

Biološka aktivnost derivata lignana

Vidović, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:658813>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Kristina Vidović

BIOLOŠKA AKTIVNOST DERIVATA LIGNANA

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju u Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta “Ruđer Bošković” i u Laboratoriju za Fiziologiju bilja u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Marijane Radić Stojković, više znanstvene suradnice i izv. prof. dr. sc. Sandre Radić Brkanac. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

ZAHVALA

Veći dio eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada izrađen je u sklopu projekta HRZZ “Molekularno prepoznavanje DNA:RNA hibridnih i višelančanih struktura u bioanalitičkim i in vitro sustavima”, voditeljice dr. sc. Marijane Radić Stojković.

Želim ponajprije zahvaliti mentoricama izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac i dr. sc. Marijani Radić Stojković na pomoći, odvojenom vremenu i strpljenju u izradi eksperimentalnog dijela ovog rada i na važnim savjetima tijekom pisanja rada.

Hvala članovima Laboratorija na prijateljskom odnosu i dobroj radnoj atmosferi.

Hvala mojoj obitelji što su sve ove godine bili uz mene. Hvala Dini na bezuvjetnoj podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Biološka aktivnost derivata lignana

Kristina Vidović

Rooseveltov trg 6, 1000 Zagreb, Hrvatska

U okviru ovog diplomskog rada provedena je spektroskopska karakterizacija otopina spojeva CT-A1, CT-A2, CT-A4 i CT-A14, ispitana je njihova interakcija s dvolančanim polinukleotidima i potencijalno antioksidacijsko djelovanje. UV/Vis spektri spojeva snimljeni su u području od 230 do 600 nm i određene su vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata (ϵ) pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije (λ_{\max}). Utvrđeno je da su izmjerene apsorpcije puferskih otopina istaživanih spojeva proporcionalne njihovim koncentracijama što je u skladu s Lambert – Beer-ovim zakonom. Ispitana je ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji spojeva u području od 450 do 650 nm te su u tom koncentracijskom rasponu provedene fluorimetrijske titracije s dvolančanim polinukleotidima. U fluorimetrijskim titracijama s dvolančanim polinukleotidima došlo je do povećanja fluorescencije spojeva CT-A1 i CT-A2 za razliku od smanjenja fluorescencije spoja CT-A14 dok su kod spoja CT-A4 promjene intenziteta emisije u većini titracija bile neznatne. Općenito, spojevi su pokazali veći afinitet prema dvolančanim polinukleotidima DNA nego RNA. Rezultati CD titracija DNA polinukleotida s gotovo svim ispitivanim spojevima pokazali su slabe negativne CD (ICD) signale na valnoj duljini oko 300 nm. Ovi rezultati upućuju na interkalativan način vezanja. Metodoma ABTS i DPPH utvrđena je značajna antioksidacijska aktivnost svih ispitivanih spojeva osim spoja CT-A14.

(60 stranica, 26 slika, 7 tablica, 39 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: lignan, vezanje na DNA/RNA, fluorescencija, cirkularni dikroizam, antioksidacijsko djelovanje

Voditelji: Dr. sc. Marijana Radić Stojković

Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, prof.

Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, prof.

Zamjena: Dr. sc. Biserka Prugovečki, prof.

Rad prihvaćen: 26.11.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of science

Division of biology

Graduation thesis

Biological activity of lignans derivatives

Kristina Vidović

Rooseveltova trg 6, 1000 Zagreb, Hrvatska

In this thesis, spectroscopic characterization of solutions of CT-A1, CT-A2, CT-A4 and CT-A14 compounds was performed, their interaction with double-stranded polynucleotides and potential antioxidant activity were examined. The UV/Vis spectra of the compounds were recorded in the range from 230 to 600 nm and (λ_{\max}) the values of molar absorption coefficients (ϵ) were determined at the wavelength of maximum absorption. The absorbance of buffered solutions of the newly synthesized compounds was found to be proportional to their concentrations, which is in accordance with the Lambert – Beer law. The dependence of fluorescence intensity on the concentration of the compounds was tested in the range of 450 to 650 nm and in this concentration range fluorimetric titrations with double-stranded polynucleotides were performed. The results of fluorimetric titrations with double-stranded polynucleotides showed an increase of fluorescence of CT-A1 and CT-A2 compounds as opposed to a decrease of fluorescence of CT-A14 compound, whereas fluorescence changes of CT-A4 compound in most titrations were negligible. In general, the examined compounds showed higher affinity toward ds-DNA polynucleotides than ds-RNA. Results of CD titrations of DNA polynucleotides with almost all tested compounds showed weak negative CD (ICD) signals located around 300 nm. These results suggest an intercalative way of binding. The significant antioxidant activity measured by ABTS and DPPH methods was found for all tested compounds except for CT-A14.

(60 pages, 26 figures, 7 tables, 39 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: lignan, DNA / RNA binding, fluorescence, circular dichroism, antioxidant activity

Supervisor: Dr. Marijana Radić Stojković, senior scientific advisor
Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.
Dr. Ines Radanović, Prof.
Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof.

Replacement: Dr. Biserka Prugovečki, Prof.

Thesis accepted: 26.11.2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Struktura i svojstva molekula DNA i RNA.....	1
1.2. Nekovalentne interakcije malih organskih molekula s DNA i RNA.....	4
1.3. Pregled spektroskopskih metoda.....	6
1.3.1. Mekšanje dvolančanih polinukleotida.....	6
1.3.2. UV/Vis apsorpcijska spektroskopija.....	7
1.3.3. Fluorescencija.....	9
1.3.4. Izračunavanje konstanti stabilnosti iz podataka dobivenih fluorimetrijskom titracijom.....	12
1.3.4. Spektroskopija cirkularnog dikroizma.....	14
1.4. Lignani: Benzoksantenski derivati.....	16
1.5. Pregled metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	17
1.5.1. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom.....	18
1.5.2. Ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	19
1.6. Cilj istraživanja.....	21
2. MATERIJALI I METODE	22
2.1. Materijali.....	22
2.2. Spektroskopska karakterizacija otopina ispitivanih spojeva.....	23
2.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima.....	24
2.3.1. Temperaturno mekšanje.....	24
2.3.2. Fluorimetrijske titracije.....	25
2.3.3. CD titracije.....	25
2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	26
2.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom.....	26

2.4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	26
2.4.3. Statistička obrada podataka.....	27
3. REZULTATI	28
3.1. Spektroskopska svojstva benzoksantenskih derivata ligana CT – A1, CT – A2, CT – A4, CT – A14.....	28
3.1.1. UV/Vis spektri.....	28
3.1.2. Fluorescencijski spektri.....	32
3.2. Interakcija spojeva CT – A1, CT – A2, CT – A4, CT – A14 s dvolančanim polinukleotidima.....	34
3.2.1. Fluorimetrijske titracije.....	34
3.2.2. Promjene temperaturnog mekšanja.....	39
3.2.2. CD titracije.....	42
3.3. Antioksidacijska aktivnost spojeva CT – A1, CT – A2, CT – A4, CT – A14.....	45
3.3.1. Antioksidacijsko djelovanje – metoda ABTS	45
3.3.2. Antioksidacijsko djelovanje – metoda DPPH.....	46
3.3.3. Pearsonov koeficijent korelacije za antioksidacijske metode.....	49
4. RASPRAVA.....	54
5. ZAKLJUČAK.....	55
6. LITERATURA.....	57
7. ŽIVOTOPIS.....	60

POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

- DNA – deoksiribonukleinska kiselina
- RNA – ribonukleinska kiselina
- pApU - dvolančani homopolinukleotid adeninske i uracilne ribonukleinske kiseline
- p(dAdT)₂ - dvolančani alternirajući polinukleotid adeninske i timinske deoksiribonukleinske kiseline
- p(dGdC)₂ - dvolančani alternirajući polinukleotid gvaninske i citozinske deoksiribonukleinske kiseline
- ct-DNA – calvus thymus DNA
- Na-kakodilat – $C_2H_6AsNaO_2 \cdot 3H_2O$
- HCl – klorovodična kiselina
- Trolox - 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina
- c_k – konačna molarna koncentracija otopine
- dl-DNA – dvolančana molekula DNA
- dl-RNA – dvolančana molekula RNA
- CD – cirkularni dikroizam
- ICD – inducirani cirkularni dikroizam

1. UVOD

Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama sve su češća tema istraživanja budući da takve molekule pokazuju pogodnu biološku aktivnost kao što je protutumorska, protuviralna te antibakterijska aktivnost. Nekovalentni načini vezanja malih molekula obuhvaćaju elektrostatske interakcije, vezanje u mali utor i interkaliranje.

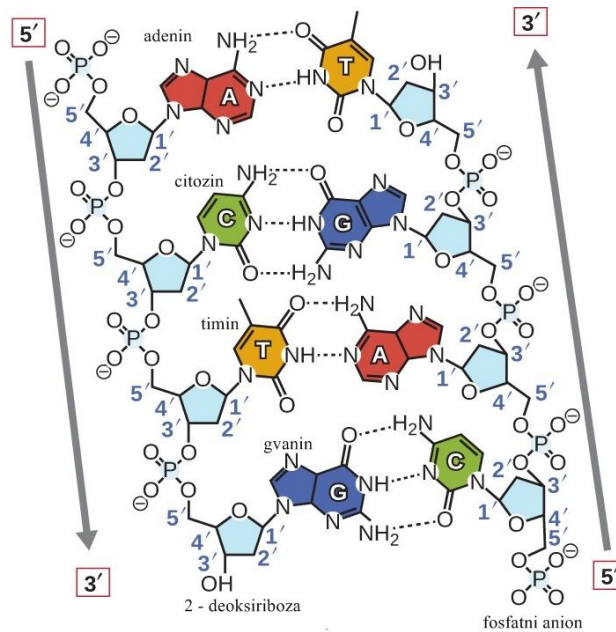
Lignan je prirodan spoj, sekundarni metabolit biljaka koji se može naći u sjemenkama lana i sezama, a predmet je laboratorijskih istraživanja posljednjih nekoliko godina iako je jedna vrsta lignana, podofilotoksin, prvi put izoliran davne 1880. godine. Benzoksantenski derivati podofilotoksina rijetko se mogu naći u prirodi stoga je njihova biološka aktivnost i moguća farmakološka primjena još uvijek prilično neistražena. Dosadašnja istraživanja pokazala su da se ovi spojevi nekovalentno vežu na nukleinsku kiselinu i zaustavljaju njenu replikaciju i daljnju staničnu diobu.

U okviru ovog diplomskog rada ispitana su i spektroskopski okarakterizirana četiri laboratorijski sintetizirana benzoksantenska derivata podofilotoksina s oznakama CT - A1, CT - A2, CT - A4 i CT - A14. UV/Vis i fluorescencijskom spektroskopijom određene su konstante stabilnosti kompleksa ispitivanih spojeva s raznovrsnim polinukleotidima. CD spektroskopijom provjeren je način vezanja ovih spojeva na polinukleotide. Antioksidacijskim metodama ABTS+ i DPPH ispitana je njihova antioksidacijska aktivnost.

1.1. Strukture i svojstva molekula DNA i RNA

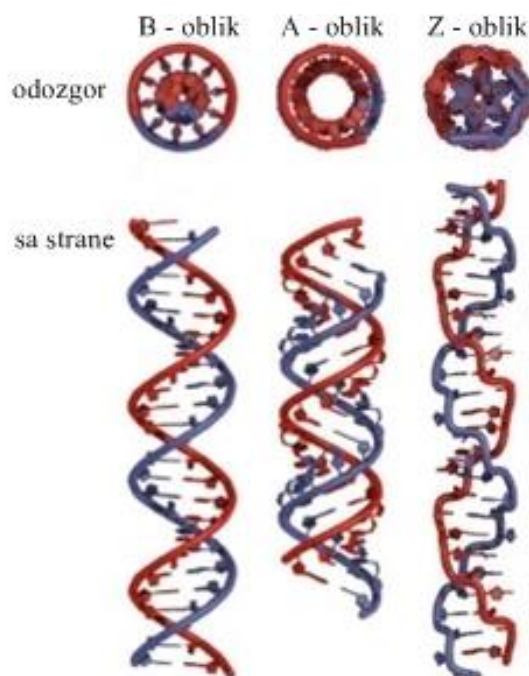
Molekula deoksiribonukleinske kiseline – DNA u fiziološkim uvjetima tvori strukturu dvostruke, desne uzvojnice sastavljene od dva antiparalelna, linearna lanca polinukleotida. Osnovne jedinice DNA su nukleozidi koji se sastoje od nukleobaze i šećerne jedinice. Šećerna jedinica kod DNA je 2' – deoksiriboza, a kod RNA riboza. 3'- hidroksilna skupina jedne šećerne jedinice se povezuje fosfodieterskom vezom sa 5' – hidroksilnom skupinom druge šećerne jedinice. Na C1' atom šećernih jedinica vežu se dušične, purinske ili pirimidinske, baze. U obje nukleinske kiseline nalaze se iste purinske baze: gvanin (G) i adenin (A). Pirimidinske baze u molekuli DNA su citozin (C) i timin (T), a u RNA umjesto timina nalazi se uracil (U). Uracil na C5' atomu sadrži atom vodika za razliku od timina koji na tom položaju ima metilnu skupinu. Tako se najčešće tvore parovi koje još nazivamo i Watson – Crickovim parovima baza: G – C i A – T (Slika 1.), odnosno A – U u molekuli RNA. Osim navedenih dušičnih baza u nekim slučajevima pojavljuju se i metilirani citozin i gvanin. Komplementarne dušične baze se povezuju vodikovim vezama dok se istovremeno njihove

ravnine nalaze jedna iznad druge što omogućuje manji doticaj s vodom pa je unutrašnjost molekule DNA hidrofobna. Vanjski dijelovi molekule DNA, 2' – deoksiriboze i fosfatni anioni su hidrofilni i gotovo okomiti na dušične baze tvoreći na taj način okosnicu DNA.



Slika 1. Watson – Crickovi parovi baza u molekuli DNA

U okosnici DNA moguće su brojne rotacije veza, zatim različita konformacija dušične baze u odnosu na šećernu skupinu te različite konformacije same deoksiriboze. Rendgenska strukturna analiza pokazala je da se molekula DNA, ovisno o otapalu i sastavu baza, oblikuje u različite konformacije prikazane na slici 2. Zavoji okosnice stvaraju velike i male utore koji se međusobno razlikuju po veličini, ali i među formama DNA.



Slika 2. Strukturni oblici DNA

B oblik DNA najstabilniji je, ujedno i najučestaliji oblik koji se nalazi u većini stanica živih bića. Radi se o desno zavijenoj Watson – Crickovoj uzvojnici koja sadrži širok veliki utor i uzak mali utor dok su oba utora duboka. Također desno zavijenu uzvojniciu sadrži i A oblik DNA, ali s određenim strukturnim promjenama zbog različitog broja parova baza po zaokretu (360°) kao i drugačijeg kuta između dušičnih baza i okosnice. Te promjene očituju se na način da veliki utor postaje dublji, a manji utor plići. Za razliku od B i A oblika DNA, Z oblik sadrži lijevo zavijenu uzvojniciu čije se fosforilne skupine nalaze u cik – cak obliku, prema čemu je i dobila naziv (*zig - zag*). Zbog većeg broja parova baza po zaokretu, izduženog je oblika pri čemu je veliki utor slabo izražen, a mali utor uzak i dubok. Radi lakšeg pregleda, u tablici 1 su navedena strukturna svojstva ovih triju oblika DNA.

Tablica 1. Strukturna svojstva triju oblika DNA

	A – oblik	B – oblik	Z – oblik
Zavijenost	Desna	desna	lijeva
Broj parova baza u jednom navoju	11	10,4	12
Promjer / Å	25,5	23,7	18,4
Pomak po osi uzvojnice po zavoju / Å	25,3	35,4	45,6
Glikozidna veza ¹	<i>anti-</i>	<i>anti-</i>	naizmjenično <i>sin-</i> i <i>anti-</i>
Nagib baza okomito na os uzvojnice / °	19	1	9
Veliki utor	uzak i dubok	širok i dubok	plosnat
Mali utor	širok i plitak	uzak i dubok	uzak i dubok

Sin- i *anti-* se odnose na orijentaciju N-glikozidne veze između baze i deoksiriboze. U *anti-* položaju baza je udaljena od deoksiriboze dok je u *sin-* položaju baza iznad deoksiriboze. Pirimidini zbog svoje strukture mogu biti samo u *anti-* orijentaciji, dok purini mogu biti i u *sin-* i *anti-* orijentaciji.

1.2. Nekovalentne interakcije malih organskih molekula s DNA i RNA

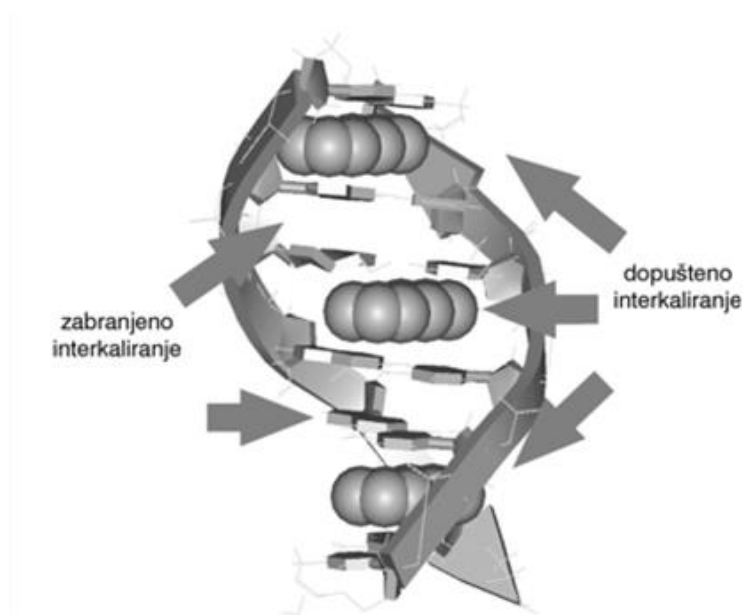
B-DNA podložna je raznim neželjenim promjenama koje mogu imati štetne posljedice kao što je stvaranje tumorskih stanica. Upravo zbog takvih ishoda važno je istražiti način na koji djeluju prirodni i sintetski lijekovi koji se vežu na DNA. Nakon toga se određuju uzroci promjena DNA pod utjecajem okoliša i utječe se na osnovne funkcije DNA *in vivo* i *in vitro* zbog genske terapije te primjene u dijagnostici. Istraživanja se temelje na interakcijama malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama između kojih mogu nastati kovalentne veze što se naziva nepovratnim interakcijama ili mogu nastati nekovalentni kompleksi pri čemu nastaju ravnotežne interakcije. Ravnotežne ili nekovalentne interakcije se temelje na stvaranju termodinamički ili kinetički najstabilnijeg kompleksa male organske molekule s

polinukleotidom. On može biti ostvaren elektrostatskom interakcijom polikationskog spoja s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida. Iako takvi spojevi pokazuju vrlo malu ili gotovo nikakvu selektivnost vezanja obzirom na slijed nukleotida u polinukleotidnom lancu, imaju određenu ulogu u biološkim procesima stanice.

Nekovalentna interakcija može biti ostvarena vezanjem spojeva u manji utor dvolančanih uzvojnica DNA ili RNA koji se prema tome i nazivaju utor – vežućim spojevima (eng. *minor groove binding*). Osnova stvaranja takvih kompleksa je konveksan oblik malih organskih molekula koji odgovaraju konkavnom obliku utora dvostrukih uzvojnica nukleinskih kiselina i dodatne elektrostatske interakcije pozitivnih naboja utor – vežućeg spoja s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida. Iako je zbog konkavnih utora nukleinskih kiselina omogućeno ostvarivanje tog tipa nekovalentne interakcije, utor – vežući spojevi pokazuju veću selektivnost prema manjem utoru DNA koji je, zbog drugačijeg oblika dvostruke uzvojnice, uži i dublji od manjeg utora RNA. Osim toga, pokazuju selektivnost prema dAdT bogatim slijedovima DNA naspram dGdC slijedova DNA zbog nepovoljnih steričkih utjecaja amino skupina gvanina. Stoga se utor – vežući spojevi i princip stvaranja spomenutih kompleksa detaljno istražuju u svrhu razumijevanja terapijskog djelovanja antibiotika i antitumorskih lijekova.

Još jedan način ostvarivanja nekovalentnih interakcija naziva se interkaliranje koje ima ključnu ulogu u mnogim antitumorskim lijekovima i antibioticima na način da blokira djelovanje topoizomeraze II. Interkaliranje je umetanje planarne aromatske molekule između parova baza nukleinske kiseline. Važna odrednica hoće li se interkaliranje ostvariti su Van der Waalsovi promjeri atoma interkalatora i polinukleotida jer interkalator mora fizički stati između susjednih baza. Aromatske molekule prvo ostvaruju elektrostatske interakcije s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida, a zatim se dodatno stabiliziraju hidrofobnim interakcijama spomenutih molekula s DNA ili RNA. Interkalativni kompleks je stabiliziran π - π aromatskim interakcijama nastalima preklapanjem aromatskih površina interkalatora i susjednih baza. Tijekom interkaliranja mogu se dodatno ostvariti specifične interakcije kojima između ostalih pripadaju: vodikove veze, Londonove disperzijske sile i elektrostatske interakcije između supstituenata ili heterocikličkih atoma interkalatora i određenog dijela polinukleotida. Dakle, kod interkalativnih kompleksa uvijek postoji ravnoteža između molekule elektrostatski vezane na vanjsku površinu nukleotida i interkalirane aromatske molekule. Ravnoteža ovisi o vanjskim čimbenicima: ionska jakost otopine, tip kationa u otopini i unutarnjim čimbenicima: broj induciranih i stalnih pozitivnih naboja u maloj

molekuli, vodikove veze, sterički čimbenici. Stoga je potrebno s više međusobno neovisnih metoda, o kojima će biti riječ u sljedećem poglavlju, istražiti i utvrditi interkalira li molekula s polinukleotidom. Obzirom na navedene interakcije može se uočiti selektivnost pojedinog interkalatora prema polinukleotidu. Nakon interkaliranja polinukleotidni lanac se ukružuje pa dolazi do produljenja uzvojnice i njene deformacije. Iz tog je razloga nemoguće ostvariti interkaliranje između susjednih parova baza što se naziva principom „isključenja susjeda” (eng. *neighbour exclusion principle*) (Slika 3).



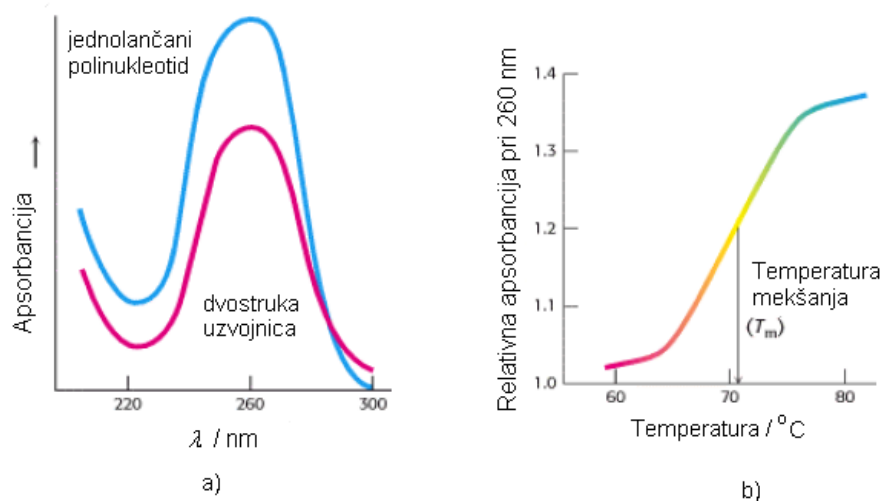
Slika 3. Princip isključenja susjeda

1.3. Pregled spektroskopskih metoda

1.3.1. Mekšanje dvolančanih polinukleotida

Mekšanje dvolančanih polinukleotida je metoda kojom se može usporediti afinitet jednog spoja prema različitim polinukleotidima, ali i usporediti afinitet više različitih spojeva prema jednoj vrsti polinukleotida. Princip na kojem djeluje je sljedeći: spoj se nekovalentno veže za polinukleotid što će stabilizirati ili destabilizirati dvostruku uzvojnica koja je inače termički nestabilna. Povišenjem temperature vodene otopine dvolančanih polinukleotida, postepeno pucaju vodikove veze između baza te polinukleotid prelazi u dvije jednolančane molekule. Grijanjem otopine najprije dolazi do pucanja dvostrukih vodikovih veza između adenina i timina, odnosno uracila, budući da je za njihovo odvajanje potrebna niža energija, a zatim pucaju trostruke vodikove veze između gvanina i citozina. Temperatura pri kojoj je pola dvolančane uzvojnice polinukleotida prešlo u dvije jednolančane naziva se točka „taljenja“ –

T_m (eng. *temperature melting*) (Slika 4). Točka taljenja razlikuje se ovisno o vrsti interakcije male organske molekule s polinukleotidom. Tako će interkalativni tip vezanja stabilizirati dvostruku uzvojnica polinukleotida što će rezultirati pozitivnom vrijednošću promjene točke taljenja, ΔT_m , odnosno spojevi koji će se vezati u velike ili male utore mogu stabilizirati, ali i destabilizirati dvostruku uzvojnica te dati negativne ΔT_m vrijednosti. Proces mekšanja polinukleotida najčešće se prati UV spektroskopijom zbog uočljivog hiperkromnog efekta UV spektra kojim je moguće odrediti promjenu točke taljenja. Spomenuta metoda je jednostavna i brzo se izvodi, a za mjerenja su potrebne male količine termički stabilnog ispitivanog spoja i polinukleotida.



Slika 4. a) Hiperkromni efekt prilikom denaturacije DNA; b) Krivulja mekšanja DNA

1.3.2. UV/VIS spektroskopija

Ultraljubičasta (UV) i vidljiva (VIS) spektroskopija je metoda koja se temelji na promjeni spektroskopskih svojstava određenog spoja uzrokovanih apsorpcijom elektromagnetskog zračenja na području valnih duljina od 100 do 400 nm za ultraljubičasto zračenje odnosno 400 do 800 nm za vidljivo zračenje. Apsorpciju elektromagnetskog zračenja vrše kromofori pri čemu elektroni iz osnovnog stanja prijelaze u pobuđeno elektronsko stanje. Kromofori su funkcionalne skupine organskih molekula od kojih su najčešće: acetilenska, amidna, azo, etilenska, karbonilna, karboksilna, kinoidna, nitro, aromatski prsten i konjugirani sustavi. Ovisno koliko su jako vezani elektroni kromofora, pojedini kromofori će apsorbirati zračenje pri određenim valnim duljinama. Stoga različite organske molekule mogu imati vrlo slične UV/VIS spektre ukoliko sadrže iste kromofore. Na pomake valnih duljina apsorpcije

moгу utjecati supstituenti – auksokromi koji sami ne apsorbiraju zračenje, ali mogu stabilizirati ili destabilizirati pobuđeno stanje elektrona što se najbolje vidi kod aromatskih molekula. Supstituenti koji doniraju elektrone kao što su alkilne, alkoksidne, amino i hidroksilne skupine, stabiliziraju pobuđeno aromatsko stanje i uzrokuju pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama što se naziva crveni pomak ili batokromni efekt. Suprotno tome, plavi pomak odnosno hipsokromni efekt je uzrokovan pomakom apsorpcijskog maksimuma prema nižim valnim duljinama zbog destabilizacije pobuđenog stanja aromata putem supstituenata koji primaju elektrone kao što su cijano, karbonilne, sulfonilne i nitro skupine.

Količina apsorbiranog UV/VIS zračenja izravno je proporcionalna koncentraciji ispitivanog uzorka. Stoga se ova metoda osim za kvalitativne koristi i za kvantitativne svrhe, tj. određivanje koncentracije uzoraka u smjesama na temelju Lambert – Beerova zakona prikazanim u jednadžbi (1)

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad (1)$$

gdje je A – apsorbancija

ε - molarni apsorpcijski koeficijent, [$\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$]

l - duljina optičkog puta, [cm]

c - molarna koncentracija, [mol dm^{-3}]

Apsorbancija je izražena logaritmom mjerenog snopa zračenja, tj. omjera početnog snopa zračenja i propuštenog zračenja. (2)

$$A = \log P_0/P \quad (2)$$

Molarni apsorpcijski koeficijent, ε , je mjera kojom se određuje vjerojatnost prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje. Elektronski prijelaz je dozvoljen u kvantno – kemijskom smislu ako je taj koeficijent veći od $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$.

Lambert – Beerov zakon ima tri vrste ograničenja:

1) istinska ograničenja jer se zakon može primjeniti samo na razrijeđene otopine

2) kemijska ograničenja uzrokovana asocijacijom, disocijacijom ili reakcijom ispitivanih molekula s otapalom

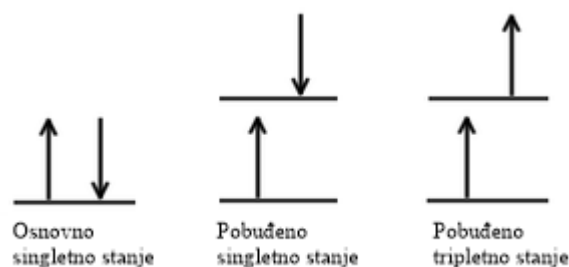
3) instrumentna ograničenja kao posljedica raspršenog zračenja iz unutrašnjih dijelova instrumenata ili polikromatskim zračenjem ako se koristi polikromatski izvor.

1.3.3. Fluorescencija

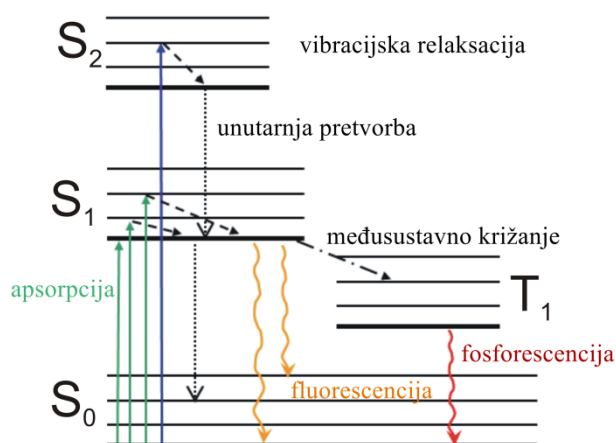
Fluorescencija je jedan od mehanizama kojim se molekula nakon apsorpcije zračenja iz pobuđenog stanja, vraća u osnovno stanje. Sve molekule koje apsorbiraju generalno imaju mogućnost fluorescencije, ali ih većina ne fluorescira jer im njihova struktura omogućuje relaksaciju bez pojave zračenja koja je brža od fluorescencije. Događaje u pobuđenom stanju zorno opisuju dijagram Jablonskog (Slika 6).

U osnovnom singletnom stanju molekule svi su elektroni spareni, odnosno imaju suprotne spinove, prema Paulievom načelu isključivosti. Apsorpcijom zračenja, molekula prelazi iz osnovnog u jedno od pobuđenih singletnih stanja (S1 i/ili S2) koje je energetski više stanje od tripletnog (T1 i/ili T2) u kojem dva elektrona različitih orbitala imaju paralelne spinove, tj. nespareni su, ali je prijelaz iz osnovnog singleta u triplet uz apsorpciju elektromagnetskog zračenja zabranjeno. Singlet i triplet su multipliciteti spinskih stanja (Slika 5).

Apsorbirana energija može se izgubiti na dva načina – emisijom zračenja ili neradijativnim putem u sudaru s drugim molekulama ili čvrstom površinom. U istom pobuđenom elektronskom stanju molekula vrlo brzo može vibracijskom relaksacijom doći iz višeg vibracijskog stanja u osnovno vibracijsko stanje. Zatim iz tog osnovnog vibracijskog stanja može unutarnjom pretvorbom prijeći u niže stanje istog multipliciteta ili u stanje drugog multipliciteta međusustavnim križanjem. Unutarnja pretvorba moguća je samo kada su elektronska stanja molekule energetski dovoljno bliska da se vibracijska stanja preklapaju. Tako se i međusustavno križanje javlja prilikom prekrivanja vibracijskih stanja pobuđenih singletnih i tripletnih stanja. Iz prvog pobuđenog singletnog stanja molekula se može vratiti u osnovno elektronsko stanje emisijom zračenja, već spomenutom fluorescencijom. Također se može iz pobuđenog tripletnog stanja emisijom fotona vratiti u osnovno elektronsko stanje što se naziva fosforescencija.



Slika 5. Konfiguracija osnovnih i najnižih pobuđenih stanja dvaju elektrona u dvoatomnoj molekuli.



Slika 6. Dijagram Jablonskog (S_0 = osnovno singletno stanje; S_1 i S_2 = pobuđena singletna stanja; T_1 = pobuđeno tripletno stanje)

Već je rečeno da je pobuđeno tripletno stanje niže energije od pobuđenog singletnog stanja stoga se fosforescencija javlja na većim valnim duljinama od fluorescencije. Tijekom fosforescencije mijenja se multiplicitet stanja pa je vremensko trajanje procesa oko 10^{-4} s ili dulje dok fluorescencija zbog očuvanog multipliciteta traje 10^{-8} do 10^{-9} s. Energija emitirana fluorescencijom je manja, odnosno veće valne duljine, od ekscitacijskog zračenja jer se dio energije gubi vibracijskom relaksacijom što se naziva Stokesovim pomakom. Omjer apsorbirane i emitirane energije naziva se kvantnom učinkovitošću odnosno iskorištenjem koje se koristi za praćenje kemijskih ili fizikalnih promjena u otopini budući da je ono karakteristično za određene grupe spojeva. U pravilu, što je veće kvantno iskorištenje ispitivane tvari to više ona fluorescira.

Sljedeća formula iskazuje intenzitet fluorescencije u razrijeđenoj otopini:

$$F = K I_0 c l \varepsilon \Phi \quad (3)$$

gdje je F – intenzitet fluorescencije

K – konstanta instrumenta

I_0 – intenzitet ekscitacijskog zračenja

c – koncentracija uzorka

l – duljina optičkog puta kivete

ε - molarni apsorpcijski koeficijent

Φ – kvantno iskorištenje

Molekule nerigidne strukture imaju veći broj mogućnosti neemisijske relaksacije kroz vibracije i istežanja dok molekule rigidnih, odnosno krutih struktura, pogoduju intenzitetu fluorescencije jer smanjuju brzinu relaksacije bez pojave zračenja do stanja u kojem ima dovoljno vremena za relaksaciju fluorescencijom. Tako spojevi koji sadrže aromatske prstenove daju najintenzivnije i najupotrebljivije fluorescencijske emisijske spektre. Iako spojevi poput alifatskih i acikličkih karbonilnih te spojevi koji sadrže konjugirane dvostruke veze fluoresciraju, ipak ih je manje od fluorescentnih spojeva koji sadrže aromatske prstenove. Porastom broja aromatskih prstenova u spoju i njihovom kondenzacijom kvantno iskorištenje raste. Supstitucija na aromatskom prstenu uzrokuje promjene u fluorescencijskim spektrima jer dolazi do pomaka valne duljine apsorpcijskog maksimuma.

U fluorescencijskim spektrima mogu se pojaviti i tzv. lažni signali koji ne dolaze od ispitivanog uzorka nego često od Ramanovog ili Rayleighova raspršenja koja se emitiraju zbog otapala. Kada se promjeni upadna valna duljina zračenja, signal produciran fluorescencijom uzorka ostaje na istoj valnoj duljini u spektru i mijenja se samo njegov intenzitet. U Ramanovu raspršenju signal se pomiče na veću ili manju valnu duljinu od one upadnog zračenja. Valna duljina raspršenog zračenja u Rayleighovu raspršenju jednaka je valnoj duljini upadnog zračenja. Osim spomenutih, mogu se pojaviti signali koji pripadaju emisiji nečistoća u uzorku ili zagađenja kiveta. Intenzitet spektra se još može mijenjati promjenom širine ulazne i izlazne pukotine.

Intenzitet fluorescencije može biti uvjetovan i fizikalnim čimbenicima kao što su temperatura, svjetlost, visoko koncentrirani uzorci. Za mjerenje uzoraka koji imaju visoku

ovisnost o temperaturi preporučuje se držanje uzoraka na konstantnoj temperaturi cirkulirajućom termostatom vodom koja prolazi kroz držač kiveta. Na određene uzorke kemijski utječe upadno zračenje. Mjerenju takvih uzoraka koristit će poklopac (eng. „shutter“) da bi se zaustavilo upadno svjetlo sve do početka mjerenja. Kod visoko koncentriranog uzorka javlja se problem emisije fluorescencije koje ne može doprijeti do emisijskog monokromatora jer se apsorpcija upadnog zračenja odvija samo u kutu kivete. U tom slučaju potrebno je razrijediti uzorak na prikladnu koncentraciju.

Za razliku od UV/VIS spektroskopije fluorimetrija je osjetljivija metoda budući da se valna duljina fluorescencije razlikuje od valne duljine upadnog zračenja. Osim toga, fluorimetrija daje i više podataka jer se zajedno mogu snimiti i pobudni i emisijski spektri. Pobudni spektar prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini upadnog zračenja i snima se pri definiranoj valnoj duljini emisije i konstantnim širinama pukotine. Emisijski spektar prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini emitiranog zračenja pri definiranoj valnoj duljini pobude i konstantnim širinama pukotine. Između dva spoja razlike su puno veće u intenzitetu emisije nego intenzitetu apsorpcije što je posljedica kvantnog iskorištenja.

1.3.4. Izračunavanje konstanti stabilnosti iz podataka dobivenih fluorimetrijskom titracijom

Konstantom stabilnosti (K_s) nastalih kompleksa izračunava se ili prosuđuje afinitet ispitivanog spoja prema polinukleotidu. To je moguće samo ako se radi o ravnotežnom procesu vezanja spoja na polinukleotid i ako su spektroskopske promjene dovoljno velike i proporcionalne udjelu novonastalog kompleksa. Jedini model vezanja koji pruža mogućnost jasne definicije veznih mjesta na polinukleotidu je interkalativni način vezanja na temelju kojeg je razvijen čitav niz jednadžbi kojima se računa konstanta stabilnosti prema podacima titracije ispitivanog spoja prema polinukleotidu. Osnova svih jednadžbi je Scatchardova inačica Langmuirove izoterme prikazana jednadžbom (4)

$$r / c_v = K_s (n-r) \quad (4)$$

gdje je $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$

c_v - koncentracija interkaliranog uzorka

K_s - konstanta stabilnosti kompleksa

$n = [\text{vezani spoj}] / [\text{polinukleotid}]$; ovaj omjer u literaturi stoji u različitim varijantama ovisno o tome je li koncentracija polinukleotida definirana kao koncentracija baza, parova baza ili najčešće kao koncentracija fosfata iz okosnice.

U povoljnim eksperimentalnim uvjetima interkaliranje daje linearnu ovisnost r/c_v o r pa je iz dobivenog pravca moguće izračunati konstantu stabilnosti K_s i vrijednost omjera n . Analiza podataka titracije je pouzdanija Scatchardovom jednadžbom nelinearne regresijske metode budući da prethodna jednadžba stavlja puno veću važnost na prvu točku (0 % nastalog kompleksa) i zadnju točku (100 % nastalog kompleksa).

Sljedeći izraz (5) prikazuje Scatchardovu izotermu vezanja u slučaju spektroskopski aktivnog kompleksa:

$$I = I_0 + ((I_{lim} - I_0) / (2 \cdot c)) \cdot (c + n \cdot c_s + 1 / K_s - ((c + n \cdot c_s + 1 / K_s)^2 - 4 \cdot c \cdot n \cdot c_s)^{1/2}) \quad (5)$$

U slučaju spektroskopski neaktivnog kompleksa Scatchardova izoterma vezanja se može prikazati izrazom (6):

$$I = I_0 - (I_0 / (2 \cdot c)) \cdot (c + n \cdot c_s + 1 / K_s - ((c + n \cdot c_s + 1 / K_s)^2 - 4 \cdot c \cdot n \cdot c_s)^{1/2}) \quad (6)$$

gdje je I – spektroskopski odgovor nakon dodatka određene količine polinukleotida

I_0 – spektroskopski odgovor čistog spoja (u slučaju spektroskopski neaktivnog spoja, I_0 je nula)

I_{lim} – spektroskopski odgovor kompleksa kad više nema slobodnog spoja u otopini

c – koncentracija ispitivanog spoja u otopini

c_s – koncentracija polinukleotida

n – omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida

K_s – konstanta stabilnosti kompleksa

U Scatchardovu jednadžbu uveden je parametar kooperativnosti ω koji je izveden iz teorijskih modela McGheea i von Hippela jer prethodna jednadžba ne pretpostavlja kooperativni, odnosno antikooperativni utjecaj molekule interkalatora na interkaliranje sljedeće molekule u susjedna vezna mjesta. Kod većine spektroskopskih titracija nije bilo moguće ostvariti uvjete od 100 % nastalog kompleksa pa je bila nužna obrada podataka na temelju spomenutih jednadžbi metodom nelinearne regresije. Međusobnom ovisnosti triju varijabli (K_s , n i I_{lim}) koja je vidljiva iz izraza (5) i (6) izračunate su krivulje širokih i plitkih minimuma u kojima je moguće varirati vrijednosti tih varijabli bez znatnog utjecaja na koeficijente korelacije eksperimentalnih i računskih podataka. U literaturi je taj problem širokog raspona vrijednosti rezultata rješavan na razne načine: fiksiranjem vrijednosti n na 0,17 – 0,2 prema vrijednostima standardnih interkalatora kao što su akridinijevi derivati ili etidijev bromid ili fiksiranjem omjera na 0,075 za bisinterkalatore, ali i određivanjem vrijednosti n neovisnim metodama (npr. ovisnost ΔT_m o omjeru r , UV/VIS ili fluorimetrijska titracija).

Titracijama provedenima pri većem suvišku veznih mjesta polinukleotida (omjer $r < 0,1$) dobivaju se najpouzdaniji rezultati K_s i n jer se pretpostavlja da se u tom slučaju molekule vežu na međusobno neovisna mjesta. Također, vrijednost n bi se trebalo odrediti barem dvjema neovisnim metodama.

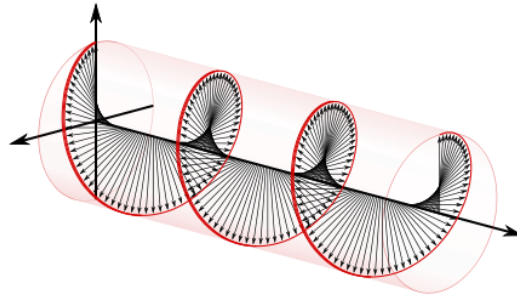
Ukoliko je konstanta stabilnosti puno veća od recipročne vrijednosti koncentracije ispitivanog spoja ($K_s \gg 1/c$) rezultati nisu pouzdani jer je u većem dijelu titracije polinukleotid prezasićen molekulama interkalatora. Ukupnoj vrijednosti K_s može pridonijeti i neinterkalativni način vezanja u uvjetima kada je $r > n$ pa se kao rezultat obrade titracije Scatchardovom jednadžbom dobivaju vrijednosti n veće od teoretski mogućih i bitno veće vrijednosti K_s . Također se u spektrima često susreću odstupanja od izobestičke točke što je posljedica nastanka više vrsta kompleksa. Na kraju titracije pretpostavlja se da je vrijednost r jednaka n .

1.3.5. Spektroskopija cirkularnog dikroizma

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD spektroskopija) mjeri razliku u apsorpciji lijevo i desno cirkularno polariziranog svjetla u molekula koje sadrže jedan ili više kiralnih kromofora.

Osnova cirkularnog dikroizma je kruženje vektora električnog i magnetskog polja cirkularno

polariziranog svjetla oko smjera kojim se širi, uz konstantnu magnitudu (Slika 7). Kruženje vektora može biti u smjeru kazaljke na satu što se naziva desno cirkularno polarizirano zračenje ili lijevo cirkularno polarizirano zračenje ako se odvija u smjeru suprotnom od kazaljke na satu.



Slika 7. Cirkularno polarizirana svjetlost

Spektar uzorka koji nastaje cirkularnim dikroizmom posljedica je njegovog izlaganja naizmjenično lijevoj i desnoj cirkularno polariziranoj svjetlosti određenih valnih duljina pri kojemu se jedno od polariziranih svjetala više apsorbira što rezultira iscrtavanjem elipse.

Ova metoda se najčešće koristi u proučavanju konformacija nukleinskih kiselina i sekundarnih i tercijarnih struktura proteina, ali i ispitivanju interakcija unutar biološkog sustava. Nukleinske kiseline sadrže kiralne nukleozide pa glavni doprinos CD spektroskopiji proizlazi iz asimetričnog slaganja nukleozida u helikalni aranžman. Mijenjanje temperature, koncentracije soli, pH ili drugih čimbenika u uzorku uzrokuje promjene u spektru koje mogu biti kooperativne ili nekooperativne i koje odražavaju postepene modifikacije geometrije nukleinske kiseline s jednim tipom konformacije, npr. B – DNA. U nekim slučajevima molekula se kooperativno mijenja iz jednog tipa geometrije u drugu, npr. iz B – DNA u A – DNA. Neki ligandi koji se vežu na polinukleotide su akiralni, odnosno optički neaktivni, ali u interakciji s kiralnom DNA može doći do nastanka induciranog CD (ICD) signala.

Prednosti cirkularnog dikroizma su: snimanje spektra je brzo i jednostavno, za analizu se koristi mala količina uzorka, mjerenje se može provoditi u vodenom mediju i nije ograničena molekulskom masom ispitivanih molekula. Nedostaci su instrumentna ograničenja kao što je optički sustav i struja tekućeg dušika za mjerenje u dalekom UV – području te upotreba nekih organskih otapala koja apsorbiraju zračenje.

1.4. Lignani: Benzoksantenski derivati

Pojam „lignan“ prvi je predstavio Haworth u svom radu 1948. Lignani su skupina široko rasprostranjenih specijaliziranih sekundarnih metabolita u biljaka. Najveća koncentracija prirodnih lignana zabilježena je u sjemenkama lana i sezama, a nešto manja u žitaricama, voću i povrću. Također su prisutni i u drugim dijelovima biljke kao što su korijen, stabljika, listovi i kora. Sinteza lignanskih spojeva odvija se putem šikiminske kiseline oksidativnim spajanjem dviju fenilpropanoidnih jedinica koje postaju vezane centralnim atomom(C₈). Različite strukture lignanskih spojeva praćene su različitim biološkim aktivnostima kao što su protuupalna aktivnost, protugljivična aktivnost, antioksidacijska aktivnost, protutumorska aktivnost i protuviralna aktivnost, a djeluju i kao inhibitori nekih enzima. Literaturni podaci o biološkim aktivnostima ove skupine prirodnih spojeva ukazuju na njihovu veliku važnost. Stoga se ti spojevi često koriste kao građevne jedinice novosintetiziranih organskih spojeva. Jedan od prirodnih lignana, podofilotoksin, prvi puta je izoliran 1880. iz korijena i rizoma vrste *Podophyllum peltatum* L., ali je prepoznat kao spoj s antitumorskom aktivnošću tek 1950. Prema Ardalani i sur. (2017) ovaj spoj zaustavlja rast stanice djelovanjem na polimerizaciju tubulina što posljedično zaustavlja diobeni ciklus stanice i tvorbu diobenog vretena mikrotubula.

Lignani i njihovi derivati pokazuju snažno antioksidacijsko djelovanje koje je korisno u farmakološkim istraživanjima, ali i u proizvodnji hrane te kozmetike. Moraux i sur. (2017) ispitivali su antioksidacijska svojstva jednog prirodnog lignana, 7' – hidroksimatairezina, koji je ekstrahiran iz kore jele, smreke i obične američke duglazije. Svrha tog istraživanja bila je sintetizirati lipofilne derivate spomenutog spoja bez smanjenja antioksidacijske aktivnosti. Nizom reakcija dobivena su četiri C-7' esterska derivata čija su se antioksidacijska svojstva zadržala zbog prisutnosti dviju gvajacilnih grupa – benzenski prsten s hidroksilnom i metoksi nastavkom. Početni spoj kao i derivati su pokazali snažno antioksidacijsko djelovanje usporedivo sa standardima askorbinskom kiselinom i α – tokoferolom (IC₅₀=20–25 μ M). Antioksidacijska aktivnost početnog spoja i derivata mjerena metodom DPPH bila je slična onoj butilhidroksitoluena (sintetski analog vitamina E), no nešto niža u usporedbi s drugim upotrijebljenim standardima.

Benzoksantenski derivati podofilotoksina koji su se koristili u ovom diplomskom radu sintetizirani su u grupi prof. Tringalija (Daquino i sur. 2009). Ovi spojevi su vrlo rijetki u prirodi i da bi se sintetizirali njihovi analozi potrebne su kemijske reakcije koje često imaju malo iskorištenje. Iz tih je razloga njihova biološka aktivnost i moguća farmakološka

primjena još uvijek vrlo neistražena. Zato se za istraživanje biomedicinskih svojstava nekih benzoksantenskih derivata ispitivala njihova interakcija s DNA metodom NMR i molekularnim pristajanjem (eng. *molecular docking*) te antiproliferativna aktivnost prema dvije različite tumorske stanične linije biološkim testovima „*in vitro*“. Princip vezanja spojeva s DNA je analiziran primjenom tehnike „diferencijalne frekvencije – razlika prijenosa zasićenja“ (eng. *differential frequency – saturation transfer difference*; DF – STD) koja se temelji na STD – NMR metodi (Di Micco i sur. 2011). Rezultati STD – NMR-a pokazali su da se od sedam ispitivanih spojeva četiri vežu na DNA, dva spoja ostvaruju vrlo slabu ili gotovo nikakvu interakciju s DNA dok za posljednji spoj podaci nisu prikupljeni zbog netopivosti spoja pri eksperimentalnim uvjetima. Kako bi se otkrio tip vezanja spojeva na DNA, primjenjen je DF – STD protokol s poli (dG – dC) · poli (dG – dC) kopolimerom kao biološkom metom. Ova metoda podrazumijeva stjecanje niza STD – NMR eksperimenata na dvije različite frekvencije zasićenja što daje korisnu informaciju o načinu vezanja spoja na molekule DNA: interkaliranje, vezanje u utor ili elektrostatske interakcije. Rezultati pokazuju sljedeće: policiklički aromatski dio jednog od spojeva interkalira između parova baza kopolimera dok se metoksi grupe vežu u mali utor. Drugi spoj, koji je triacetilirani derivat prethodnog spoja, također je pokazao interkaliranje aromatskog dijela između parova baza DNA i dok se jedna acetilna grupa veže u mali utor, druge dvije acetilne grupe se vežu u veliki utor kao i dvije metoksi grupe čiji su vrhovi upereni prema okosnici nukleinske kiseline. Treći ispitivani spoj također interkalira između parova baza DNA, što je i očekivano, budući da je struktura molekule planarna. Dobiveni podaci su u skladu s rezultatima metode molekularnog pristajanja koja se koristi za uvid u strukturne elemente molekule odgovorne za vezanje na biološku metu i za dizajn analognih spojeva različitih selektivnosti i načina vezanja na DNA. Dakle, ovi spojevi ostvaruju interakcije s molekulom DNA na dva načina: planarna aromatska jezgra interkalira između parova baza, a fleksibilni supstituenti se vežu u utore nukleinske kiseline. Posljedica takvog djelovanja je inhibicija staničnog enzima topozomeraze I i topozomeraze II što zaustavlja diobu stanice.

1.5. Pregled metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti

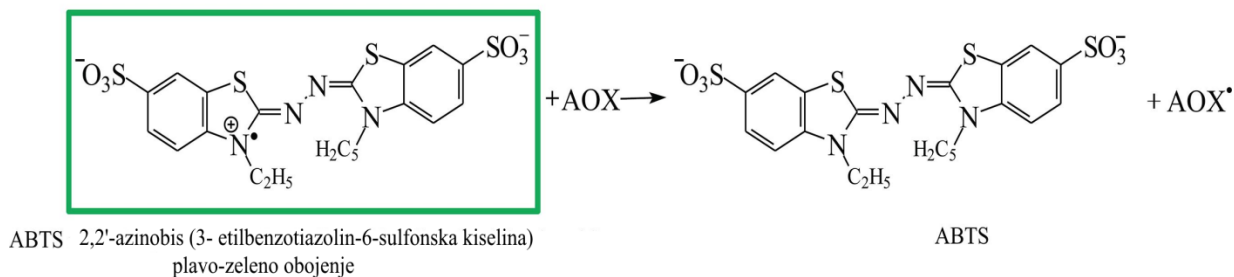
Antioksidacijska aktivnost, općenito, je izraz kojim se opisuje sposobnost molekule da doniranjem elektrona ili vodikovog atoma pretvori slobodan radikal u manje reaktivnu i štetnu kemijsku vrstu što je osobito važno u biološkim sustavima. Budući da su spomenute reakcije kompleksne, osmišljen je i razvijen niz metoda za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti kako

bi se rezultati točno interpretirali. Prema Pisoschi i sur. (2016) metode se mogu podijeliti u dvije velike grupe: metode temeljene na reakciji prijenosa vodika u koje spadaju ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parametar) i metoda izbjeljivanja krocina (Crocic bleaching assay) i metode temeljene na reakciji prijenosa elektrona kojima pripadaju FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (redukcija 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil radikala) i TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) metoda.

Metode koje su se koristile u ovom radu se temelje na određivanju sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona reduciraju neku oksidativnu vrstu, uključujući katione metala, karbonile i reaktivne slobodne radikale. U reakcijama ove grupe metoda oksidans je ujedno i probna tvar koja prima elektron od antioksidansa pa kao rezultat dolazi do promjene boje probne tvari čiji je intezitet proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Jakost reaktivnosti neke kemijske vrste ovisi o deprotoniranju i standardnom potencijalu reaktivne funkcionalne grupe. Deprotoniranjem raste pH vrijednost uzorka što uzrokuje pad vrijednosti standardnog potencijala reaktivne vrste. Nadalje, reakcije su uglavnom spore pa su i mjerenja antioksidacijske aktivnosti temeljena na mjerenju prirasta produkta, a ne na mjerenju kinetike reakcije. Reakcije ove grupe metoda su vrlo osjetljive na interferencije od kojih su najznačajnije reduktivne organske kiseline (askorbinska, mokraćna) i tragovi metala, što rezultira njihovom slabijom ponovljivošću te visokom varijabilnošću rezultata (Prior i sur. 2005).

1.5.1. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom

Puni naziv ABTS metode dolazi od spoja 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), plavozelenog radikal – kationa koji se kreira kemijskom ili enzimatskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije same analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže pri valnoj duljini od 736 nm. Nastali ABTS radikal-kation reagira s antioksidansima prisutnima u uzorku i pritom dolazi do njegovog obezbojenja (Slika 8). Često se za tu metodu koristi skraćeni naziv TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) jer se Trolox uobičajeno koristi kao standard. Stoga se kod TEAC metode antioksidacijska aktivnost (Re i sur. 1999) ispitivanog uzorka dovodi u vezu sa smanjenjem apsorbancije otopine uslijed smanjenja koncentracije ABTS radikal-kationa. Rezultati testa uspoređuju se sa 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilnom kiselinom (Trolox), analogom vitamina E topivim u vodi.

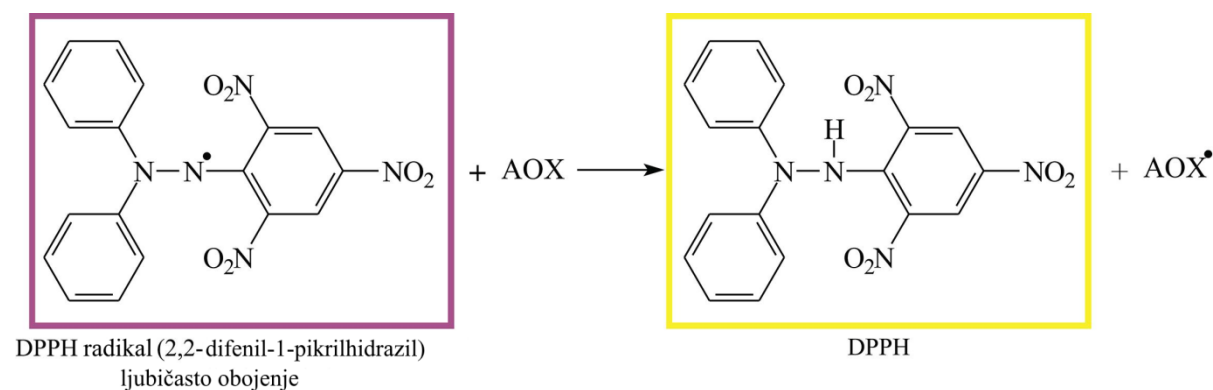


Slika 8. Redukcija ABTS radikala pomoću antioksidansa (Becker i sur. 2019)

Test je jednostavan i može se koristiti za određivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa jer je ABTS topiv i u vodenom, ali i u organskom mediju. No, osim o antioksidacijskoj aktivnosti spoja, redukcija radikala ovisi i o koncentraciji spoja te o vremenskom trajanju reakcije (neki polifenoli sporo reagiraju s ABTS radikal-kationom) (MacDonald-Wicks i sur. 2006).

1.5.2. Ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Metodom DPPH se određuje sposobnost hvatanja slobodnih radikala i jedna je od najčešće korištenih metoda. Ova metoda se temelji na redukciji alkoholne otopine DPPH radikala (2,2 – difenil – 1 – pikrilhidrazil) u reakciji s antioksidansom (AH) ili radikalom (R•) pri čemu dolazi do stvaranja neradikalne molekule DPPH (DPPH – H) čiji se maksimum absorbancije kod valne duljine od 517 nm smanjuje (Slika 9.) Ta reakcija je vidljiva kao promjena boje uzorka od intenzivno ljubičaste do žute. Smanjenje apsorbancije proporcionalno je aktivnosti zadanog antioksidansa.



Slika 9. Redukcija DPPH radikala pomoću antioksidansa (Becker i sur. 2019)

Test je vrlo jednostavan kao i metoda ABTS, ali ne zahtijeva generiranje radikala (kao što je to u slučaju ABTS-a). No, DPPH radikal nije tako pogodan za određivanje antioksidacijske aktivnosti hidrofilnih antioksidansa jer je topiv samo u organskim otapalima. Prisutnost vode u otapalu može dovesti do pogrešnih rezultata jer dolazi do agregacije ili koagulacije DPPH radikala, zbog čega postaje teže dostupan za reakciju s antioksidansima. Također je utvrđeno da i antioksidansi koji inače *in vivo* brzo reagiraju s peroksilnim radikalima (koji nastaju u lipidnoj peroksidaciji), obično sporo reagiraju s DPPH radikalom (MacDonald-Wicks i sur. 2006).

1.6. Cilj istraživanja

Posljednjih godina sve se više pažnje obraća na bolesti tumora različitih tkiva. Zbog kemoterapije kao oblika liječenja pacijenta neprekidnom i sustavnom upotrebom lijekova razvijen je širok spektar citostatika ovisno o vrsti tumora, njegovoj lokalizaciji i raširenosti. Ipak, citostatici često ne djeluju samo na zloćudne tumorske stanice već i na zdrave tjelesne stanice čovjeka. U želji za napredovanjem u borbi protiv tumora, istraživanja na različitim prirodnim organskim spojevima pokazala su dobre rezultate njihovih protutumorskih aktivnosti. Osim toga, neki spojevi pokazuju i antioksidacijsku aktivnost što je važno za obranu organizma od štetnih radikala koji također mogu biti okidači tumorske aktivnosti.

Benzoksantenski derivati prirodnih lignana u nekim istraživanjima pokazala su, kao što je već spomenuto, protutumorsku i antioksidacijsku aktivnost na određenim tumorskim staničnim linijama.

Ciljevi predloženog rada su:

- ispitati interakcije novosintetiziranih benzoksantenskih lignana s dvolančanim DNA i RNA polinukleotidima u svrhu boljeg razumijevanja njihove biološke aktivnosti
- utvrditi antioksidacijsku aktivnosti benzoksantenskih lignana

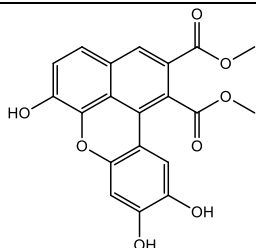
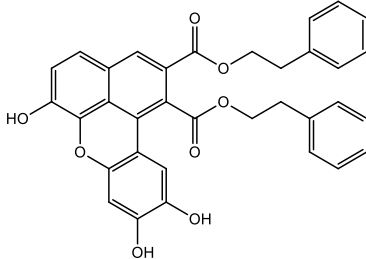
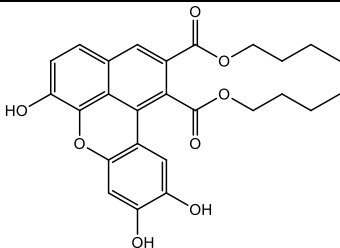
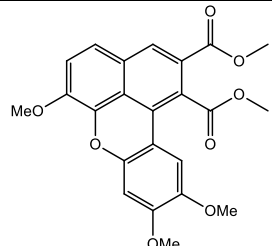
Prikupljena saznanja doprinijeti će mogućoj primjeni ovih spojeva u antitumorskoj terapiji.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

Za ovaj rad su se koristili benzoksantenski derivati lignana sintetizirani u grupi prof. Corrada Tringalija (Laboratory of Bioactive Natural Products; University of Catania – Department of Chemical Sciences) prikazani u tablici 2. Svi spojevi su otopljeni u dimetil sulfoksidu tako da volumen otopina iznosi $V = 200 \mu\text{l}$, a množinska koncentracija $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Uzorci su bili omotani aluminijskom folijom kako bi se zaštitili od svjetlosti i smješteni u hladnjak ako su se češće koristili ili zamrzivač za dulje vremenske periode.

Tablica 2. Oznake i strukture spojeva uz njihove pripadajuće vrijednosti

OZNAKA	STRUKTURA	Mr	$\gamma/\text{mg ml}^{-1}$	Koncentracija/M
CT-A1		382.3	9.38	5×10^{-3}
CT-A2		562.6	10	5×10^{-3}
CT-A4		466.5	9.63	5×10^{-3}
CT-A14		424.4	6.38	5×10^{-3}

Polinukleotidi koji su se koristili su otopljeni u kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$) koji je pripremljen miješanjem odgovarajućeg volumena vodene otopine natrijevog kakodilata ($c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) i klorovodične kiseline ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i razrjeđivanjem do konačnog volumena te podešavanjem konačnog pH. Koncentracije otopine polinukleotida, izražene kao koncentracija fosfatnih grupa, određene su spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na temelju podataka o molarnom ekstinkcijskom koeficijentu pri određenim valnim duljinama koje je dao proizvođač te su prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Molarni ekstinkcijski koeficijenti (ϵ) dvolančanih polinukleotida i pripadne valne duljine maksimuma apsorbancije (λ_{max})

polinukleotid	$\epsilon / \text{mmol}^{-1} \text{ cm}^{-3}$	$\lambda_{max} / \text{nm}$
ct – DNA	6600	260
poli (dAdT) ₂	6600	262
poli (A) – poli (U)	6000	260
poli (dGdC) ₂	8400	254

2.2. Spektroskopska karakterizacija otopina ispitivanih spojeva

UV/ Vis spektri spojeva su snimljeni na Varian Cary Bio spektrofotometru s Varian Cary internom kontrolom temperature ($\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$) i automatskim držačem 12 kiveta. Spektri su snimljeni u području od 230 do 600 nm pomoću aplikacije *Scan*. Za svaki uzorak snimljena je bazna linija kakodilatnog pufera tako da se automatski, tijekom snimanja, oduzima od spektra uzorka. Mjerenja su provedena u kvarcnim kivetama duljine optičkog puta 1 cm, smještenima u termostatirani držač kiveta. Dobiveni spektri su pohranjeni kao datoteke ASCII i potom obrađeni u programu Origin 7.0.

U 1 mL Na-kakodilatnog pufera ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7$) dodavani su alikvoti otopina spojeva tako da je za većinu spojeva prijedan raspon koncentracija od $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Tijekom snimanja spektara temperatura je držana stalnom na $25^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Termička stabilnost spojeva CT – A1 ($c_k = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), CT – A2 ($c_k = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), CT – A4 ($c_k = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), CT – A14 ($c_k = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) ispitivana je snimanjem njihove apsorbancije u 1 ml Na-kakodilatnog pufera pri temperaturama: (25, 35, 55, 75, 95, 25) $^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za ispitivanje fluorescencije spojeva korišten je program Scan na instrumentu Agilent Cary Eclipse. Da bi se ispitala linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji spoja, snimljeni su emisijski spektri u rasponu valnih duljina od 450 do 650 nm i koncentracija spojeva od $5 \cdot 10^{-7}$ do $2 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³. U kvarcnu kivetu optičkog puta 1 cm, dodano je 2 mL te je snimljen spektar pufera. Zatim je dodan alikvot otopine spoja, a njegov emisijski spektar dobiven je pobudom na valnoj duljini maksimuma očitano iz UV/Vis spektra. Nakon što je snimljen emisijski spektar, očitano je maksimum. Ekscitacijski spektar snimljen je pri valnoj duljini očitano maksimuma.

2.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima

2.3.1. Temperaturno mekšanje

Tijekom snimanja svakog eksperimenta temperaturnog mekšanja dvolančanih polinukleotida korišteno je 12 kvarcnih kiveta u koje je dodano po 1 ml Na-kakodilatnog pufera ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH = 7). Zatim je snimljena bazna linija i dodan volumen otopine polinukleotida tako da se postigne približna koncentracija $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³. Nakon toga je snimana apsorbancija otopina polinukleotida pri valnoj duljini maksimuma apsorbancije karakterističnoj za pojedini polinukleotid, a zatim je pomoću molarnih ekstinkcijskih koeficijenata izračunata (Tablica 3.) stvarna koncentracija polinukleotida u kiveti i potrebni dodaci spojeva kako bi se postigao omjer $r = 0,3$. Krivulje mekšanja dvolančanih polinukleotida, kao i krivulje kompleksa polinukleotida s ispitivanim spojevima, određene su mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini karakterističnoj za pojedini polinukleotid u ovisnosti o temperaturi otopine u temperaturnom intervalu 25 – 95 °C te su potom normalizirane. Vrijednost temperature mekšanja polinukleotida T_m određena je očitavanjem maksimuma prve derivacije krivulje mekšanja. Vrijednosti ΔT_m izračunate su kao razlika T_m vrijednosti kompleksa ispitivanih spojeva s polinukleotidima i vrijednosti T_m određenih za čiste polinukleotide. Sve vrijednosti T_m prosjek su dvaju mjerenja.

2.3.2. Fluorimetrijske titracije

Fluorimetrijske titracije provedene su na Varian Cary Eclipse fluorimetru s automatskim držačem za 4 kivete. Širina pukotine za pojedini spoj je odabrana snimanjem emisijskih spektara čistih spojeva i odabirom najpogodnije. Valne duljine pobude prilikom snimanja emisijskih spektara odgovarale su valnim duljinama maksimuma apsorpcije ispitivanih spojeva. U kivetu je dodan kakodilatni pufer i snimljena je bazna linija, a potom je dodan alikvot otopine spoja tako da se postigne koncentracija $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ koja je vrijedila za sve spojeve. Otopine polinukleotida su dodavane dok nije došlo do zasićenja, tj. dok se emisija zračenja nije više značajno mijenjala s dodatkom otopine polinukleotida. Nakon svakog dodatka otopine polinukleotida bilo je potrebno vrijeme inkubacije od 1,5 minute kako bi se uspostavila ravnoteža te se zatim snimio spektar.

Dobiveni podaci obrađeni su u programu Origin 7.0, a konstante stabilnosti izračunate pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije.

2.3.3. CD titracije

CD titracije su provedene na spektrofotometru JASCO J-815 pri sobnoj temperaturi. Istodobno se pratila UV/Vis promjena i promjena cirkularnog dikroizma u području valnih duljina od 230 do 500 nm. Svi ispitivani spojevi praćeni su standardnom osjetljivošću, a brzina skeniranja spektra je iznosila 200 nm min^{-1} . Svaki spektar se snimao tri puta pa je konačan spektar prosjek tih triju spektara.

Mjerenja su provedena u kvarcnim fluorimetrijskim kivetama optičkog puta duljine 1 cm. Prvo je dodan kakodilatni pufer i snimljena je bazna linija, a zatim je dodana otopina polinukleotida tako da se postigne koncentracija $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Potom su u kivetu postupno dodavani alikvoti pojedinog spoja sve dok se intenzitet CD spektra polinukleotida više nije značajno mijenjao.

2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

2.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom ABTS

Otopina ABTS radikala pripravljena je oksidacijom 7 mM otopine ABTS-a sa 140 mM otopinom kalijevog persulfata (Re i sur. 1999). Na dan analize otopina se razrijedila s etanolom tako da apsorbancija otopine iznosi oko 0,700. Slijepa proba je sadržavala 2 mL 96%-tnog etanola i 10 µL DMSO, a kontrolni uzorak (proba bez ekstrakta, A_0) 950 µL otopine ABTS radikala i 50 µL DMSO. Alikvot od 10 µL ispitivanog spoja (5mM) otopljenog u DMSO pomiješan je s 2 mL otopine ABTS radikala te je nakon 6 min inkubacije izmjerena apsorbancija probe pri valnoj duljini 734 nm. Antioksidacijska aktivnost metodom ABTS izmjerena je na UV/Vis spektrofotometru pri sobnoj temperaturi. Rezultati su izraženi na dva načina: kao postotak inhibicije ABTS radikala i u ekvivalentima Trolox-a. Rezultati izraženi kao postotak inhibicije ABTS radikala za ispitivane spojeve uspoređeni su s jednako izraženim rezultatima dobivenim za 5 mM otopinu Trolox-a (standard).

Postotak inhibicije ABTS radikala izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (8)$$

A_0 – apsorbancija kontrole (ABTS+ radikal)

A_t – apsorbancija uzorka (ABTS+ i ispitivani spoj)

Kako bi rezultati bili izraženi u ekvivalentima Trolox-a, izrađen je baždarni pravac s odgovarajućim koncentracijama (0,1-1,1 mM) Trolox-a otopljenog u DMSO.

2.4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH

Otopina DPPH radikala (0,1 mM) pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase DPPH u 96%-tnom etanolu (Germano i sur. 2002). Za referentno mjerenje otpipetirano je 96%-tni etanol i 50 µL DMSO. U kontrolnu (A_0) epruvetu dodano je 950 µL 0,1 mM otopine DPPH i 50 µL DMSO. Alikvot od 10 µL spoja otopljenog u DMSO pomiješan je s 950 µL 0,1 mM otopine DPPH. Sadržaj epruveta homogeniziran je na miješalici, potom su epruvete ostavljene 30 minuta u mraku, a zatim im je izmjerena apsorbancija. Antioksidacijska aktivnost metodom DPPH izmjerena je na UV/Vis spektrofotometru pri sobnoj temperaturi.

Kao i u slučaju ABTS metode, rezultati su izraženi na dva načina: kao postotak inhibicije DPPH radikala i u ekvivalentima Trolox-a. Za konstruiranje baždarnog pravca pripremljen je niz koncentracija Trolox-a (0,05-1,7 mM) otopljenog u DMSO.

2.4.3. Statistička obrada podataka

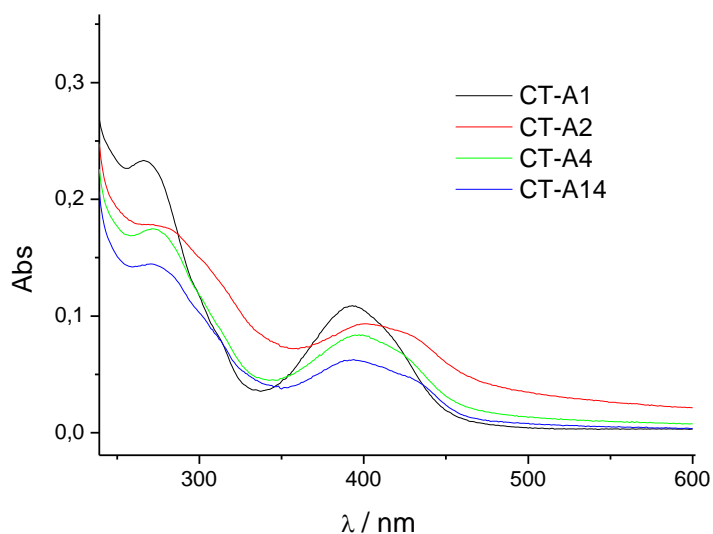
Statistička analiza podataka dobivenih za antioksidacijsku aktivnost i njihov grafički prikaz proveden je korištenjem računalnog programa STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., SAD) i Excel programa Microsoft Office paketa. Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom aritmetička je sredina tri replike. Razlike između eksperimentalnih grupa testirane su jednosmjernom analizom varijance – one way ANOVA i *post hoc* testom višestrukih usporedbi. Statistički značajnim rezultatima smatrani su oni rezultati koji su se razlikovali na razini $p < 0,05$. Također, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za antioksidacijsku aktivnost utvrđenu putem metoda ABTS i DPPH.

3. REZULTATI

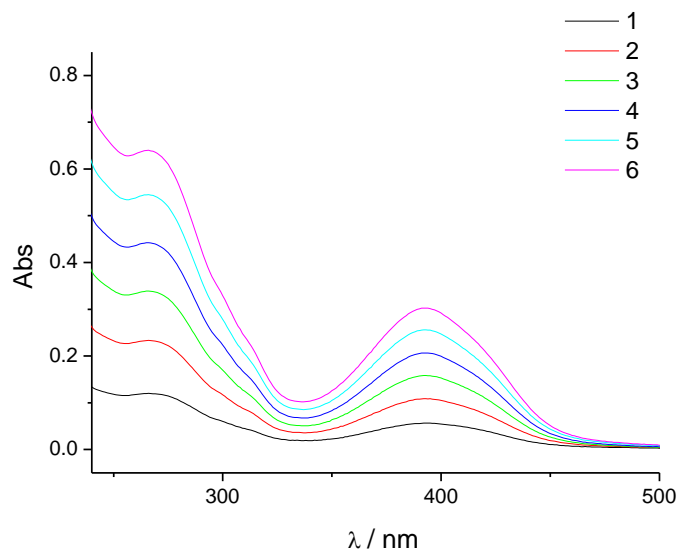
3.1. Spektroskopska svojstva benzoksantenskih derivata ligana CT – A1, CT – A2, CT – A4, CT – A14

3.1.1. UV/Vis spektri

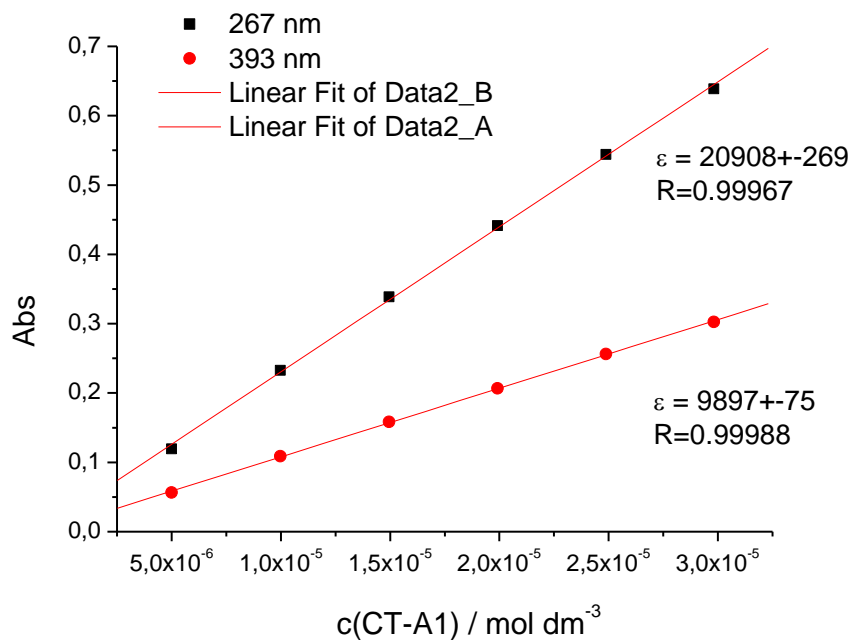
Svi spojevi (CT – A1, CT – A2, CT – A4, CT – A14) su otopljeni u DMSO tako da im molarna koncentracija iznosi $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Puferirane otopine tih spojeva pokazale su višednevnu stabilnost. Titracijama je utvrđeno da je absorbancija spojeva proporcionalna njihovim koncentracijama $c = 1 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ što je prikazano na slikama 10 –12.



Slika 10. UV/Vis spektri otopina spojeva CT – A1, CT-A2, CT-A4, CT-A14 pri molarnoj koncentraciji $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; pH = 7, natrijev kakodilatni puffer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 11. Promjene UV/Vis spektra otopine spoja CT – A1 pri različitim molarnim koncentracijama (raspon koncentracije od $c = 5 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pri pH = 7, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ M}$.



Slika 12. Ovisnost apsorbancije spoja CT – A1 o koncentraciji pri 267 i 393 nm.

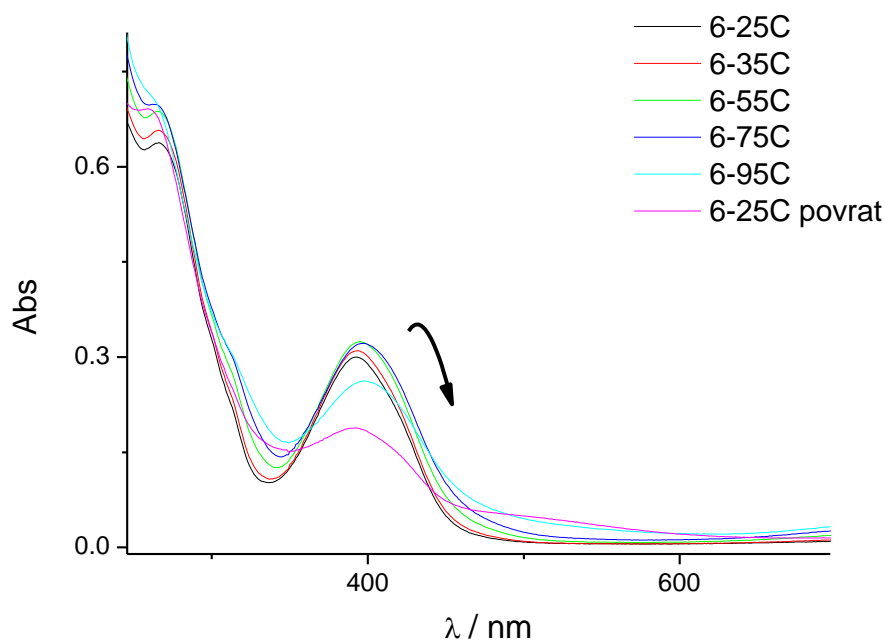
Porastom koncentracija otopina spojeva, linearne promjene u apsorpciji ukazuju da ispitivani spojevi pri eksperimentalnim uvjetima ne agregiraju intermolekularnim slaganjem. Iz dobivenih spektara očitane su valne duljine maksimuma apsorpcije i preko jednadžbe pravca izračunati su molarni ekstinkcijski koeficijenti iz pripadne valne duljine. Podaci su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Molarni ekstinkcijski koeficijenti i valne duljine maksimuma apsorpcije spojeva CT – A1, CT – A2, CT – A4, CT – A14

	pH = 7,0 ^a	
	λ_{\max} / nm	$\varepsilon \cdot 10^3$ / mmol ⁻¹ cm ²
CT – A1	267	20.9
	393	9.9
CT – A2	269	17.9
	401	9.8
CT – A4	272	17.1
	398	8.2
CT – A14	272	18.0
	394	7.7

^aNatrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 7,0.

Promjene UV/Vis spektra uzrokovane porastom temperature do 95°C su bile manje pri apsorpcijskim maksimumima kraćih valnih duljina spojeva CT – A1, CT – A2 i CT – A4 dok su za spoj CT – A14 promjene bile nešto veće. (Slika 13.)

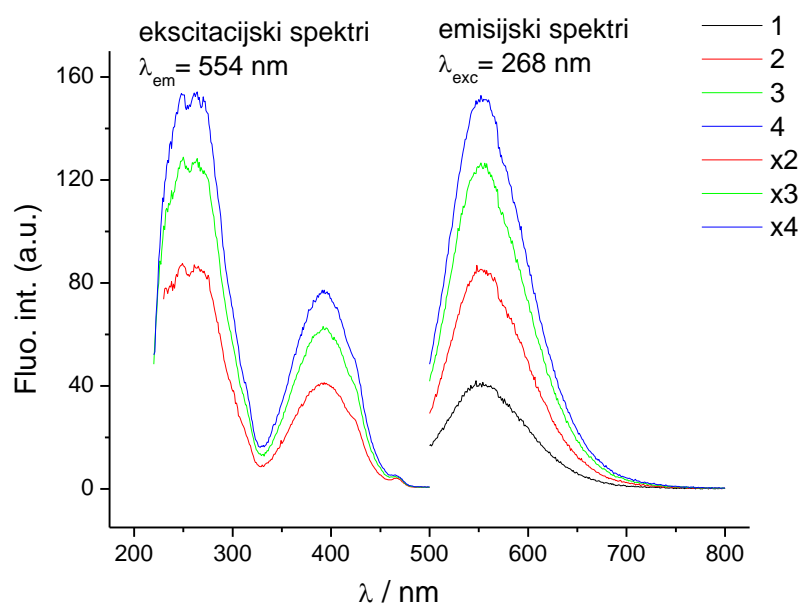


Slika 13. Promjene UV/Vis spektra spoja CT – A1 porastom temperature do 95°C i hlađenjem na temperaturu 25 °C pri pH = 7, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05$ M.

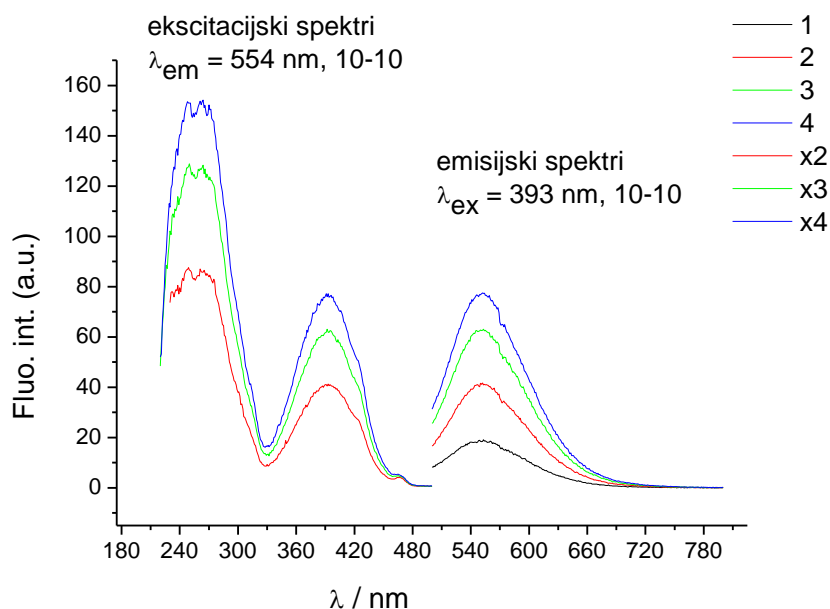
Porastom temperature promjene UV/Vis spektra bile su veće za apsorpcijske maksimume duljih valnih duljina spojeva nego za maksimume kraćih valnih duljina. Jedino su za spoj CT – A14 promjene bile neznatne pri maksimumu dulje valne duljine i nešto veće za maksimum kraće valne duljine. Obnovljivost UV/Vis spektra hlađenjem nazad na temperaturu 25°C je bila dobra za spoj CT – A14, posebno za apsorpcijski maksimum dulje valne duljine dok je za ostale spojeve obnovljivost bila odlična za apsorpcijski maksimum kraće valne duljine, ali i značajna za apsorpcijski maksimum dulje valne duljine.

3.1.2. Fluorescencijski spektri

Intenziteti emisija puferiranih vodenih otopina (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}=7$) ispitivanih spojeva su proporcionalni njihovim molarnim koncentracijama. (Slike 14 i 15).



Slika 14. Promjene emisijskih (1-4) i pobudnih (x2-x4) spektara pri $\lambda_{exc} = 268 \text{ nm}$ za spoj CT – A1 pri različitim molarnim koncentracijama (raspon koncentracije $c = 5 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$); $\text{pH} = 7$, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 15. Promjene emisijskih (1-4) i pobudnih (x2-x4) spektara pri $\lambda_{exc} = 393$ nm za spoj CT – A1 pri različitim molarnim koncentracijama (raspon koncentracije $c = 5 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3}); pH = 7, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05$ mol dm^{-3} ; ekscitacijski slit=10, emisijski slit=10.

Emisijski maksimum spoja CT – A1 nalazi se na istoj valnoj duljini bez obzira je li spoj CT – A1 pobuđen pri 268 or 393 nm.

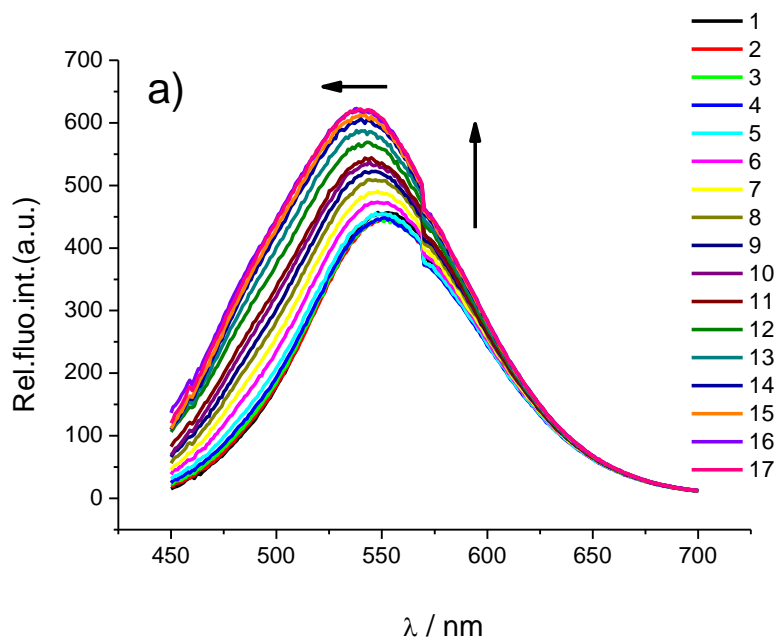
Emisijski maksimum spoja CT – A2 je na nižoj valnoj duljini od emisijskog maksimuma spoja CT – A14 kao i od CT - A1 i CT - A4. Mogući razlog tome su feniletalni nastavci na položajima C-1 i C-2 benzoksantenskog prstena spoja CT – A2.

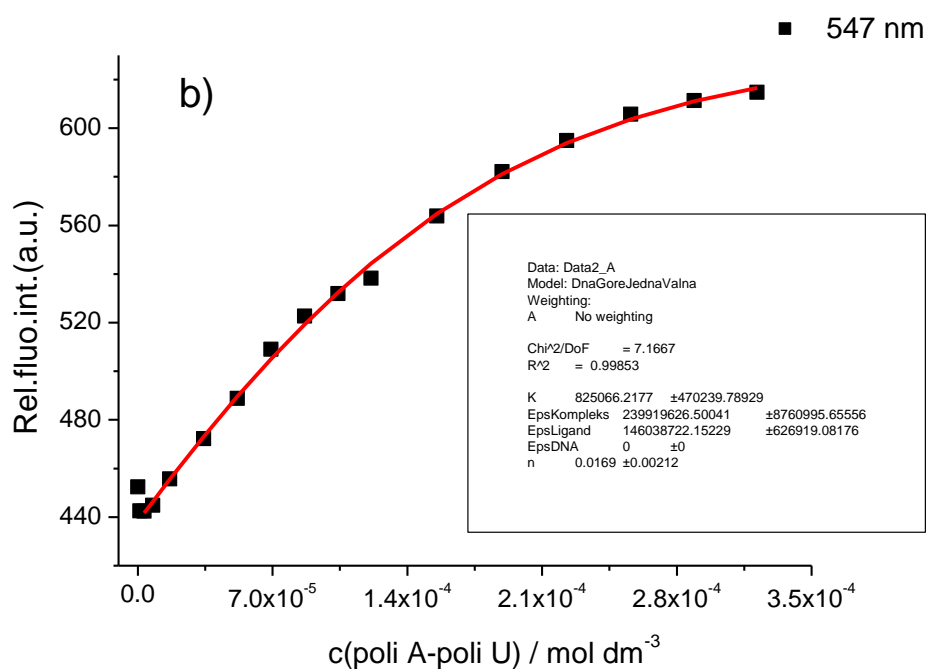
3.2. Interakcija spojeva CT – A1, CT – A2, CT – A4, CT – A14 s dvolančanim polinukleotidima

3.2.1. Fluorimetrijske titracije

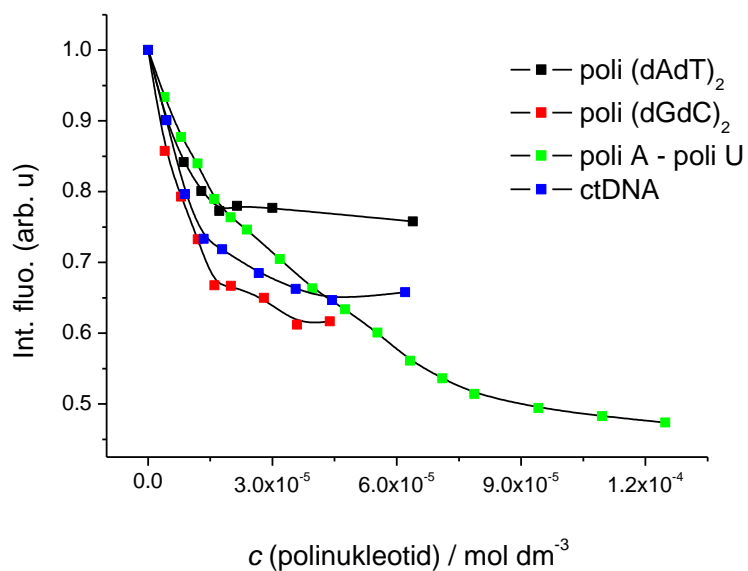
U titracijama polinukleotida sa spojevima CT-A14 i CT-A4 (Slike 17 i 18) došlo je do gašenja fluorescencije. Za razliku od tih spojeva, dodavanje polinukleotida u puferirane otopine spojeva CT-A1 i CT-A2 rezultiralo je povećanjem njihove fluorescencije (Slika 16). Promjene fluorescencije spojeva CT-A1, CT-A2 i CT-A14 s ispitivanim polinukleotidima nisu bile ovisne o strukturi tih polinukleotida. U većini slučajeva, fluorescencijske promjene spoja CT – A4 s ispitivanim polinukleotidima su bile premale za točno izračunavanje konstanti vezanja (Tablica 5).

Primjećeno je da spojevi CT-A1 i CT-A14, koji se razlikuju samo po jednom supstituentu (-OH grupa i -OCH₃ grupa) na benzoksantenskom prstenu, pokazuju suprotne promjene u fluorescenciji u titracijama s ispitivanim polinukleotidima (Tablica 5; Slike 16 i 17). U interakciji s DNA fluorescencija spoja CT – A1 se povećala dok se fluorescencija spoja CT-A14 smanjila što bi se moglo pripisati donorskim svojstvima metoksi grupa.

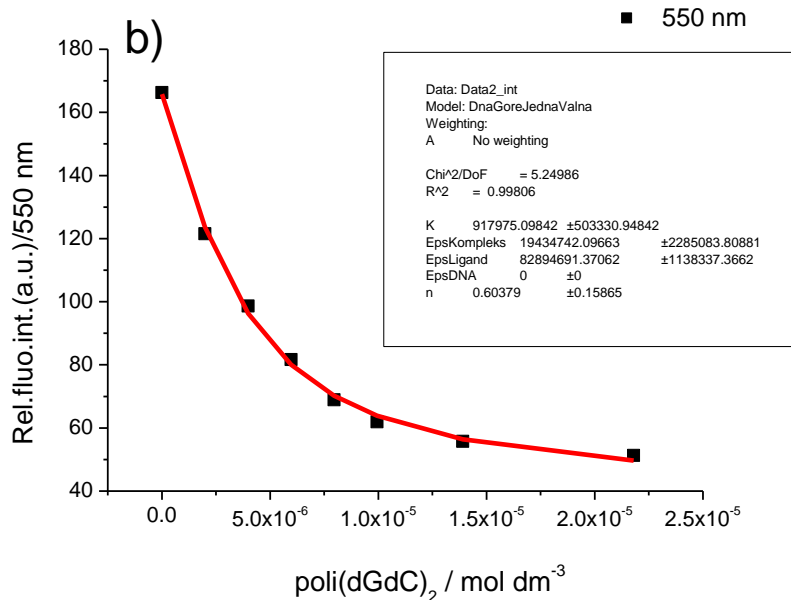
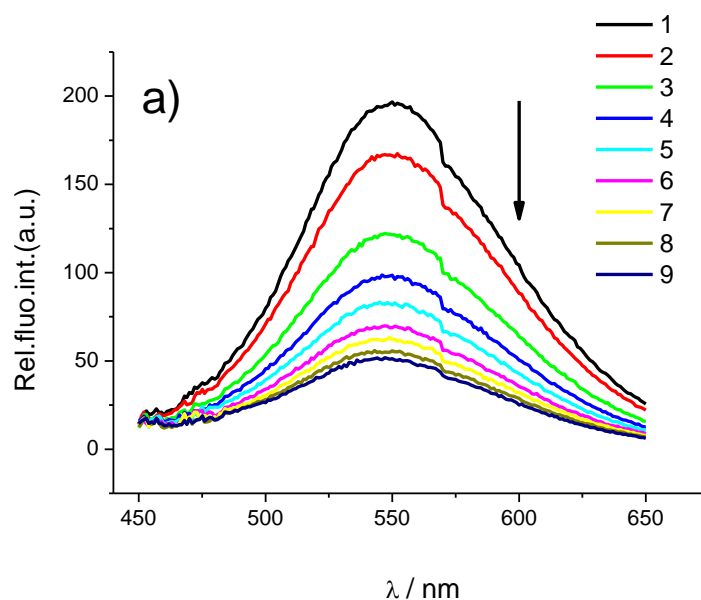




Slika 16. a) Promjene fluorescencijskog spektra spoja CT-A1 ($c = 3.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 393 \text{ nm}$) nakon titracije s poli A – poli U ($c = 1.1 \cdot 10^{-6} - 3.2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Ovisnost absorbancije spoja CT-A1 pri valnoj duljini $\lambda_{\text{max}} = 547 \text{ nm}$ o molarnoj koncentraciji poli A-poli U; pH=7, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 17. Ovisnost fluorescencije o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja CT-A14 s polinukleotidima ($\lambda_{exc} = 394 \text{ nm}$, $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$). Izmjereno pri pH=7 u kakodilatnom puferu $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. Vrijednosti su normalizirane s obzirom na prvu točku.



Slika 18. a) Promjene fluorescencijskog spektra spoja CT-A4 ($c = 2.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 398 \text{ nm}$) nakon titracije s poli (dGdC) · poli (dGdC) ($c = 2.0 \cdot 10^{-6} - 2.2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Ovisnost absorbancije spoja CT-A4 pri valnoj duljini $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$ o molarnoj koncentraciji poli (dGdC) · poli (dGdC); pH=7, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Konstante vezanja K_s i omjeri $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ dobiveni su obradom podataka fluorimetrijskih titracija pomoću Scatchardove jednadžbe. Rezultati su prikazani u tablici 5. Spojevi CT-A1 i CT-A14 su pokazali sličan afinitet prema dl-DNA i dl-RNA. Ipak, oba spoja su pokazala nešto veći afinitet prema AT parovima baza DNA nego prema GC parovima baza. Suprotno spojevima CT-A1 i CT-A14, spojevi CT-A2 i CT-A4 pokazali su veću selektivnost u vezanju na DNA, osobito spoj CT-A4 koji je pokazao značajne promjene samo nakon dodatka GC parova baza DNA.

Tablica 5. Konstante vezanja ($\log K_s$)^a i omjeri n^b ($[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]$) izračunati iz fluorimetrijskih titracija spojeva CT-A1, CT-A2, CT-A4 i CT-A14 sa dl- polinukleotidima; pH = 7.0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$

	ctDNA			poli A - poli U			p(dAdT) ₂			p(dGdC) ₂		
	$\log K_s$	n	I/I_0^c	$\log K_s$	n	I/I_0^c	$\log K_s$	n	I/I_0^c	$\log K_s$	n	I/I_0^c
CTA-1	6.0	0.01	2.2	5.9	0.02	1.6	5.9	0.08	2.5	5.2	0.03	2.0
CTA-2	5.0	0.09	2.4	- ^d	- ^d	- ^d	5.3	0.05	1.9	5.1	0.03	1.9
CTA-4	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	6.0	0.6	0.2
CTA-14	6.4	0.17	0.6	5.2	0.16	0.3	6.3	0.26	0.75	5.6	0.55	0.6

^a vrijednosti $\log K_s$ izračunate prema Scatchardovoj jednadžbi za $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,6-0,01$; koeficijenti korelacije $>0,99$ za sve određene vrijednosti K_s

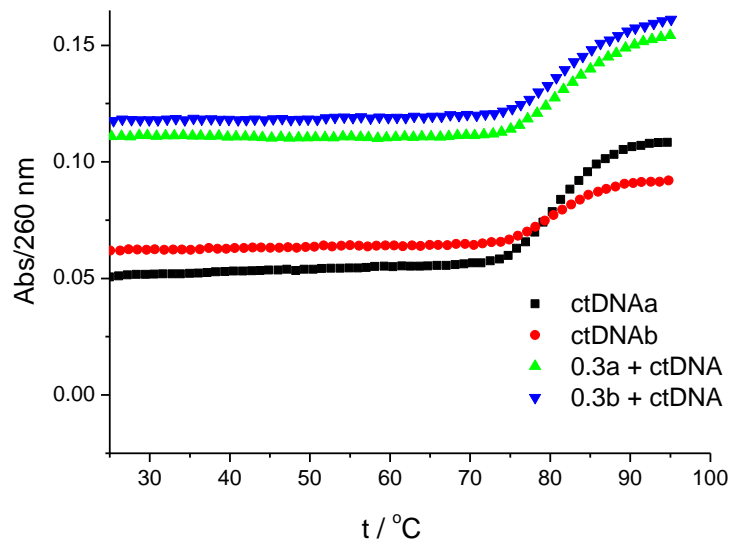
^b vrijednosti omjera $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ izračunate prema Scatchardovoj jednadžbi

^c I_0 – početni intenzitet fluorescencije spojeva CT-A1, CT-A2, CT-A4 i CT-A14; I – intenzitet fluorescencije kompleksa CT-A1, CT-A2, CT-A4 i CT-A14/polinukleotid izračunat Scatchardovom jednadžbom.

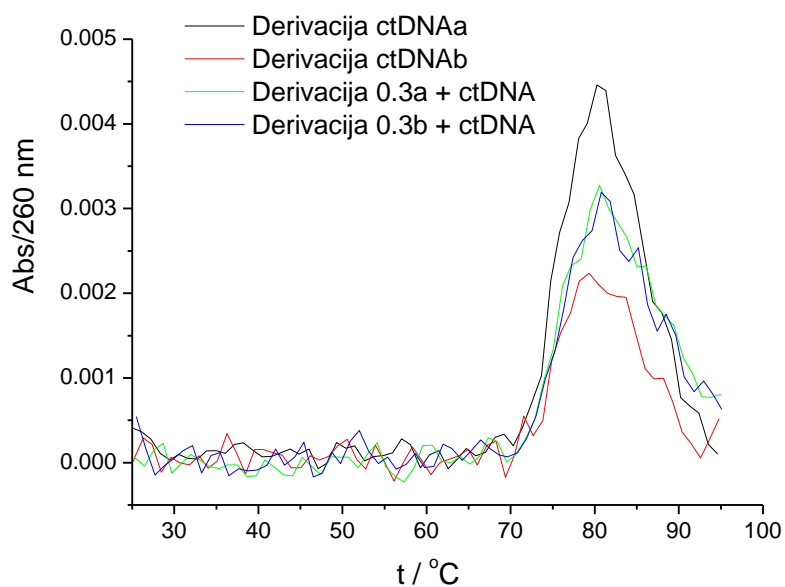
^d promjene intenziteta fluorescencije ispitivanih spojeva s polinukleotidima su bile premale za točno izračunavanje konstanti stabilnosti

3.2.2. Promjene temperaturnog mekšanja

Dobro je poznato da nakon zagrijavanja na točno određenoj temperaturi (vrijednost T_m) dvolančani polinukleotid disocira na dva jednolančana polinukleotida. Nekovalentno vezanje malih molekula na dvolančani polinukleotid obično utječe na termičku stabilnost lanaca. Razlika između T_m vrijednosti slobodnog polinukleotida i kompleksa sa malom molekulom (vrijednost ΔT_m) je važan čimbenik u karakterizaciji interakcije male molekule i dvolančanog polinukleotida. Osim čistog polinukleotida i njegovog kompleksa s malom molekulom, praćene su i promjene samih spojeva u rasponu od 25 – 95°C na 260 nm. Promjene u apsorbanciji spoja na 260 nm nisu se značajno mijenjale s porastom temperature. Stoga nije trebalo korigirati rezultate dobivene u eksperimentima mekšanja (Slike 19 i 20).

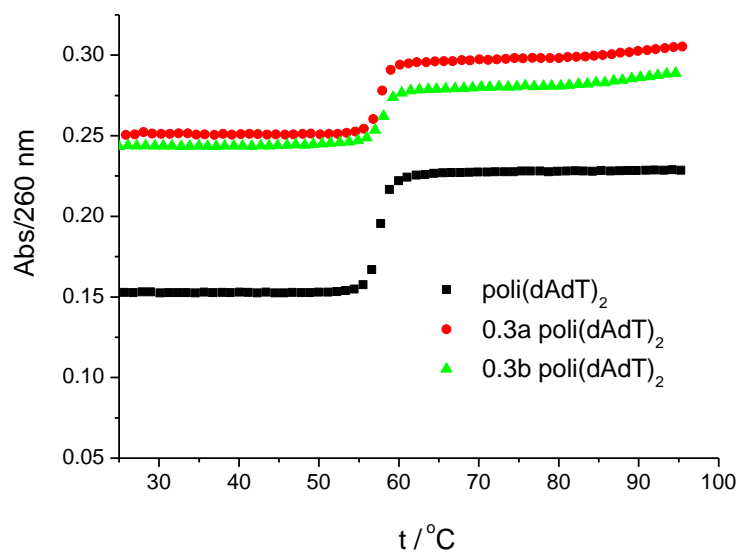


a)

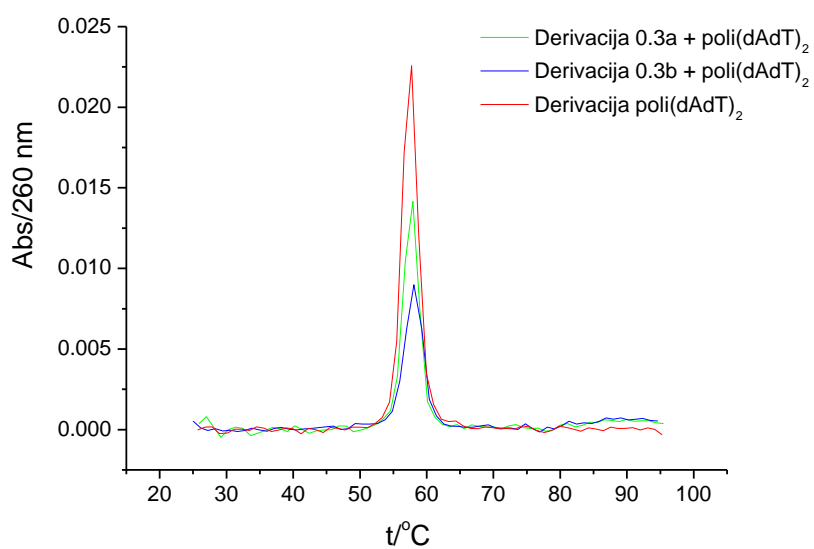


b)

Slika 19. a) Krivulja mekšanja ctDNA nakon dodatka omjera r ($[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}])=0.3$ spoja CT – A14; pH = 7.0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$)
 b) Ovisnost prve derivacije absorbancije o temperaturi



a)



b)

Slika 20. a) Krivulja mekšanja poli(dAdT) · poli (dAdT) nakon dodatka omjera r ($[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]=0.3$ spoja CT – A14; pH = 7.0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$)
 b) Ovisnost prve derivacije absorbancije o temperaturi

Tablica 6. Vrijednost^a ΔT_m (°C) ispitivanih polinukleotida nakon dodatka omjera^b, $r=0.3$ spojeva CT-A1, CT-A2, CT-A4 i CT-A14 pri pH = 7.0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$).

^b $r=0.3$	CT-A1	CT-A2	CT-A4	CT-A14
ct-DNA	0.5	0.6	1.0	1.0
poli A - poli U	0	0	0	0.7
poli (dA – dT) · poli (dA – dT)	0.7	0	0	0.9

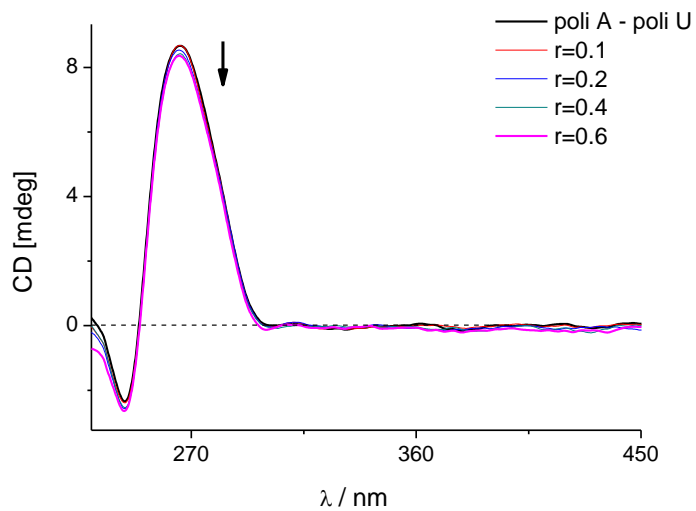
^aGreška ΔT_m : $\pm 0.5^\circ\text{C}$;

^b $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$

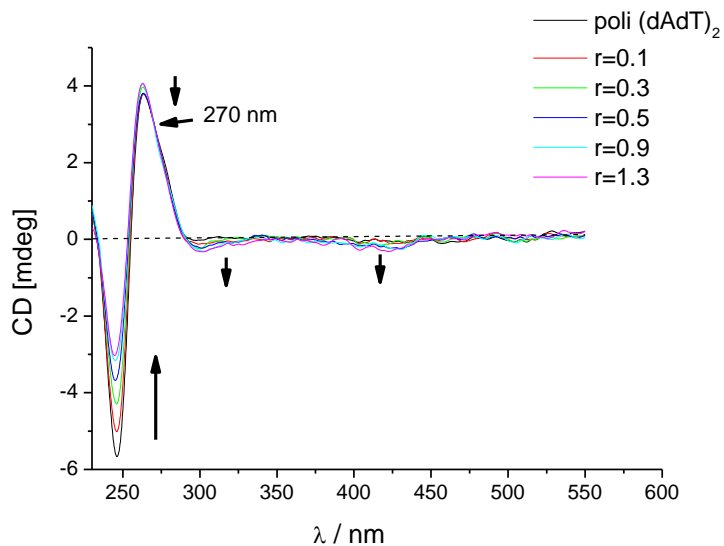
Svi ispitivani spojevi pokazali su mali učinak stabilizacije miješanih parova baza DNA (sastav ctDNA: 58% AT, 42% GC), i od njih, samo spojevi CT-A1 i CT-A14 stabiliziraju AT bazne parove DNA. Nijedan od ispitivanih spojeva nije pokazao nikakvu stabilizacijski učinak parova baza AU osim spoja CT-A14 koji je pokazao malen stabilizacijski efekt.

3.2.3. CD titracije

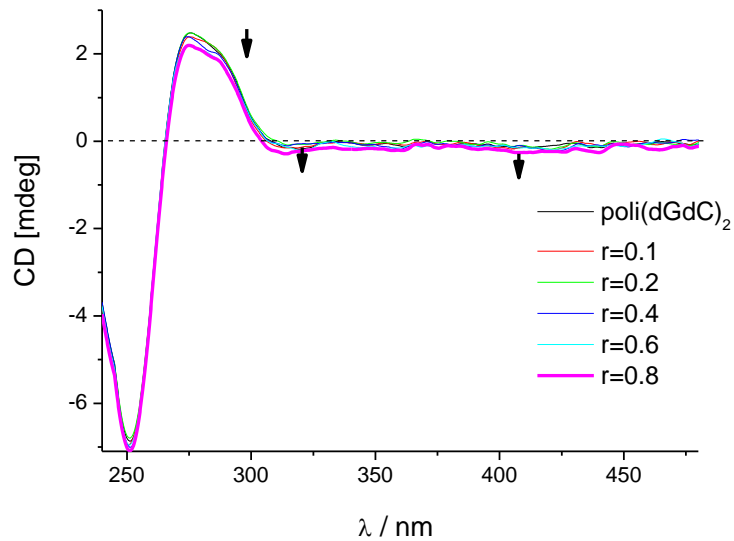
Iz CD (cirkularni dikroizam) spektara kompleksa malih organskih molekula i polinukleotida mogu se dobiti informacije o konformacijskim promjenama u sekundarnoj strukturi polinukleotida nastalim uslijed vezanja malih molekula na polinukleotide (Rodger i Norden 1997). Također, male akiralne molekule mogu uzrokovati nastajanje induciranih CD spektara (ICD spektri) prilikom vezanja na polinukleotide. Na temelju tih spektara mogu se izvesti zaključci o međusobnoj orijentaciji osi malih molekula i polinukleotida, a time i o načinu vezanja malih molekula na polinukleotide (Berova i sur. 2000; Eriksson i Norden 2001). Ispitivani spojevi su akiralni i apsorbiraju u području od 220 – 360 nm.



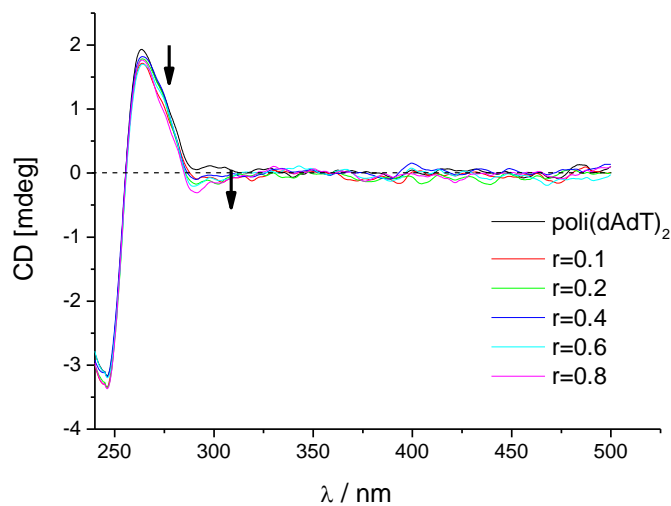
Slika 21. CD titracija poli A-poli U ($c = 3.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) sa spojem CT-A1, pri molarnim omjerima, $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$; pH = 7.0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 22. CD titracija poli(dAdT) · poli(dAdT) ($c = 3.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s CT-A1 pri molarnim omjerima, $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$; pH = 7.0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 23. CD titracija poli(dGdC) · poli (dGdC) ($c = 3.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s CT-A4 pri molarnim omjerima, $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$; pH = 7.0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 24. CD titracija poli(dAdT) · poli (dAdT) ($c = 3.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s CT-A14 pri molarnim omjerima, $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$; pH = 7.0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$

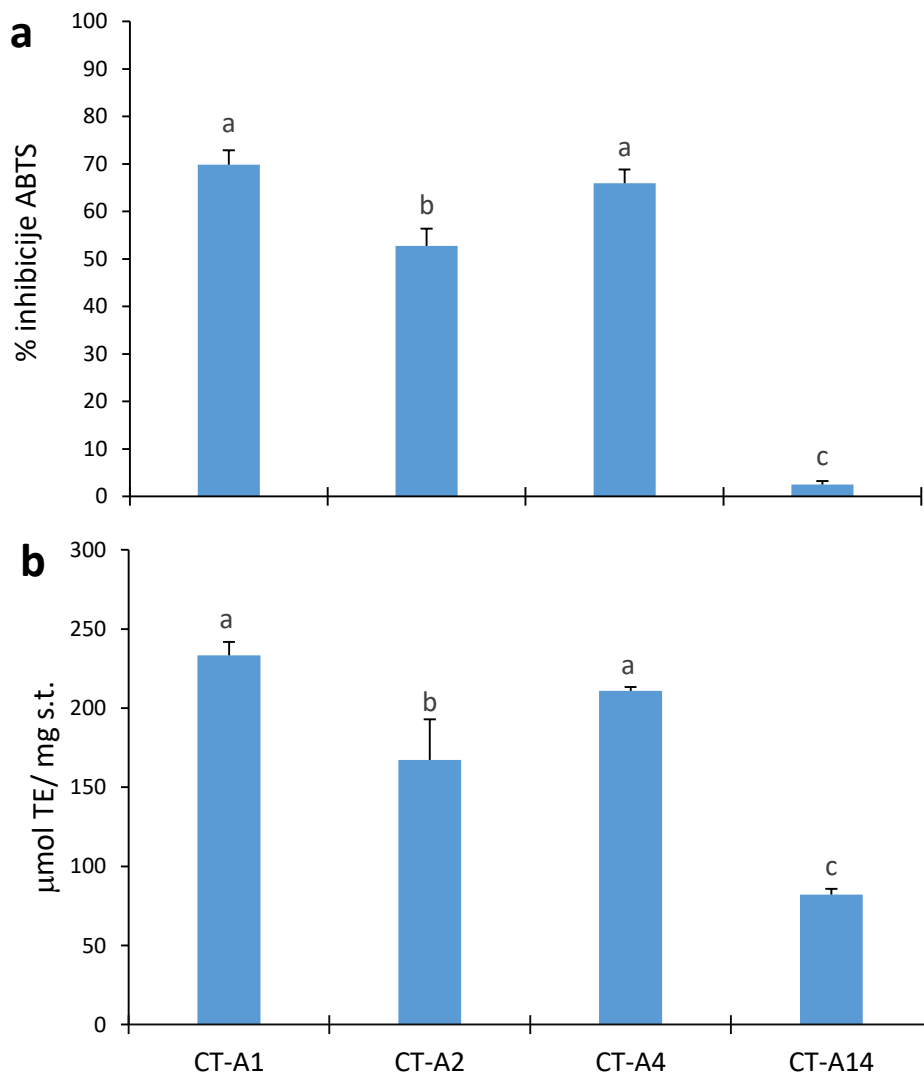
Nakon dodatka polinukleotida u otopine spojeva, u većini slučajeva došlo je do malog povećanja CD spektra RNA, a osobito DNA polinukleotida. (Slike 21-24). Za razliku od RNA (poli A – poli U), u titracijama s DNA i većine ispitivanih spojeva, zapaženi su slabi negativni CD (ICD) signali na valnoj duljini oko 300 nm. Spojevi CT-A1 i CT-A4 su prilikom vezanja na poli(dAdT) · poli (dAdT) i poli(dGdC) · poli (dGdC) izazvali nastajanje slabih negativnih ICD signala na valnoj duljini oko 400 nm. Za razliku od ostalih spojeva, dodatak CT-A2 je izazvao značajno povećanje CD spektra polinukleotida s GC parovima baza. Nadalje, prisustvo izoeliptičke točke u spektru ukazuje na stvaranje jednog dominantnog tipa kompleksa CT-A1 / poli (dAdT) · poli(dAdT) (N. Berova i sur. 2000).

Pojava slabog negativnog ICD signala, koji je rezultat paralelne orijentacije dugačke osi liganda s dugačkom osi susjednih parova baza, upućuje na interkalativni način vezanja. Takav zaključak dodatno potvrđuju vrijednosti konstanti vezanja koje su jednake ili veće od 10 μ M te slabi, ali mjerljivi stabilizacijski učinci dvolančanih polinukleotida (Tablica 6).

3.3. Antioksidacijska aktivnost spojeva CT – A1, CT – A2, CT – A4, CT – A14

3.3.1. Antioksidacijsko djelovanje – metoda ABTS

Antioksidacijska aktivnost ispitivanih spojeva izražena u % inhibicije ABTS radikala prikazana je na slici 25a, a ona izražena u μ mol ekvivalenta Troloxa (TE) po mg suhog tkiva (μ mol TE/mg s.t.) prikazana je na slici 25b. Od četiri ispitivana spoja, najveću i međusobno sličnu antioksidacijsku aktivnost izraženu u postocima inhibicije ABTS radikala pokazali su spojevi CT-A1 (69,9%) i CT-A4 (65,9%). Antioksidacijsko djelovanje spoja CT – A2 (52,7%) bilo je statistički značajno niže u odnosu na CT-A1 i CT-A4. Najnižu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostala tri spoja pokazao je spoj CT-A14 (2,5%). U usporedbi s ispitivanim spojevima, otopina Trolox-a (5mM) pokazala je postotak inhibicije ABTS radikala u iznosu od 99,4%. Antioksidacijska aktivnost izražena u μ mol ekvivalenta Troloxa (TE) je u potpunosti pratila dinamiku promjena aktivnosti ispitivanih spojeva izraženih kao postotak inhibicije ABTS radikala.

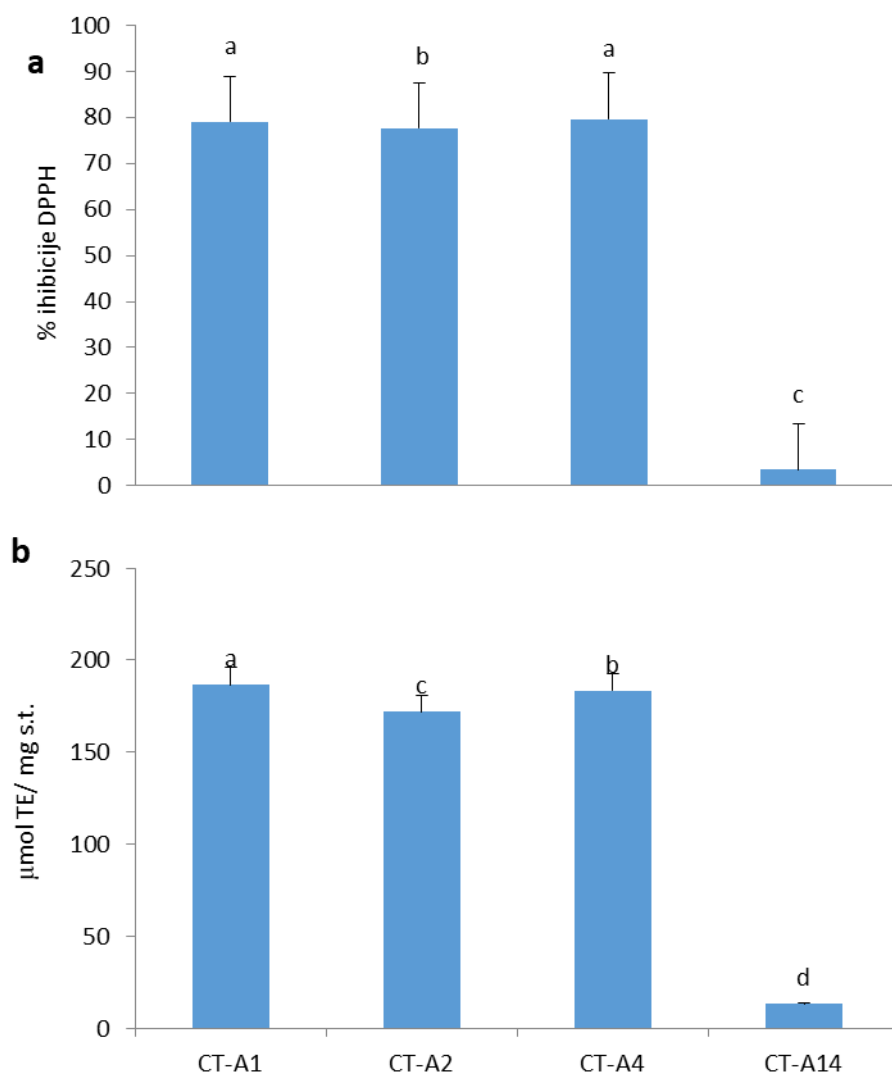


Slika 25. Antioksidacijska aktivnost ispitivanih spojeva (CT-A1, CT-A2, CT-A4 i CT-A14) izražena u: a) postocima inhibicije ABTS radikala i u b) $\mu\text{mol TE/mg s.t.}$. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.3.2. Antioksidacijsko djelovanje – metoda DPPH

Antioksidacijsko djelovanje ispitivanih spojeva izražena u % inhibicije DPPH radikala prikazana je na slici 26a, a ona izražena u μmol ekvivalenta Troloxa (TE) po mg suhog tkiva ($\mu\text{mol TE/mg s.t.}$) prikazana je na slici 26b. Najveću i gotovo identičnu antioksidacijsku aktivnost izraženu u postocima inhibicije DPPH radikala pokazali su spojevi CT-A1 (79,04%) i CT-A4 (79,7%). Iako je spoj CT – A2 (77,6%) pokazao slično antioksidacijsko djelovanje kao prethodno spomenuta dva spoja, iako statistički značajno niže u odnosu na CT-A1 i CT-

A4 . Najnižu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostala tri spoja pokazao je spoj CT-A14 (3,5%). U odnosu na ispitivane spojeve, otopina Trolox-a (5mM) pokazala je postotak inhibicije DPPH radikala u iznosu od 99,4%. Antioksidacijska aktivnost, izražena u μmol ekvivalenta Troloxa (TE), pratila je dinamiku promjena aktivnosti ispitivanih spojeva izraženih kao postotak inhibicije DPPH radikala osim kod spoja CT-A4 gdje se pokazala statistički značajno nižom.



Slika 26. Antioksidacijska aktivnost ispitivanih spojeva (CT-A1, CT-A2, CT-A4 i CT-A14) izražena u: a) postocima inhibicije DPPH radikala i u b) μmol TE/mg s.t.. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.3.3. Pearsonov koeficijent korelacije za antioksidacijske metode

U svrhu određivanja korelacija između antioksidacijske aktivnosti ispitivanih spojeva mjerene različitim metodama izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije i pripadajuće p vrijednosti (Tablica 7). Očito je da antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom pokazuje vrlo snažnu korelaciju s ABTS metodom.

Tablica 7. Matriks Pearsonovog koeficijenta za antioksidacijsko djelovanje ispitivanih spojeva mjereno putem metoda ABTS i DPPH. Crveno označene vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $p < 0,05$.

	%ABTS	mmol TE- ABTS	%DPPH	mmol TE- DPPH
%ABTS	1.000			
mmol TE- ABTS	0.973	1.000		
%DPPH	0.972	0.901	1.000	
mmol TE- DPPH	0.982	0.921	0.998	1.000

4. RASPRAVA

U istraživanju potencijalne protutumorske aktivnosti određenih benzoksantenskih lignana koji ostvaruju interakciju s DNA (Di Micco i sur. 2011) utvrđena je važnost hidroksi grupa vezanih na atome C-6, C-9 i C-10 budući da one stabiliziraju interkaliranje između parova baza. Također je primjećeno da funkcionalne grupe vezane na atome C-1/C-2 imaju značajnu ulogu u vezanju u mali utor. Protutumorska aktivnost benzoksantenskih derivata ispitivana je na tumorskim staničnim linijama jetre (HepG2) i debelog crijeva (SW480) metodama STD – NMR i molekularnim pristajanjem (Di Micco i sur. 2011). Rezultati metode molekularnog pristajanja ukazali su na važnost hidroksi grupa na atomima C-6, C-9 i C-10 za interkaliranje jer stvaranjem vodikovih veza sa gvaninom kao i s anomernim kisikom deoksiriboze povećavaju stabilnost interkalativnog kompleksa. Također, pokazano je da nastavci na atomima C-1/C-2 van der Waalsovima interakcijama u utorima nukleinskih kiselina doprinose dodatnoj stabilnosti kompleksa. Tako je jedan spoj sa hidroksilnim skupinama na položajima C-6, C-9 i C-10 i s fenil etilnim nastavcima na položajima C-1/C-2 inhibirao proliferaciju obje vrste tumora. Dva permetilirana derivata bila su znatno neaktivnija od tog spoja što upućuje na zaključak da su nesupstituirane hidroksilne grupe esencijalne za antiproliferativnu aktivnost. Zanimljivo je da zamjena hidroksilnih skupina (donori vodikovih veza) sa acetiloksi skupinama (akceptori vodikovih veza) nije utjecala na interakciju benzoksantenske jezgre sa DNA modelima. Jedan spoj kojem su nedostajali fleksibilni nastavci na položajima C-1/C-2 nije pokazao antiproliferativnu aktivnost što potvrđuje važnost esterskih nastavaka za tu vrstu aktivnosti.

Budući da je utvrđen utjecaj prisutnosti fleksibilnih nastavaka na interakciju molekula s DNA provelo se daljnje ispitivanje antiproliferativne aktivnosti benzoksantenskih lignana na šest različitih tumorskih staničnih linija (Spatafora i sur. 2014). Rezultati su pokazali da su gotovo svi ispitivani spojevi u određenoj mjeri aktivni protiv jedne ili više vrsta staničnih linija. Najveću antiproliferativnu aktivnost pokazali su lipofilniji spojevi dok su manje lipofilni spojevi, iako metabolički stabilniji, pokazali umjerenu aktivnost. Samo jedan ispitivani spoj, koji je bio najmanje lipofilan, nije pokazao aktivnost. Mikroskopskim pregledom jedne tumorske stanične linije pretpostavljeno je da su stanice bolje apsorbirale dva spoja upravo zbog izraženih lipofilnih svojstava. Zanimljivo je da je jedan derivat pokazao selektivno djelovanje na jednu od šest ispitivanih tumorskih linija iako je bio manje lipofilan od dva gore spomenuta spoja. Analiza molekularnog pristajanja potvrdila je da ispitivani lignani planarnom jezgrom interkaliraju između parova baza DNA dok se fleksibilni

nastavci nalaze na različitim pozicijama, najčešće u utorima DNA, što je u skladu s nalazima dobivenima tehnikom DF-STD.

Zbog toga se pretpostavlja da bi se mogućnost prodiranja benzoksantenskih lignana u stanicu mogla temeljiti više na strukturnim značajkama nego na mogućnosti vezanja nastavaka na atomima C-1/C-2 u utore.

Prije ispitivanja interakcija spojeva s dvolančanim polinukleotidima, bilo je potrebno napraviti spektroskopsku karakterizaciju (UV/Vis, fluorimetrija) benzoksantenskih derivata lignana.. Najprije su uz pomoć UV/Vis spektroskopije određene maksimalne valne duljine apsorpcije spojeva i njihovi molarni ekstinkcijski koeficijenti (Tablica 4). Za svaki spoj utvrđene su dvije maksimalne valne duljine apsorpcije i izračunati pripadajući ekstinkcijski molarni koeficijenti koji se u seriji spojeva malo razlikuju jedni od drugih. To se može objasniti strukturnom sličnošću spojeva koji svi posjeduju – istu benzoksantensku jezgru. Manja strukturna razlika je kod spoja CT – A14 kojem su na atomima C-6, C-9 i C-10 hidroksilne skupine zamijenjene s metoksi skupinama. Može se primjetiti da su vrijednosti molarnih ekstinkcijskih koeficijenata veći pri kraćim maksimalnim valnim duljinama apsorpcije spojeva. Najveće vrijednosti molarnih ekstinkcijskih koeficijenata zamjećene su kod spoja CT – A1. Fluorescencijskom spektroskopijom je utvrđeno da emisijski maksimumi svih spojeva ostaju na istoj valnoj duljini bez obzira na kojoj su maksimalnoj valnoj duljini pobuđeni (Slike 14 i 15). Vrijednosti emisijskih maksimuma spojeva su vrlo bliske što je i očekivano zbog bliskih apsorpcijskih maksimuma. Međutim, razlikuju se intenziteti fluorescencije spojeva gdje su kraće valne duljine pobude spojeva rezultirale jačim intenzitetom fluorescencije od duljih valnih duljina pobude.

U fluorimetrijskim titracijama polinukleotida sa spojevima primjećeno je da spojevi CT – A1 i CT – A14, koji se razlikuju samo u jednoj vrsti supstituenata (-OH grupa i -OCH₃ grupa) koji su vezani na benzoksantenski prsten, uzrokuju suprotne promjene u fluorescenciji nakon interakcije tih spojeva s ispitivanim polinukleotidima (Slike 16 – 18). Dok je spoj CT-A1 u prisutnosti DNA ili RNA uzrokovao povećanje fluorescencije, spoj CT-A14 je uzrokovao njezino smanjenje što se pripisuje donorskim svojstvima metoksi grupa. Najveće konstante stabilnosti (Tablica 5), a prema tome i afinitet prema polinukleotidima pokazao je spoj CT – A14, osobito sa ctDNA i poli (dAdT) · poli (dAdT), nešto manji afinitet prema poli (dGdC) · poli (dGdC), a zatim prema poli A - poli U. Iako je afinitet ovog spoja prema svim polinukleotidima podjednak, može se primjetiti da ima veću selektivnost u vezanju na dvolančanu DNA nego na dvolančanu RNA; i to na AT parove baza. Kod spoja CT – A1 također su zamjećeni visoki afiniteti prema polinukleotidima. Najveći afinitet utvrđen je

prema ctDNA, zatim prema poli A - poli U i poli (dAdT) · poli (dAdT) pokazuje isti afinitet, a najmanji prema poli (dGdC) · poli (dGdC). Za spoj CT – A2 izračunata je najveća konstanta stabilnosti sa poli (dAdT) · poli (dAdT), nešto manja sa poli (dGdC) · poli (dGdC) i ctDNA dok se spoj CT – A4 veže jedino na poli (dGdC) · poli (dGdC). Fluorescencijske promjene s ostalim polinukleotidima bile su premale za precizan izračun konstanti vezanja. Razmatrujući strukturu spojeva, očito je da su feniletalni nastavci na C-1 i C-2 atomu spoja CT – A2 omogućili bolju interakciju s polinukleotidima za razliku od butilnih nastavaka kod spoja CT – A4. Nasuprot tome, ti nastavci omogućili su bolju interakciju s GC parovima baza.

Metodom mekšanja dvolančanih polinukleotida ispitivao se tip interakcije između ispitivanih spojeva i polinukleotida (Slike 19 i 20). Dobiveni rezultati pokazuju da svi spojevi vrlo malo utječu na stabilizaciju miješanih parova baza DNA. Međutim, samo su spojevi CT – A1 i CT – A14 stabilizirali AT parove baza DNA. Nijedan od ispitivanih spojeva nije pokazao nikakav stabilizacijski učinak AU parova baza osim spoja CT – A14 koji je pokazao vrlo malen stabilizacijski efekt.

Metoda cirkularnog dikroizma dala je uvid u konformacijske promjene sekundarne strukture polinukleotida tijekom interakcije sa spojevima (Slike 21 – 24). Rezultati pokazuju da je većina spojeva nakon dodatka polinukleotida neznatno promjenila CD spektre RNA dok je veći utjecaj zamjećen na spektrima DNA. U reakciji s DNA u titracijama s gotovo svim ispitivanim spojevima zamjećen je slabi negativni CD (ICD) signal na valnoj duljini oko 300 nm. Spojevi CT-A1 i CT-A4 pokazali su slabe ICD signale na valnoj duljini oko 400 nm s poli(dAdT) · poli (dAdT), odnosno s poli(dGdC) · poli (dGdC). Za razliku od ostalih spojeva CT-A2 je pokazao značajno povećanje CD spektra s GC parovima baza DNA. Jasna izoeliptična točka zamjećena u titraciji spoja CT-A1 s AT-DNA upućuje na dominantan način vezanja ovog spoja s kiralnom osi DNA. Slab negativan ICD signal, koji je rezultat “paralelne” orijentacije dugačke osi liganda s dugačkom osi susjednih parova baza je čvrsta naznaka interkalativnog načina vezanja. To je dodatno poduprieto umjerenom termičkom stabilizacijom dvolančanog polinukleotida i vrijednostima konstanta vezanja jednakima ili većima od 10 μ M (Tablica 5).

Antioksidacijska aktivnost je vrlo važno i korisno svojstvo spoja budući da se njime uklanjaju slobodni radikali koji mogu biti okidači tumorske aktivnosti. U ljudskom organizmu prisutni su prirodni enzimi, ujedno i antioksidansi, koji sprječavaju nakupljanje reaktivnih spojeva. Ispitivanje postojećih prirodnih lignana kao i sinteza njihovih analoga koji pokazuju

antioksidacijsku aktivnost jedno je od važnijih područja u biokemijskim istraživanjima. U jednom istraživanju s peroksidnim radikalima, benzoksantenski derivat lignana zaštitio je triacilglicerole, ekstrahirane iz suncokretova ulja, od oksidacije zrakom (Spatafora i sur. 2013) s učinkovitošću usporedivom s α -tokoferolom – najaktivnijem lipidno topivom antioksidansu prisutnom u prirodi. Kako bi se detaljnije razjasnila reaktivnost benzoksantenskih derivata s peroksidnim radikalima, provedeno je kinetičko istraživanje tog spoja s ROO^\bullet u dvije otopine – klorbenzenu i acetonitrilu, odabranima upravo zbog različite polarnosti i sposobnosti da prihvate vodikove veze. Rezultati su pokazali da ispitivani spoj u klorbenzenu brzo reagira sa ROO^\bullet prijenosom atoma vodika iz kateholne grupe, s konstantom inhibicije većom od α -tokoferola. Većim dijelom antioksidacijska aktivnost je rezultat upravo svojstva tih hidroksilnih grupa da doniraju vodikov atom, a manje zbog hidroksilne grupe na C-6 atomu koja zbog steričkih smetnji reagira puno sporije. U acetonitrilu, koji je polarniji medij od klorbenzena, ispitivani spoj je pokazao znatno reduciranu reaktivnost zbog formiranja vodikovih veza između reaktivnih hidroksilnih nastavaka kateholne grupe i molekula acetonitrila. U tom slučaju, ispitivani spoj antioksidacijsku aktivnost duguje vodikovom atomu hidroksilne grupe na C-6 atomu. Izuzetno niska entalpija disocijacije te O-H veze kao i opiranje da djeluje kao donor vodikove veze čini ovu grupu značajno reaktivnom, čak i u biološkim bitno polarnijim medijima. Ovo svojstvo može biti korisno u tehnološkim primjenama, mogu se koristiti kao antioksidansi ili fluorescentne probe za otkrivanje slobodnih radikala, za stvaranje lipofilnije benzoksantenske jezgre što se može lako oblikovati izborom odgovarajućih estera kofeinske kiseline.

Antioksidacijska aktivnost ispitivanih spojeva mjerena je metodama ABTS i DPPH koje su pokazale visok stupanj korelacije u ovom istraživanju. Obzirom na razlike između testnih sustava i svojstvima ispitivanih tvari, preporuka je koristiti bar dvije metode u određivanju antioksidacijskog potencijala (Schlesier i sur. 2002). Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazali su spojevi CT-A1 i CT-A4, nešto nižu CT-A2 i najnižu CT-A14 što se može povezati s njihovom strukturom. Preciznije, prema metodi ABTS spoj CT-A1 je pokazao najjaču antioksidacijsku aktivnost, a prema metodi DPPH spoj CT-A2, iako su postotci inhibicije radikala vrlo bliski u obje metode. Antioksidacijsko svojstvo u ova dva spoja temelji se na donorskom svojstvu vodika hidroksilnih grupa na atomima C-9 i C-10, a zatim hidroksilne grupe na C-6 atomu koja zbog steričkih razloga sa slobodnim radikalom reagira sporije. Mogući razlog neznatno nižeg postotka inhibicije spoja CT-A4 (prema metodi ABTS) mogli bi biti dugački butanoatni nastavci na atomima C-1 i C-2 koji ometaju pristup i reakciju sa reaktivnom vrstom. Spoj CT-A2 pokazuje statistički značajno nižu aktivnost u

usporedbi sa spojevima CT-A1 i CT-A4, posebice prema metodi ABTS. U tom slučaju razlog nižoj antioksidacijskoj aktivnosti mogli bi biti fenil etanoatni nastavci na atomima C-1 i C-2 koji također predstavljaju steričku smetnju u reakciji spoja sa radikalom. Spoj CT-A14 je pokazao najnižu antioksidacijsku aktivnost i mali antioksidacijski kapacitet vjerojatno zbog metoksi grupa na pozicijama C-6, C-9 i C-10 koje nisu u mogućnosti donirati vodikov atom i pretvoriti slobodan radikal u manje reaktivnu vrstu što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Moraux i sur. 2017).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata može se zaključiti da su istraživani spojevi interkalirali između polinukleotida i da općenito ostvaruju bolje interakcije s dvolančanim DNA polinukleotidima nego s dvolančanom RNA. Većina spojeva imala je veći afinitet prema AT parovima baza nego prema GC, osim kod spoja CT – A4 koji je pokazao selektivno vezanje na GC-DNA. Rezultati CD spektroskopije pokazali su da je interkaliranje dominantan način vezanja ovih spojeva na polinukleotide. Međutim, prema nekim polinukleotidima spojevi su pokazali vrlo slab ili gotovo nikakav afinitet. U fluorimetrijskim titracijama promjene intenziteta emisije spoja CT – A2 s poli A – poli U bile su premale za izračunavanje konstante stabilnosti. Također, spoj CT – A4 je pokazao slabo vezanje na AU i na AT parove baza.

Antioksidacijska aktivnost istraživanih spojeva, osim CT – A14, bila je relativno visoka u usporedbi sa standardom Trolox-om. Najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazali su spojevi CT – A1 i CT – A4 s postotkom inhibicije radikala između 60 i 70%. Iako je spoj CT – A2 pokazao nešto nižu antioksidacijsku aktivnost od prethodna dva spoja, taj rezultat je također značajan. Dakle, i spoj CT – A2 je dobar antioksidans iako je brzina uklanjanja slobodnih radikala nešto sporija od u usporedbi s CT – A1 i CT – A4. Spoj CT – A14 je pokazao vrlo male postotke inhibicije radikala i u ABTS i u DPPH metodi te se može zaključiti da ima vrlo niski antioksidacijski kapacitet.

Rezultati ovog rada (interakcije s dvolančanim DNA i RNA i antioksidacijska aktivnost) biti će korisni u daljnjim istraživanjima ispitanih spojeva kao što su istraživanje antibakterijske i antitumorske aktivnosti.

6. LITERATURA

Ardalani, H., Avan, A., Ghayour-Mobarhan, M. (2017): Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. **4**: 285 – 294.

Atkins, P., de Paula J. (2006): *Physical Chemistry*, 8th edition. Oxford University Press, Oxford.

Becker, M.M., Nunes, G.S., Ribeiro, D.B., Silva, F.E.P.S., Catanantea, G., Martya, J.-L. (2019): Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **30**:1108-1114.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. Stryer, L. (2007): *Biochemistry*, 6th edition. Freeman and Company, New York.

Cvitaš, T. (1997): *Fizikalna kemija. primjerak za studentsku upotrebu*, Zagreb.

Daquino, C., Rescifina, A., Spatafora, C., Tringali, C. (2009): Biomimetic synthesis of natural and “unnatural” lignans by oxidative coupling of caffeic esters. *European Journal of Organic Chemistry*. **12**: 6289 – 6300.

Di Micco, S., Mazue, F., Daquino, C., Spatafora, C., Delmas, D., Latruffe, N., Tringali, C., Riccio, R., Bifulco, G. (2011): Structural basis for the potential antitumour activity of DNA-interacting benzo[*kl*]xanthene lignans. *Organic & Biomolecular Chemistry* **9**: 701–710.

Crothers D.M. (1968): Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymer. *Biopolymers*. **6**: 575 – 584.

Crothers, D.M. (1971): Theory of friction – limited DNA unwinding. *Biopolymers*. **10**: 2147 – 2160.

Demeunynck, M., Bailly, C., Wilson W.D. (2003): *DNA and RNA Binders*. Wiley-VCH, Weinheim.

- Eriksson, M., Norden, B. (2001): Linear and circular dichroism of drug – nucleic acid complexes. *Methods in Enzymology* **340**: 68 – 98.
- Garbett, N.C., Ragazzon, P.A., Chaires, J.B. (2007): Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand – DNA interactions. *Nature protocols* **2**: 3166 – 3172.
- Germano, M.P., Pasquale, R.D., Valeria, D.A., Catania, S., Silvari, V., Costa, C. (2002): Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 1168 – 1171.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., Price N.C. (2005): How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* **7**: 119 – 139.
- Kucukboyaci, N., Sener, B. (2010): Biological activities of lignans from *Taxus baccata* L. growing in Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*. **12**: 1136 – 1140.
- Lakowicz, J.R. (1999): Principles of fluorescence spectroscopy, 2th edition. Kluwer Academic Publisher, New York.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006): Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 2046-2056.
- Mergny, J-L., Lacroix, L. (2003): Analysis of Thermal Melting Curves. *Oligonucleotides* **13**: 515 – 537.
- Mikulin I. (2011): Ispitivanje interakcija cijaninskih boja s dvolančanim DNA i RNA spektroskopskim metodama. Diplomski rad, Zagreb.
- Morau, T.Dumarçay, S., Gérardin, P., Gérardin-Charbonnier, C. (2017): Derivatives of the lignan 7'-hydroxymatairesinol with antioxidant properties and enhanced lipophilicity. *Journal of Natural Products* **80**: 1783–1790.

Piantanida I. (2003): Interakcija malih molekula s DNA i RNA. *Kemija u industriji* **11**: 542 – 552.

Pine, S.H. (1994): *Organska kemija*. III. promijenjeno stanje izdanje, Školska knjiga, Zagreb.

Pisoschi, A.M., Pop, A., Cimpeanu, C., Predoi, G. (2016) Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: **2016**: 9130976.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 3101 – 3113.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**: 1231-1237.

Rodger, A., Norden B. (1997): *Circular dichroism and linear dichroism*. Oxford University Press, New York.

Saenger W. (1988): *Principles of nucleic acid structure*. Springer, New York.

Scatchard G. (1949): The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **51**: 660 – 664.

Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* 36: 177 – 187.

Skoog, D.A. West, D.M. Hooler, F.J. (1999): *Osnove analitičke kemije*, 1. izdanje. Školska knjiga, Zagreb.

Spatafora, C., Barresi, V., Bhusainahalli, V.M., Di Micco, S., Musso, N., Riccio, R., Bifulco, G., Condorelli, D., Tringali, C. (2014): Bio-inspired benzo[k,l]xanthene lignans: Synthesis,

DNA-interaction and antiproliferative properties. *Organic & Biomolecular Chemistry* **12**: 2686 – 2701.

Spatafora, C., Daquino, C., Tringali, C., Amorati, R. (2013): Reaction of benzoxanthene lignans with peroxy radicals in polar and non-polar media: Cooperative behaviour of OH groups. *Organic & Biomolecular Chemistry* **11**: 4291 – 4294.

Sprecher, C.A., Baase, W.A., Johnson, W.C. Jr. (1979): Conformation and circular dichroism of DNA. *Biopolymers*. **4**: 1009 – 1019.

Teulade-Fichou, M.-P., Vingeron, J.-P., Lehn J.-M. (1995): Molecular recognition of nucleosides and nucleotides by a water-soluble cyclo-bis-intercaland receptor based on acridine subunits. *Supramolecular chemistry* **5**: 139 – 147.

Voet, D., Voet, J.G. (1995): *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Vorlíčková M., Kypr, J., Sklenář, V. (2005): Nucleic acids - Spectroscopic methods. U: *Encyclopedia of Analytical Science*. Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. (Ur.). 2nd edition, Elsevier Inc. **str.** 275 – 277.

N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody (2000): *Circular Dichroism Principles and Applications*. Wiley-VCH: New York.

Wakelin L.P.G. (1986): Polyfunctional DNA intercalating agents. *Med. Res. Rew.* **6**: 275 – 340.

A. Rodger, B. Norden (1997): *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. Oxford University Press: New York.

Slike preuzete sa sljedećih poveznica:

https://s3-us-west-2.amazonaws.com/courses-images/wp-content/uploads/sites/1094/2016/11/03164502/OSC_Microbio_10_02_DoubHelix.jpg

<https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=2ahUKEwjAtbjV8rrkAhWML1AKHfX3Di4QjRx6BAgBEAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.ks.uiuc.edu%2FTraining%2FCaseStudies%2Fpdfs%2Fdna.pdf&psig=AOvVaw18ygsOfJdXnZvatIRcw5qS&ust=1567814542473450>

https://en.m.wikipedia.org/wiki/Intersystem_crossing

<https://hu.m.wikipedia.org/wiki/Jablonski-diagram>

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

- Ime i prezime: Kristina Vidović (rođ. Havliček)
- Datum i mjesto rođenja: 19.12.1994., Sisak, Republika Hrvatska
- E-mail: kristinacek@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- 2013. -2019. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije;
smjer – nastavnički; PMF, Biološki odsjek, Zagreb
- 2009. - 2013. SŠ Tin Ujević, Prirodoslovno – matematička gimnazija,
Kutina
- 2001. – 2009. Osnovna škola Zvonimira Franka, Kutina