, potvrdio se izostanak toksične aktivnosti ispitivanih spojeva.
3. Antimikrobno djelovanje spojeva *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij bromid i *N*-benzil-4-hidroksiiminometilpiridinij fluorid, izraženije je na kulturi bakterije *E. coli* u odnosu na kulturu bakterije *S. aureus*. No, antimikrobna aktivnost izražena kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC vrijednost), zanemariva je u usporedbi s vrijednostima komercijalnih kvaternih amonijevih spojeva.

7 LITERATURA

- [1] M. C. Jennings, K. P. C. Minbiole i W. M. Wuest, »Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance,« *ACS Infectious Diseases*, 1(7), str. 288-303, 2015.
- [2] L. Bazina, A. Maravić, L. Krce, B. Soldo, R. Odžak, V. B. Popović, I. Aviani, I. Primožič i M. Šprung, »Discovery of novel quaternary ammonium compounds based on quinuclidine-3-ol as new potential antimicrobial candidate,« *European Journal of Medicinal Chemistry*, 163, str. 626-635, 2019.
- [3] A. A. Altaf, A. Shahzad, Z. Gul, N. Rasool, A. Badshah, B. Lal i E. Khan, »A review on the medicinal importance of pyridine derivatives,« *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry*, 1(1), str. 1-11, 2015.
- [4] R. Vardanyan i V. Hruby, »Proton pump inhibitors,« u *Synthesis of Best-Seller Drugs*, Academic Press, str. 765-781, 2016.
- [5] N. Pollak, C. Dölle i M. Ziegler, »The power to reduce: pyridine nucleotides - small molecules with a multitude of functions,« *Biochemical Journal*, 402, str. 205-218, 2007.
- [6] R. T. Morrison i R. N. Boyd, *Organska kemija*, Zagreb: Sveučilišna naklada Liber, 1979.
- [7] U. Tezel i S. G. Pavlostathis, »Role of quaternary ammonium compounds on antimicrobial resistance in the environment,« u *Antimicrobial Resistance in the Environment*, Patricia L. Keen i Mark H. M. Montforts, Wiley-Blackwell, str. 349-387, 2011.
- [8] C. P. Gerba, »Quaternary ammonium biocides: efficacy in application,« *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), str. 464-469, 2015.
- [9] Y. Nakama, »Surfactants,« u *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*, Kazutami Sakamoto, Robert Lochhead, Howard Maibach i Yuji Yamashita, Elsevier, str. 231-244, 2017.

- [10] G. Domagk, »A new class of disinfectant,« *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, str. 829–832, 1935.
- [11] Y. Hamada, »Role of pyridines in medicinal chemistry and design of BACE1 inhibitors possessing a pyridine scaffold,« u *Pyridine*, IntechOpen, 2018.
- [12] M. Jokanovic i M. Prostran, »Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators. structure-activity relationship and efficacy in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds,« *Current Medicinal Chemistry*, 16, 2009.
- [13] S. C. Litescu, S. A.V.Eremia, A. Tache, I. Vasilescu i G.-L. Radu, »The use of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays in the assessment of beverages' Antioxidant Properties,« u *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, Victor Preedy, Elsevier, str. 245-251, 2014.
- [14] R. L. Prior, X. Wu i K. Schaich, »Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements,« *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), str. 4290-4302, 2005.
- [15] L.-J. Leba, C. Brunschwig, M. Saout, K. Martial, E. Vulcain, D. Bereau i J.-C. Robinson, »Optimization of a DNA nicking assay to evaluate *Oenocarpus bataua* and *Camellia sinensis* antioxidant capacity,« *International Journal of Molecular Science*, 15(10), str. 18023-18039, 2014.
- [16] »Promega Corporation,« (Mrežno), https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582, (pristup 4.12.2019.).
- [17] M. J. Stewart i I. D. Watson, »Standard units for expressing drug concentrations in biological fluids,« *British Journal of Clinical Pharmacology*, 16, str. 3-7, 1983.
- [18] R. Odžak, M. Šprung, B. Soldo, M. Skočibušić, M. Gudelj, A. Muić i I. Primožič, »Quaternary salts derived from 3-substituted quinuclidine as potential antioxidative and antimicrobial agents,« *Open Chemistry Journal*, 15(1), str. 320-331, 2017.

[19] P. Bošković, M. Šprung, L. Bazina, B. Soldo i R. Odžak, »The aggregation behavior and antioxidative activity of amphiphilic surfactants based on quinuclidin-3-ol,« *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(1), 2019.

Popis internetskih stranica

https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582, 4.12.2019.