

God 6, br. 6 (2019)

ISSN: 2490-2284



KOMORA
MAGISTARA FARMACIJE
TUZLANSKOG KANTONA

ZBORNIK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE TUZLANSKOG KANTONA

ŠESTI SIMPOZIJ:

Antioksidansi značaj i upotreba





Komora magistara farmacije
Tuzlanskog kantona



Farmaceutski fakultet
Univerziteta u Tuzli



Tehnološki fakultet
Univerziteta u Tuzli



Udruženje za nutricionizam i
dijetetiku BiH

ZBORNIK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE
TUZLANSKOG KANTONA

ŠESTI SIMPOZIJ:

„ANTIOKSIDANSI,
ZNAČAJ I UPOTREBA“

Tuzla, 23.03.2019.

KOMORA MAGISTARA FARMACIJE TUZLANSKOG KANTONA

ZBORNİK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE TUZLANSKOG KANTONA
ŠESTI SIMPOZIJ: „ANTIOKSIDANSI, ZNAČAJ I UPOTREBA“

God 6, br. 6 (2019)

ISSN: 2490-2284 (Štamp. izd.)

ISSN 2303-7229 (CD-ROM)

ISSN 2566-4271 (Online)

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNICI:

Dr.sc. Mensura Aščerić (Tuzla, BiH)

mr.ph. Aneda Cipurković (Tuzla, BiH)

POMOĆNIK UREDNIKA:

dipl.iuris. Dragan Nikić (Tuzla, BiH)

NAUČNI SAVJET:

1. Dr.sci. Aščerić Mensura, red. prof. (Tuzla, BiH)
2. Dr.sci. Begić Lejla, red. prof. (Tuzla, BiH)
3. Dr.sci. Čačić Kenjerić Daniela, red. prof. (Osijek, Hrvatska)
4. Dr.sci. Đukić Mirjana, red. prof. (Beograd, Srbija)
5. Dr.sci. Jašić Midhat, red. prof. (Tuzla, BiH)
6. Dr.sci. Šubarić Drago, red. prof. (Osijek, Hrvatska)
7. Dr.sci. Vujić Zorica red. prof. (Beograd, Srbija)
8. Dr.sci. Zovko Končić Marijana, red. prof. (Zagreb, Hrvatska)

UREĐIVAČKI ODBOR:

1. Dr.sci. Ademović Zahida, van. prof. (Tuzla, BiH)
2. Dr.sci. Banjari Ines, doc. (Osijek, Hrvatska)
3. Dr.sci. Begić Aida, doc. (Tuzla, BiH)
4. Dr.sci. Sarić-Kundalić Broza, van. prof. (Beč, Austrija)
5. Dr.sci. Smajić Miralem, doc. (Tuzla, BiH)
6. Dr.sci. Smajlović Aida, van. prof. (Tuzla, BiH)
7. Dr.sci. Šabanović Marizela, doc. (Tuzla, BiH)
8. Dr.sci. Vitali Čepo Dubravka, van. prof. (Zagreb, Hrvatska)

ORGANIZACIONO-PROGRAMSKI ODBOR:

1. mr.ph. Cipurković Aneda (Tuzla, BiH)
2. mr.ph. Mišić Dženita, (Tuzla, BiH)
3. dip.iurus. Nikić Dragan, (Tuzla, BiH)
4. mr.ph. Begić Aida (Tuzla, BiH)

IZDAVAČ:

KOMORA MAGISTARA FARMACIJE
TUZLANSKOG KANTONA
Titova do br. 34, SPO lamela A/II, Tuzla

TEHNIČKA PRIPREMA I DIZAJN:

Adela Bajrić (Tuzla, BiH)

SADRŽAJ / CONTENTS

RIJEČ UREDNIKA.....	5
---------------------	---

IZVORNI ZNANSTVENI/NAUČNI RADOVI

<i>Haris Nikšić, Kemal Durić, Irma Sijamić, Emina Korić, Samija Muratović, Fahir Bečić</i> ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA BILJNIH VRSTA PORODICE LAMIACEAE.....	7
<i>Ermina Cilović, Adelheid Brantner, Huyen Thi Tran, Jelena Arsenijević, Zoran Maksimović</i> ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET EKSTRAKATA TELEKIAE SPECIOSAE (SCHREB.) BAUMG.	17
<i>Emir Horozić, Lamija Kolarević, Amila Zukić, Demir Bjelošević, Zahida Ademović, Broza Šarić Kundalić</i> ISPITIVANJE UTJECAJA RASTVARAČA NA ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST EKSTRAKATA SUHOG SMILJA (HELICHRYSUM ITALICUM).....	25
<i>Aida Smajlović, Emir Imamović, Adaleta Softić, Nahida Srabović</i> IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET PROTEINA I BIOAKTIVNIH PEPTIDA SIROVOG KOZIJEG MLIJEKA	31
<i>Jasmina Gradašćević-Gubaljević, Nahida Srabović, Adaleta Softić, Aida Smajlović, Esmeralda Dautović, Adi Rifatbegović, Adlija Čaušević</i> MALONDIALDEHID (MDA) U KARCINOMU DOJKE I NJEGOVA KORELACIJA SA BROJEM ERITROCITA I KONCENTRACIJOM HEMOGLOBINA.....	37
<i>Aida Begić, Ana Đurić, Mirjana Đukić</i> PROTEKTIVNI EFEKAT DISULFIRAMA NA STATUS JETRE PACOVA NAKON SUBAKUTNE EKSPOZICIJE ETANOLU	43
<i>Jasmina Lukić, Aida Smajlović</i> UTICAJ IN VITRO GLIKACIJE NA STRUKTURU I ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA HUMANOG SERUM ALBUMINA.....	45

STRUČNI RADOVI

<i>Halida Mahmutbegović, Amra Dervišević</i> ANTIOKSIDANSI U BORBI PROTIV OBOLJENJA I STARENJA ORGANIZMA	51
<i>Amer Sarajlić, Miralem Smajić, Amra Džambić</i> MODULIRANJE OKSIDACIJSKIH STANJA FUNKCIONALNIH GRUPA U DIZAJNIRANJU LIJEKOVA	61
<i>Elvedina Trumić</i> ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U NASTANKU DIJABETIČKE NEUROPATIJE I TERAPIJSKI POTENCIJAL ALFA LIPOINSKE KISELINE	71

PREGLEDNI (REVIJALNI RADOVI

<i>Azra Avdić, Marizela Šabanović, Midhat Jašić, Sergije Marković</i> ANTIOKSIDATIVNE OSOBINE PROPOLISA.....	79
<i>Zerina Krličević, Miralem Smajić, Amra Džambić</i> OTKRIVANJE LIJEKOVA U OKSIDOREDUKCIJSKIM I KOVALENTNIM PROCESIMA INHIBICIJE ENZIMA.....	81
<i>Mensura Hodžić, Miralem Smajić, Amra Džambić</i> RAZVOJ LIJEKOVA IZ PRIRODNIH IZVORA U TRETMANU BOLESTI NASTALIH KAO POSLJEDICA OKSIDATIVNOG STRESA.....	91

RIJEČ UREDNIKA

Tema ovogodišnjeg, Šestog simpozijuma magistara farmacije Tuzlanskog kantona je „Antioksidansi, značaj i upotreba“. Tema je odabrana sa namjerom da prikaže ulogu molekula antioksidanasa u oksidativnom stresu kao bitnom faktoru u etiologiji mnogih bolesti današnjice.

Mehanizam djelovanja i učinkovitost antioksidanasa u prevenciji i terapiji degenerativnih bolesti današnjice kao što su kardiovaskularne bolesti, karcinomi, dijabetes ili makularna degeneracija, još uvijek nije sa sigurnošću utvrđen.

Začetnik teorije slobodnih radikala, Denham Harman, pretpostavio je da je starenje posljedica pretjerane produkcije slobodnih radikala. Iz tog razloga je zagovarao uzimanje antioksidanasa kao nosilaca molekula koje mogu sanirati oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima. Kao dokaz tome postoje mnoge studije koje ukazuju da degenerativne bolesti povezane sa starenjem nisu neizbježni rezultat proteklog vremena, nego su upravo povezane s razaranjem nukleinskih kiselina, proteina i strukture stanice izazvanim slobodnim radikalima.

Voće, povrće, cjelovite žitarice, čaj, vino, čokolada, maslinovo ulje i druge namirnice sadrže na stotine antioksidansa, vitamina, minerala i fitohemikalija, koji djeluju sinergistički u borbi protiv štetnih slobodnih radikala. Znanstveno je utemeljeno da redovno konzumiranje hrane bogate antioksidansima djeluje pozitivno na zdravlje.

Na kraju, zahvaljujem se svim autorima radova, recenzentima, uredništvu i ostalim saradnicima zahvaljujući kojima je i omogućeno publiciranje ovog Zbornika.

Prof. Dr.sc. Mensura Aščerić,
Dekan Farmaceutskog fakulteta

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA BILJNIH VRSTA PORODICE LAMIACEAE

Haris Nikšić¹, Kemal Durić¹, Irma Sijamić¹, Emina Korić¹, Samija Muratović¹, Fahir Bečić¹

¹ Univerzitet u Sarajevu, Farmaceutski Fakultet, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, BiH

SAŽETAK

Vrste porodice Lamiaceae su cijenjene ljekovite i aromatične biljke. Upotrebljavaju se protiv različitih upala, stomaćnih problema, kao ekspektoransi, te kao začini. Reaktivni spojevi kisika i oksidativni stres igraju važnu ulogu u etiologiji i progresiji većine degenerativnih bolesti ljudi. Reaktivni spojevi kisika mogu izazvati oksidacijsko oštećenje stanica, tkiva i genetsku mutaciju kada je ravnoteža u organizmu poremećena. Cilj ove studije bio je da se procjeni antioksidativna aktivnost eteričnih ulja biljaka iz divljeg uzgoja u Bosni i Hercegovini: *Lavandula angustifolia* L., *Melisa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis*, L., *Salvia officinalis* i *Thymus vulgaris* L. Eterična ulja izolovana su hidrodestilacijom u aparatu Clevenger. Antioksidativna aktivnost je ispitivana metodom 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazida (DPPH). Eterično ulje iz *Thymus serpyllum* L. pokazalo je najveću antioksidativnu aktivnost ($IC_{50} = 0,017 \pm 0,00 \text{ mg / ml}$), dok je najniža aktivnost utvrđena za ulje *Rosmarinus officinalis* L. ($IC_{50} = 1,21 \pm 0,01 \text{ mg / ml}$) U DPPH testu, redukcijska snaga je smanjena sljedećim redoslijedom: *Thymi aetheroleum* > *Salviae aetheroleum* > *Melissae aetheroleum* > *Lavandulae aetheroleum* > *Rosmarini aetheroleum*. Rezultati dobiveni u ovoj studiji ukazuju na moguću upotrebu eteričnih ulja za liječenje bolesti povezanih sa slobodnim radikalima.

Ključne riječi: antioksidativna aktivnost, DPPH test, eterična ulja, *Lamiaceae*, *Thymus vulgaris* L.

Autor za korespondenciju: doc.dr. Haris Nikšić, docent

Telefon: + 38761/219444

E-mail: haris.niksic@ffsa.unsa.ba

1. UVOD

1.1. Antioksidativna aktivnost - Oksidativni stres

U svakom organizmu postoji ravnoteža između oksidativnog stresa, tj. oštećenja koje radikali i oksidansi izazivaju na površinskim membranama i receptorima i antioksidativne reparacije. Ako izostane antioksidacijska zaštita protiv nastajućih slobodnih radikala, tj. nastupi neravnoteža u korist oksidanasa, može doći do oksidativnog stresa zbog djelovanja određenih toksina.

Dakle, neravnoteža između oksidanasa i antioksidanasa u korist oksidanasa, koja vodi potencijalnom oštećenju, naziva se oksidativni stres. Oksidansi nastaju kao normalan proizvod aerobnog metabolizma, ali mogu

nastati u većim koncentracijama i u patofiziološkim stanjima. Poluravnotežno stanje održava se kompleksnim djelovanjem antioksidanasa. Ova odbrana antioksidansima adaptira se stanjem organizma.

Oksidativni stres se smatra značajnim, ako ne i presudnim faktorom u iniciranju i razvoju mnogih patoloških stanja i bolesti, uključujući upale, autoimune bolesti, kataraktu, tumor, Parkinsonovu bolest, aterosklerozu i starenje. Oksidativni stres ima važnu ulogu u srčanim bolestima, neurodegenerativnim bolestima, tumorima i procesu starenja. Ovu činjenicu potkrepljuje rastući broj dokaza koji indiciraju da oksidativno oštećenje dovodi do razvoja hroničnih degenerativnih oboljenja, povezanih sa starenjem, te da se dijetetski antioksidansi odupiru ovakvom djelovanju i snižavaju rizik od razvoja ovih bolesti (Primiano i sar., 1997).

1.2. Reaktivni spojevi kisika (ROS) i nastanak malignih oboljenja

Oštećenje DNK djelovanjem ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) je jedan od glavnih uzroka raka. Kod pacijenata koji boluju od bolesti povezanih sa rizikom od raka otkriven je povećani stepen oksidativnog oštećenja DNK kao i u nekim oboljenjima sa deficitom obnavljanja ćelija poput Fankonijeve anemije, hroničnog hepatitisa, cistične fibroze i raznih autoimunih bolesti. Mnoge in vivo studije na ljudima podupiru činjenice in vitro eksperimenata da su oksidativna oštećenja DNK važan mutageni i kancerogeni faktor. ROS mogu oštetiti DNK i diobu ćelija dovesti do mutacije. Osim toga, pojedini tipovi ćelija karcinoma proizvode značajne količine ROS. Ipak, istraživanja pokazuju da povećana produkcija slobodnih radikala može biti uzrok, ali ne i dovoljan da inducira rast malignih ćelija (Mimica-Dukić i sar., 2004, Primiano i sar., 1997).

1.3. Slobodni radikali

Slobodni radikali i druge reaktivne vrste kisika: peroksidni radikal-anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\cdot}), hidrogen peroksid (H_2O_2) i lipidne peroksidne radikale, a odnedavno spominje se i okolišni ozon i endogeni ozon, uključeni su u razvojne procese brojnih bolesti, kao što su: astma, tumori, kardiovaskularne bolesti, katarakta, dijabetes, gastrointestinalne upalne bolesti, bolesti jetre, makularna degeneracija, periodontalne bolesti i drugi upalni procesi. Oni doprinose starenju ćelija, mutagenezi, karcinogenezi i koronarnim bolestima srca putem destabilizacije membrana, oštećenja DNK i oksidacije lipoproteina niske gustoće (*LDL*). Te reaktivne vrste kisika nastaju kao normalna posljedica biohemijskih procesa u tijelu, ali i kao rezultat povećanoga izlaganja okolišnim i/ili prehrambenim ksenobioticima. Uopšte, slobodni radikali vrlo su reaktivni i mogu oštetiti lipidnu membranu stvarajući ugljikov radikal koji reaguje s kisikom a nastali peroksidni radikal dalje reaguje s masnim kiselinama stvarajući nove ugljikove radikale. Te lančane reakcije daju peroksidacijske produkte lipida. To znači da pokretanjem lančanih reakcija peroksidacije lipida jedan radikal može oštetiti veliki broj molekula. Upravo zbog potencijalno štetne prirode slobodnih radikala u tijelu postoje različiti antioksidacijski mehanizmi odbrane. Tu spadaju enzimi, proteini, antioksidansi topivi u vodi i u mastima te flavonoidi u ulozi hvatača slobodnih radikala. Djeluju tako što uklanjaju već stvorene slobodne radikale i predstavljaju hvatače slobodnih radikala (Radical scavenger), služe kao donori elektrona, razgrađuju lipid-perokside nastale u fazi propagacije lipidne peroksidacije, djeluju kao hvatači singlet kisika (1O_2), inhibiraju neke enzime, djeluju sinergistički sa drugim antioksidansima, vezuju jone prelaznih metala, a neki od njih inhibiraju i enzimске sisteme koji proizvode ROS (Primiano i sar., 1997; Halliwell, 2006). Od reaktivnih spojeva nitrogen najveću važnost imaju: nitrogen(II) oksid radikal ($NO\cdot$), nitrogen (IV) oksid radikal (NO_2^{\cdot}) i peroksinitrit.

1.4. Antioksidansi

S biološkog stajališta, antioksidansi se definišu kao supstance koje, kada su prisutane u koncentracijama nižim od supstrata, su sposobne usporiti ili inhibirati oksidativne procese.

Generalno, antioksidansi su tvari koje sprečavaju ili usporavaju nastanak oštećenja u organizmu, tačnije štite ćelije od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala.

Postoje dva izvora antioksidanasa: endogeni i egzogeni. Endogeni izvor je ljudski organizam koji sam proizvodi antioksidanse i drugi vanjski, egzogeni, izvor antioksidanasa iz hrane ili lijekova.

Antioksidansi su nehomogena kategorija supstanci i mogu biti sa biološkog aspekta enzimatske i neenzimatske prirode. Ljudski organizam raspolaže sa tri enzimatska, antioksidacijska, odbrambena sistema a to su: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza. Dok neenzimatski antioksidansi uključuju inhibitore enzima koji kataliziraju oksidaciju i metal helirajući spojevi (Halvorsen, 2000).

Iz ovog možemo zaključiti da je zajednička karakteristika svih antioksidanasa, sposobnost stabiliziranja ravnoteže neutralizacijom viška visoko nestabilnih slobodnih radikala dopunjavajući ih sa elektronima u cilju sprečavanja, ili limitiranja lančane reakcije koja bi uzrokovala oštećenje tkiva.

Antioksidansi se dijele i na prirodene i sintetske. U grupu prirodnih antioksidanasa spadaju karotenoidi (β -karoten, likopen i lutein), flavonoidi, vitamini A, C i E, minerali selen i cink, koenzim Q i dr. U sintetske antioksidanse spadaju butilhidroksi anizol (BHT-E320), butilhidreoksi toluen (BHT-E321), propil galat (PG-E310), troloks i tercijarni butilhidrokinon (TBHQ).

U posljednje vrijeme naročita važnost se pridaje prirodnim produktima biljnog porijekla pri čemu se smatraju potencijalnim hemopreventivnim i hemoterapeutskim sredstvima. Tu veliku važnost zauzimaju prirodni produkti sa utvrđenom antioksidativnom aktivnošću koji smanjuju toksičnost u normalnim ćelijama, kao što su polifenoli. Najjednostavniji tip biljnih fenola su flavonoidi koji se nalaze u cvjetovima, obojenom voću i povrću. Do sada je opisano više od 5000 različitih flavonoida a među njima su najznačajniji: antocijanini, flavoni, flavonoli, flavononi, katehini i izoflavoni. Ova prirodna jedinjenja pokazuju snažan antioksidativni učinak i mogu reagovati sa različitim reaktivnim spojevima kisika, te tako spriječiti nastajanje novih vrsta slobodnih radikala (Feng i sar., 2007). Biljne vrste iz porodice Lamiaceae i njihova eterična ulja su značajan izvor prirodnih antioksidanasa sa izuzetnim antioksidativnim svojstvima kao što su karvakrol i timol.

Polifenoli kao antioksidativne supstance djeluju kao reducenti i donori hidrogenovih atoma (Helder i sar., 2006). Treba napomenuti da jedini začim zvanično odobren za upotrebu kao antioksidans u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama je ružmarin. Fenolni spojevi, kao što su: karnozol, karnozolna kiselina, rosmanol, rosmadiol, epirosmanol, rosmadifenol, rosmarininska kiselina se smatraju nosiocima antioksidativne aktivnosti (Kulisic, 2004).

Obzirom na navedene podatke o antioksidativnoj aktivnosti supstanci i produkata biljnog porijekla,

dizajnirana je studija ispitivanja antioksidativnog kapaciteta najznačajnijih eteričnih ulja porodice *Lamiaceae*.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Određivanje sadržaja eteričnih ulja

Dobijanje eteričnih ulja provedeno je iz nadzemnih dijelova biljnih vrsta *Lavandula officinalis*, *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* i *Thimus vulgaris*. Biljni materijal sakupljan je na području Hercegovine po suhom i sunčanom vremenu. Nakon berbe, biljni materijal je sušen u tankom sloju na sobnoj temperaturi. Izolacija i sadržaj eteričnog ulja u drogi urađen je prema farmakopejskom propisu za određivanje sadržaja eteričnih ulja, postupak 1 za eterična ulja lakša od vode. Ovaj tip određivanja eteričnih ulja zasniva se na principu destilacije vodenom parom i pogodan je za izolaciju i određivanje sadržaja eteričnih ulja lakših od vode (*Council of Europe*, 2002).

2.2. Ispitivanje antioksidativnog kapaciteta

DPPH metoda 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikal test (*Radikal Scavenging Activity*)

2.2.1. Priprema DPPH otopine

DPPH (36 mg) odvaže se na analitičkoj vagi i prenese u normalni sud (100 ml) i otopi u heksanu do oznake. Osnovna otopina (90 μM) se čuva na +4 °C zaštićena od svjetlosti. Od osnovne otopine DPPH pripremljena je radna otopina koncentracije 18 μM razblaživanjem 1 ml osnovne otopine DPPH, heksanom, u normalnom sudu od 10 ml.

Nakon pripreme otopine DPPH, snimljen je apsorpcijski spektar na spektrofotometru (UV-VIS Spectronic Genesys 2 Spektrofotometer, USA) korištenjem opcije Spectrum, sa kojeg je očitana valna dužina maksimalne apsorpcije DPPH.

2.2.2. Priprema osnovne i radnih otopina uzorka eteričnog ulja dobivenog iz cvijeta lavande

Eterično ulje iz cvijeta lavande (14,3 mg) otopi se u heksanu u normalni sud (100 ml) do oznake (koncentracija otopine je 143 μg/ml).

Od osnovne otopine uzorka eteričnog ulja cvijeta lavande pripremljena je serija razblaženja koncentracija 0,12; 0,249; 0,495; 0,617 i 0,74 mg/ml.

2.2.3. Priprema osnovne i radnih otopina eteričnog ulja dobivenog iz lista matičnjaka

Eterično ulje iz lista matičnjaka (13,9 mg) otopi se u heksanu u normalni sud (100 ml) do oznake (koncentracija otopine je 139 μg/ml).

Od osnovne otopine eteričnog ulja lista matičnjaka pripremljena je serija razblaženja koncentracija 0,062; 0,122; 0,238; 0,247; 0,547; i 0,617 mg/ml.

2.2.4. Priprema osnovne i radnih otopina eteričnog ulja dobivenog iz lista ruzmarina

Eterično ulje iz lista ruzmarina (15,1 mg) otopi se u heksanu u normalni sud (100 ml) do oznake (koncentracija otopine je 151 μg/ml).

Od osnovne otopine eteričnog ulja lista ruzmarina pripremljena je serija razblaženja koncentracija 0,247; 0,617; 0,86; 1,22 i 2,381 mg/ml.

2.2.5. Priprema osnovne i radnih otopina eteričnog ulja dobivenog iz lista žalfije

Eterično ulje iz lista žalfije (16,1 mg) otopi se u heksanu u normalnom sudu (100 ml) do oznake (koncentracija otopine je 161 μg/ml).

Od osnovne otopine eteričnog ulja lista žalfije pripremljena je serija razblaženja koncentracija 0,00744; 0,0099; 0,0123; 0,0244; 0,0291; 0,0476; 0,0617; 0,086; 0,122 i 0,238 mg/ml.

2.2.6. Priprema osnovne i radnih otopina eteričnog ulja dobivenog iz nadzemnog dijela timijana

Eterično ulje iz nadzemnog dijela (zelen) timijana (15 mg) otopi se u heksanu u normalnom sudu (100 ml) do oznake (koncentracija otopine je 150 μg/ml).

Od osnovne otopine eteričnog ulja zeleni timijana pripremljena je serija razblaženja koncentracija 0,0031; 0,0061; 0,0119; 0,0249 i 0,0617 mg/ml.

2.3. Izvođenje DPPH radikal testa

Otopina DPPH (2 ml, 18 μM) i radna otopina eteričnog ulja (2 ml) se pomiješaju kao radni uzorak. Blank otopina sadrži otopinu DPPH (2 ml 18 μM) i heksan (2 ml). Svi uzorci za mjerenje i blank su ostavljeni na tamnom mjestu 1 sat do uspostavljanja hemijske ravnoteže. Apsorbanca je mjerena na valnoj dužini od 510 nm uz heksan kao slijepu probu na UV-VIS spektrofotometru (UV-VIS Spectronic Genesys 2, USA).

Sposobnost uništavanja radikalne aktivnosti DPPH. testiranih otopina je izražen kao procenat redukcije DPPH. koji je računat po jednačini:

$$PI(\%) = \frac{A_b - A_{uz}}{A_b} \cdot 100;$$

Iz funkcije odnosa PI (%) i odgovarajuće koncentracije određen je IC50 koji predstavlja koncentraciju eteričnog ulja koja dovodi do neutralizacije 50% radikala.

2.4. Reagensi i oprema

Pri izvođenju ove metode korištene su sljedeće supstance i pribor:

- 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (Sigma-Aldrich, Germany)
- Trolox ili 6-hidroksi-2,5,7,8-tetra metilroman-2-karboksilna kiselina, 97% (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Germany)
- Heksan (p.a., Semikem, d.o.o, Sarajevo, Bosna i Hercegovina)

- Spektrofotometar (UV-VIS Spectronic Genesys 2, USA)
- Analitička vaga AX205 Delta Range (Mettler Toledo-Zagreb)
- Normalni sudovi (10, 25, 100ml)
- Laboratorijske čaše
- Pipete
- Špatula
- Kvarcne kivete

2.5. Određivanje antioksidativnog kapaciteta

Antioksidativno djelovanje ispitivanih eteričnih ulja praćeno je mjerenjem njihove sposobnosti da neutrališu ili inhibiraju generisanje stabilnog sintetskog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH[•]).

3. REZULTATI

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti pokazali su da sva eterična ulja dobivena iz ispitivanih biljnih materijala ispoljavaju antioksidativno djelovanje. Grafikoni 3. do 7. pokazuju linearan odnos koncentracije eteričnog ulja i procenta inhibicije DPPH. Antioksidativni kapacitet ispitivanih dobivenih eteričnih ulja izražen je kroz IC_{50} . Različite vrijednosti IC_{50} za ispitivane uzorke ukazuju na različit antioksidativni kapacitet. Rezultati su prikazani u tabeli 1. pokazuju da eterično ulje timijana ispoljava najveći antioksidativni kapacitet (IC_{50} 0,017 mg/ml), nakon kojeg slijedi eterično ulje lista žalfije sa IC_{50} 0,063 mg/ml (4 puta manji antioksidativni kapacitet) i eterično ulje lista matičnjaka sa IC_{50} 1,32 mg/ml (8 puta manji antioksidativni kapacitet). Manji antioksidativni kapacitet

Tabela 1. Procenat neutralizacije DPPH radikala – dobivena eterična ulja cvijeta lavande, listova matičnjaka, ruzmarina i žalfije i timijana

<i>Lavandulae aetheroleum</i>							
Koncentracija (mg/ml)	0,12	0,249	0,495	0,617	0,74		IC_{50}
% inhibicije	11,41	25,86	59,1	73,8	89,83		0,421±0,03
<i>Melissae aetheroleum</i>							
Koncentracija (mg/ml)	0,062	0,122	0,238	0,247	0,547	0,617	IC_{50}
% inhibicije	47,3	49,68	62,98	62,98	90,03	97,9	0,132±0,007
<i>Rosmarini aetheroleum</i>							
Koncentracija (mg/ml)	0,247	0,617	0,86	1,22	2,381		IC_{50}
% inhibicije	12,8	24,85	35,85	47,37	91,56		1,21±0,01
<i>Salviae aetheroleum</i>							
Koncentracija (mg/ml)	0,00744	0,0291	0,0617	0,086	0,122	0,238	IC_{50}
% inhibicije	37,61	42,46	50,39	54,81	63,25	89,21	0,063±0,01
<i>Thymi aetheroleum</i>							
Koncentracija (mg/ml)	0,0031	0,0061	0,0119	0,0249	0,0617		IC_{50}
% inhibicije	37,76	38,55	48,43	59,5	92,24		0,017±0,00

IC_{50} za trolox iznosio je 1,41 μ mol odnosno 0,353 mg/ml

Rezultati mjerenja antioksidativnog učinka prikazani su na grafikonima od 1 do 5 i tabeli 1. Praćena je kinetika hemijske reakcije svih supstanci u prisutnosti DPPH[•], te iz dobivenih krivih odnosa koncentracije ispitivanih supstanci i apsorbance DPPH zaostalog nakon uspostavljanja ravnoteže, određene su vrijednosti IC_{50} . Vrijeme za uspostavljanje stanja ravnoteže utvrđeno je praćenjem kinetike hemijske reakcije, na osnovu pada apsorbance DPPH u vremenu, pod uticajem eteričnog ulja.

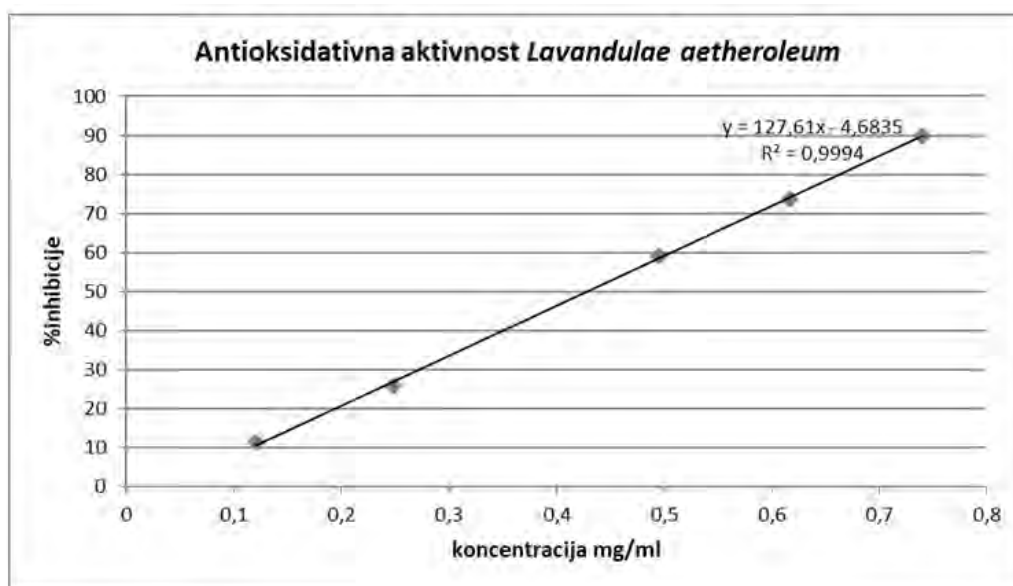
pokazala su eterična ulja cvijeta lavande sa IC_{50} 0,421 mg/ml i lista ruzmarina IC_{50} 1,21 mg/ml. Poredeći antioksidativni kapacitet eteričnog ulja timijana kao naj snažnijeg i eteričnog ulja lista ruzmarina kao naj slabijeg antioksidansa dobivamo podatak da je 70 puta veći kapacitet eteričnog ulja timijana u neutralisanju slobodnih radikala u odnosu na eterično ulje lista ruzmarina što se može vezati za prisustvo velikog procenta fenolnih komponenti (timola i karvakrola) zastupljenih u eteričnom ulju timijana koji su nosioci

antioksidativne aktivnosti. Oksidovani monoterpeni terpeni (α i β -tujoni, bornol acetat i kamfor) su nosioci antioksidativnog djelovanja eteričnog ulja žalfije. Eterično ulje lista matičnjaka je također pokazalo jak antioksidativni učinak sa IC_{50} 0,132 mg/ml, a kao nosioci antioksidativnog djelovanja izdvajaju se monoterpeni aldehydi i ketoni (citrali i citronelal), te mješavina mono- i seskviterpeniskih ugljikovodonika u prvom redu β -kariofilen. Kao najznačajniji nosilac antioksidativnog djelovanja eteričnog ulja lavande izdvaja se linalil acetat ispred monoterpeniskih alkohola linalola, borneola i drugih. Slabiji antioksidativni

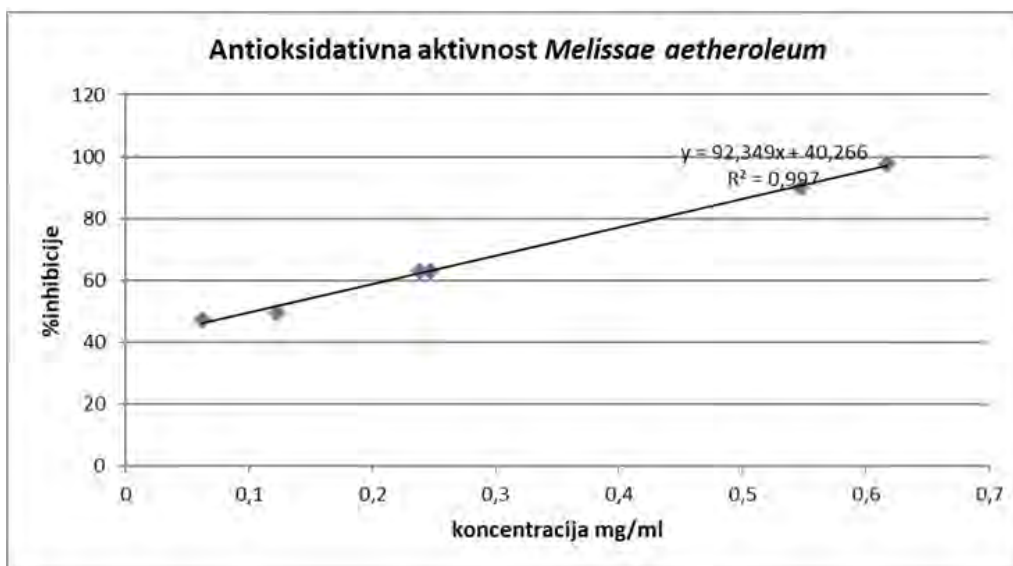
kapacitet eteričnog ulja ruzmarina povezan je sa manjim procentom alkoholnih komponenti i frakcije seskviterpena, a nosilac najvećeg dijela antioksidativnog djelovanja potiče od 1,8-cineola.

4. DISKUSIJA

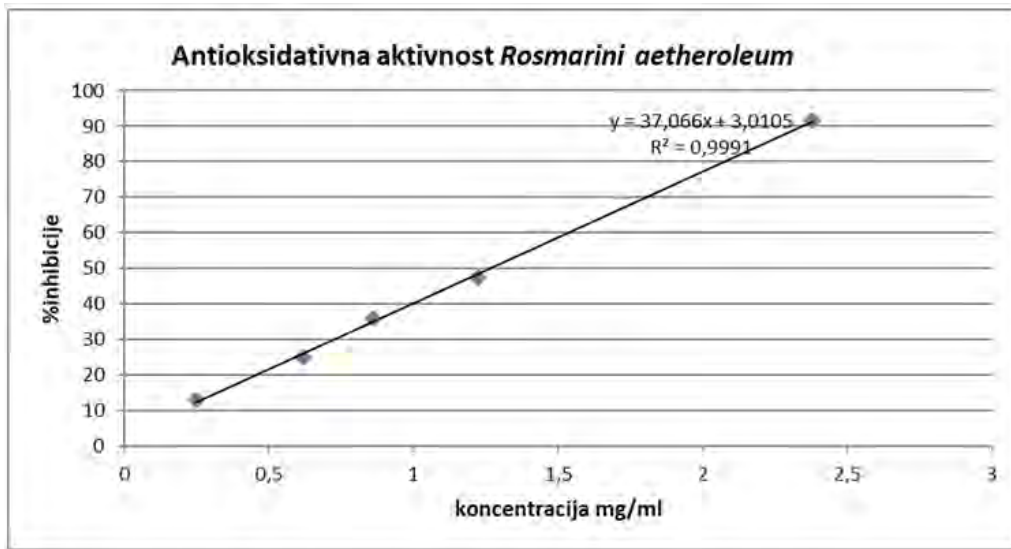
Biljke se od davnina upotrebljavaju kao prirodna ljekovita sredstva, začini i korigenski mirisa i ukusa, a od nedavno se njihov veliki potencijal očituje u savremenoj farmaceutskoj, ali i u prehrambenoj industriji (Wilkinson,



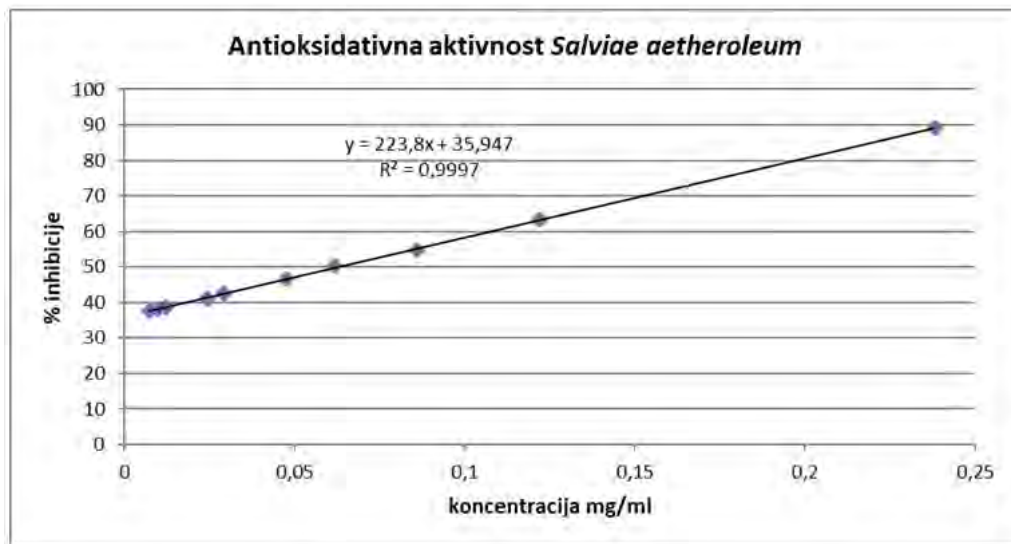
Grafikon 1. Procenat neutralizacije DPPH radikala – eterično ulje dobiveno iz cvijeta lavande



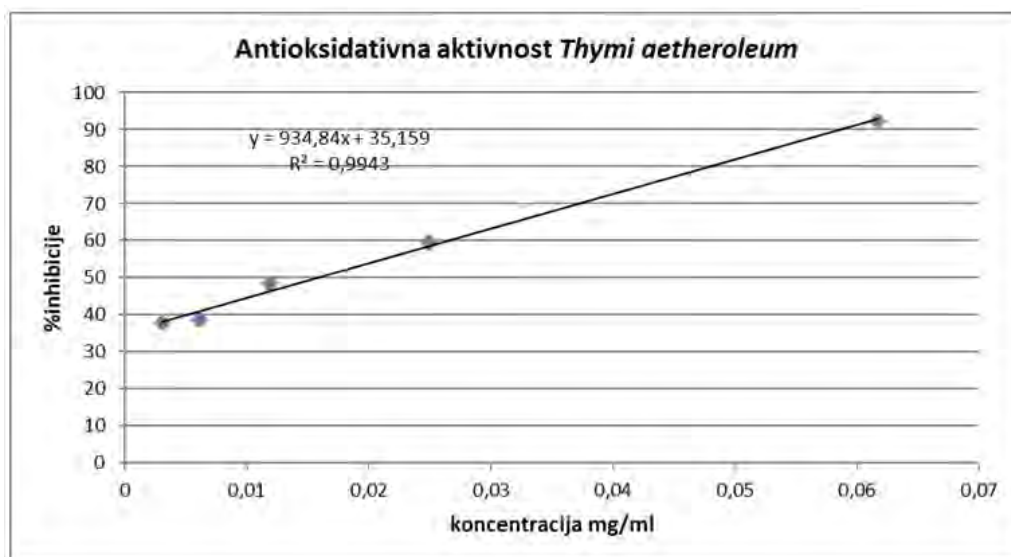
Grafikon 2. Procenat neutralizacije DPPH radikala - eterično ulje dobiveno iz lista matičnjaka



Grafikon 3. Procenat neutralizacije DPPH radikala - eterično ulje dobiveno iz lista ruzmarina



Grafikon 4. Procenat neutralizacije DPPH radikala - eterično ulje dobiveno iz lista žalfije



Grafikon 5. Procenat neutralizacije DPPH radikala - eterično ulje dobiveno iz timijana

1998; Diplock i sar., 1998). Poznato je da većina začinskih biljaka ispoljava značajnu antimikrobnu aktivnost, ali veliki broj publikacija ukazuje i na njihovo snažno antioksidativno djelovanje, pa mnoge od njih mogu poslužiti kao alternativa sintetskim antioksidantima i aditivima (Madsen i Bertelsen, 1995; Božin i Mimica-Dukić, 2006). Antioksidativni potencijal biljnih proizvoda i čistih spojeva može se odrediti primjenom analitičkih metoda. Prvi korak u određivanju antioksidativnog kapaciteta je odabir adekvatne metode kojom će se dobiti uporedivi rezultati. Jedna od najčešće korištenih metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta eteričnih ulja je DPPH metoda kojom se mjeri sposobnost vezivanja slobodnih radikala. Primjenom DPPH testa praćena je sposobnost ispitivanih eteričnih ulja da djeluju kao donori vodikovog H atoma ili elektrona stabilnim DPPH radikalima, uz transformaciju ljubičasto obojenog radikalskog oblika (DPPH•) u reducirani, žuto obojeni oblik DPPH-H. Iako 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) predstavlja sintetski radikal koji u prirodi ne postoji, rezultati istraživanja koja se baziraju na sposobnosti njegovog prevođenja u neutralni oblik (DPPH-H) djelovanjem određenih uzoraka eteričnih ulja mogu se koristiti kao preliminarni pokazatelj antioksidativnog djelovanja i kao takvi iskoristiti u definisanju aktivnosti u kombinaciji sa rezultatima dobivenim nekim drugim metodama. Sva ispitana eterična ulja su reducirala stabilni ljubičasti DPPH• radikal u reducirani žuti DPPH-H, dosegnuvši 50% smanjenja izraženih kao IC_{50} vrijednost. Rezultati izračunati na osnovu spektrofotometrijskog očitavanja neutralizacije DPPH• uzorcima ispitivanih uzoraka prikazani su kao IC_{50} su tabeli 1. i grafikonima 1. do 5. Iz prikazanih % neutralizacije vidi se da su svi ispitivani uzorci eteričnih ulja ispoljili sposobnost redukcije DPPH radikala do žuto obojenog DPPH-H, u opsegu od 11,41 do 97,90%. Kod svih eteričnih ulja uočljiva je koncentracijska ovisnost, a kod većine je poslije postignutog maksimuma neutralizacije DPPH radikala došlo ili do pada "skevindžer" aktivnosti ili do stagnacije. Kao najjači antioksidativni agens pokazalo se eterično ulje timjana (IC_{50} 0,017mg/ml), nakon kojeg slijedi eterično ulje lista žalfije (IC_{50} 0,063mg/ml) i lista matičnjaka (IC_{50} 0,132mg/ml) koje posjeduju jače antioksidativno djelovanje od standarda troloksa (0,353 mg/ml). Eterično ulje cvijeta lavande (IC_{50} 0,421mg/ml) također je pokazalo snažno antioksidativno djelovanje, dok je nešto slabiji antioksidativni kapacitet pokazalo eterično ulje lista ruzmarina (IC_{50} 1,21mg/ml). Ovi rezultati su u korelaciji sa ranije objavljenim podacima (Mimica-Dukić i sar., 2004; Kelen i Tepe, 2008; Dastmalchi sar., 2008). Nekoliko istraživanja je pokazalo povezanost između antioksidativne aktivnosti i hemijskog sastava eteričnih ulja. Kao što je očekivano, fenolni hidroksilni spojevi, kao što su timol i karvakrol, uglavnom su odgovorni za antioksidativno djelovanje eteričnog ulja timijana.

Opsežnu studiju koja poredi antioksidativni kapacitet i mogući mehanizam djelovanja proveli su Ruberto i Baratta na više od 100 čistih isparljivih komponenti eteričnih ulja (Ruberto i Baratta, 2000). Oni su utvrdili da su osim fenolnih spojeva (karvakrol, timol, eugenol i metil kavikol) i nekih monoterpenki ugljikovodika kao što su, terpinolen α i γ -terpinene također pokazali vrlo jaku aktivnost u poređenju s α -tokoferolom. Spojevi koji su odgovorni za

neutralizaciju DPPH radikala u eteričnom ulju timijana su karvakol koji je ujedno i najjači antioksidans, timol i γ -terpinen (Lee i sar., 1999). Osim pomenutih spojeva, nekoliko monoterpenkih ketona (tujon, kamfor i verbenon) i aldehida (citronelal, neral i geranial) su se pokazali kao snažni hvatači slobodnih radikala, koji su izolovani iz različitih vrsta porodice Lamiaceae. Prisutnost aldehidnih komponenti koje čine 50% sastava ulja u prvom redu citronelala, nerala i geraniala u eteričnom ulju lista matičnjaka objašnjavaju izrazito jako antioksidativno djelovanje, koje je dodatno pojačano antioksidativnim djelovanjem β -kariofilena.

U eteričnom ulju lista žalfije dokazana je prisutnost velikog procenta monoterpenkih ketona α i β -tujona i kamfora (preko 50%) koji su razlog njegovog vrlo visokog antioksidativnog kapaciteta. Za razliku od eteričnog ulja lista žalfije (IC_{50} 0,063mg/ml) eterično ulje lista ruzmarina je sadržavalo manji procenat ketona što je i rezultiralo nižim antioksidativnim kapacitetom (IC_{50} 1,21mg/ml). Veliki antioksidativni kapacitet monoterpenkog alkohola linalola i njegovog estera linalil acetata dokazan je u mnogim predhodnim ispitivanjima, kojima je utvrđeno prisustvo u ispitivanom eteričnom ulju cvijeta lavande (linalol 38% i linalil acetat 12%). Oba spoja imaju etilidien grupu, koja ulazi u reakcije sa slobodnim radikalima i formira stabilne tercijarne alil slobodne radikale koji prekidaju lančane reakcije oksidacije i objašnjavaju visok antioksidativni kapacitet ispitivanog ulja lavande (Mimica-Dukić i sar., 2004).

Međutim, u nekim drugim biološkim ispitivanjima linalol pokazuje pro-oksidativnu aktivnost. To se pripisuje oksidaciji hidroksilne grupe na trećem atomu ugljika, što za posljedicu ima gubitak antioksidativne aktivnosti. U prilog ovoj pretpostavci ide činjenica da linalil acetat bez slobodne hidroksilne grupe na C-3 zadržava antioksidativni kapacitet. (Ruberto i Baratta, 2000; Larson, 1997).

Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti ispitivanih eterična ulja ukazuju na značajan antioksidativni kapacitet. Konkretno, eterična ulja pokazala su visoku sposobnost neutralisanja slobodnih radikala, za koje je utvrđeno da su u korelaciji sa sadržajem oksigeniranih fenolnih monoterpena, naročito karvakrola i timola. Također, vrlo jaku aktivnost su ispoljila eterična ulja sa većim sadržajem monoterpenkih alkohola (eterično ulje cvijeta lavande), aldehida (eterično ulje lista matičnjaka) i ketona (eterično ulje lista žalfije). Prema tome, primjena ispitivanih eteričnih ulja ili njihovih aromatskih monoterpenkih komponenti mogu biti korisne sirovine u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, s obzirom na ispoljeni visoki antioksidativni kapacitet.

5. ZAKLJUČAK

Ispitivana eterična ulja porodice *Lamiaceae* ispoljila su vrlo visok antioksidativni kapacitet izražen kroz vrijednost IC_{50} u rasponu od 0,017-1,21mg/ml.

Prema antioksidativnom kapacitetu svrstavamo ih u dvije grupe: grupa izrazito jakih antioksidanasa gdje spadaju eterična ulja timijana (IC_{50} =0,017), žalfije (IC_{50} =0,063) i matičnjaka (IC_{50} =0,132), te grupa srednje jakih antioksidanasa gdje spadaju ostala dva eterična ulja:

lavande ($IC_{50}=0,421$) i ruzmarina ($IC_{50}=1,21$). Rezultati ukazuju da porodica Lamiaceae kao potencijalni izvor prirodnih antioksidansa predstavlja vrlo dragocjenu i značajnu biljnu sirovinu za izolaciju eteričnih ulja. Farmakološki učinci eteričnih ulja matičnjaka, timijana i lavande izraženog antioksidativnog djelovanja ukazuju na veliki potencijal kao mogućih supstituenata za nove lijekove u prevenciji i tretmanu kardiovaskularnih i malignih oboljenja.

6. LITERATURA

Božin B, Mimica-Dukić N, Simin N, Anackov G (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem* 54:1822-1828

Council of Europe (2002) European Pharmacopoeia. 4th ed., Strasbourg Cedex, France, Vol. 2.8.12,183-184.

Diplock AT, Charleux JL., Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M et al (1998) Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Brit J Nutr* 80:77-S112

Dastmalchi K, Dorman H, Oinonen P, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R (2008) Chemical composition and in vitro antioxidant activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Sci Technol* 41:391-400

Feng R, Wang S, Tourkova J, Shurin M, Harada H (2007) Cyanidin-3-rutinoside, A natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cell by induction of oxidative stress. *The J Biol Chem* 282(18):13468-13476

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97(6):634-1658

Helder F, Feitosa J (2006) Antioxidant activity of cashew nut shell liquid (CNSL) derivatives on the terminal oxidation of synthetic cis-1,4 polysoprene. *J Braz Chem Soc* 17:2.

Halvorsen B, Holte K, Myhrstad M, Barikmo I, Hvattum E, Remberg S et al (2002) A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr* 132(3):461-471

Kelen M, Tepe B (2008) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresour Technol* 99:4096-4104

Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M (2004) Use of different methods for the testing activity of oregano essential oil. *Food Chem*, 85:633-640

Lee S E, Lee H S, Ahn Y J (1999) Scavenging Effect of Plant-Derived Materials on Free Radicals and Active Oxygen Species. *Agric Chem Biotechnol* 7:155-159

Larson R (1997) *Naturally Occurring Antioxidants*. 1st ed. Lewis Publishers, Boca Raton, New York

Lindberg Madsen H, Bertelsen G (1995) Spices as antioxidants. *Trends Food Sci Technol* 6(8):271-277

Mimica-Dukić N B, Božin, Soković, M, Simin N (2004) Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J Agric Food Chem* 52:2485-2489

Primiano T, Sutter T, Kensler T (1997) Redox regulation of genes that protect against carcinogens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem Mol Biol* 118(3):487-497

Ruberto G, Baratta M (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem* 69:167-174

Wilkinson J (1998) The potential of herbal products for nutritional pharmaceutical development. In: Fifth Annual Conference Functional Foods.

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS
FROM THE PLANTS OF THE LAMIACEAE FAMILY****Haris Nikšić¹, Kemal Durić¹, Irma Sijamić¹, Emina Korić¹, Samija Muratović¹, Fahir Bečić¹**¹ University of Sarajevo, Faculty of Pharmacy, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, BiH**ABSTRACT**

Species in the family *Lamiaceae* are praised medicinal and aromatic plants. They are used against various inflammations, stomach problems, as expectorant, as well as spices. Reactive oxygen species and oxidative stress play an important role in the etiology and progression

of major human degenerative diseases. Reactive oxygen species can induce oxidative damage associated with cellular damage, tissue injury and genetic mutation when the equilibrium is disrupted. The aim of the present study was to evaluate the antioxidant activity of essential oils from wild growing herbs in Bosnia and Herzegovina: *Lavandula angustifolia* L., *Melisa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis*, L., *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* L. The essential oils were isolated by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus. Antioxidant activity was examined by the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method. Essential oil from *Thymus serpyllum* L. exhibited the highest antioxidant activity (IC₅₀=0,017±0,00mg/ml), while the lowest activity was determined for *Rosmarinus officinalis* L. oil (IC₅₀=1,21±0,01 mg/ml). In the DPPH assay, the reducing power decreased in the following order: *Thymi aetheroleum* > *Salviae aetheroleum* > *Melissae aetheroleum* > *Lavandulae aetheroleum*>*Rosmarini aetheroleum*. Results obtained in this study suggest the possible use of the essential oils for treating disease related to free radicals.

Key words: antioxidant activity, DPPH assay, essential oils, *Lamiaceae*, *Thymus vulgaris* L.

Corresponding author: Haris Nikšić, PhD, Ass. Professor

Phone: + 38761/219444
E-mail: haris.niksic@ffsa.unsa.ba

**ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET EKSTRAKATA
TELEKIAE SPECIOSAE (SCHREB.) BAUMG****Ermina Cilović¹, Adelheid Brantner², Huyen Thi Tran²,
Jelena Arsenijević³, Zoran Maksimović³**¹ Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina² Odjel za farmakognoziju, Institut farmaceutskih nauka, Univerzitet u Gracu, Universitaetsplatz 4/I, 8010 Grac, Austrija³ Odjel za farmakognoziju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Originalni naučni rad

SAŽETAK

Telekia speciosa (Schreb.) Baumg., porodica Asteraceae se tradicionalno koristi kao lijek za bronhijalnu astmu u zemljama Balkanskog poluostrva. Cilj istraživanja je da se odredi ukupan sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova i korijena *T. speciosae* sakupljene u ljeto i jesen 2015. godine na Karauli, Olovo, Bosna i Hercegovina (BiH) te da se analiziraju fenolne kiseline u pomenutim ekstraktima.

Za određivanje ukupnog sadržaja fenola i *in vitro* antioksidativnog kapaciteta u ekstraktima, korištene su spektrofotometrijske metode. Fenolne kiseline su analizirane pomoću RP-HPLC metode.

Ukupan sadržaj fenola za *T. speciosa* ekstrakte je bio od 28,84 do 146,06 mg galne kiseline po g ekstrakta. IC_{50} vrijednosti su bile od 112,57 do preko 800,00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dok su se FRAP vrijednosti kretale od 189,31 do 1329,56 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ po g ekstrakta. Sadržaj hlorogenske kiseline je bio od 26,80 do 968,80 mg po 100 g ekstrakta.

Ekstrakti korijena *T. speciosae* imali su statistički značajno veći antioksidativni kapacitet u poređenju sa nadzemnim dijelovima biljke dok je antioksidativni kapacitet ekstrakata sakupljenih u ljeto statistički značajno veći u odnosu na ekstrakte sakupljene u jesen. Statistički značajna razlika u sadržaju hlorogenske kiseline u ekstraktima nadzemnog dijela i korijena *T. speciosae* između ljeta i jeseni može se objasniti razlikom u temperaturi, različitom stepenu vlage i deponovanju aktivnih supstanci u korijenu tokom zimskog perioda.

Koliko nam je poznato, hemijski sastav korijena kao i antioksidativni kapacitet ekstrakata *T. speciosae* do sada nisu istraživani. Hlorogenska kiselina prisutna u ekstraktima daje mogućnost za dalja ispitivanja i širu primjenu *T. speciosae* zbog njenog različitog farmakološkog djelovanja.

Ključne riječi: antioksidativni kapacitet, *Telekia speciosa*, hlorogenska kiselina (CGA)

Autor za korespondenciju: Ermina Cilović, mr.sc. viši asistent
Mobitel: +38761408288
E-mail: ermina.cilovic@untz.ba

UVOD

Slobodni radikali koji nastaju u spoljašnjoj sredini kao posljedica jonizujućeg ultravioletnog i toplotnog zračenja, biohemije nitrogenovih oksida, „singletnog“ oksigena i reaktivnih komponenti smoga, imaju značajnu ulogu u nizu

fizioloških procesa u organizmu (Lesjak, 2011). Slobodni radikali lako reaguju gotovo sa svim biološkim molekulama dovodeći do oštećenja niza ćelijskih sistema i funkcija. Reaguju sa lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama, dovodeći do njihove oksidativne modifikacije (Pavičić i sar., 2009). Oksidativni stres koji oni uzrokuju povezan je sa nastankom karcinoma, starenjem, aterosklerozom i sa

neurodegenerativnim oboljenjima kao što su Parkinsonovo i Alzhajmerovo oboljenje (Shikov i sar., 2011).

Antioksidativni sistem zaštite ljudskog organizma od slobodnih radikala uključuje enzimske i neenzimske antioksidanse. Enzimski antioksidansi su: superoksid dizmutaza, glutacion peroksidaza i katalaza, a neenzimski askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), glutation, karotenoidi i fenolni spojevi (Kukrić i sar., 2013). Antioksidansi redukuju oksidativni stres u ćelijama i stoga se koriste u liječenju mnogih oboljenja kod čovjeka, uključujući karcinom, kardiovaskularne bolesti i inflamatorne bolesti. Prema porijeklu oni mogu biti prirodni i sintetski.

U literaturi je objavljeno da dvije trećine svjetske biljne populacije posjeduje ljekovito djelovanje (Krishnaiah i sar., 2011). Visoki antioksidativni potencijal porodice Asteraceae, koji je dokazan u ranijim istraživanjima, je naglašen. Od ranije je poznato da prisustvo fenolnih spojeva doprinosi antioksidativnom kapacitetu biljnih ekstrakata. Dakle biljke porodice Asteraceae koje obiluju fenolnim spojevima identifikovane su kao izvori prirodnih antioksidanasa sa potencijalnom primjenom u medicini i farmaciji, te u kozmetičkoj industriji i industriji hrane (Bessada i sar., 2015).

Telekia speciosa (Schreb.) Baumg., porodica Asteraceae raste na vlažnim i sjenovitim mjestima u planinskim šumama. Višegodišnja je biljka sa naizmjeničnim, širokim, cijelim listovima i velikim heterogenim glavicama koje dolaze pojedinačno ili u grupama (Slika 1). Rasprostranjena je u istočnoj i centralnoj Evropi i na Balkanskom poluostrvu (Chalcat i sar., 2004).

Korijen *T. speciosae* se tradicionalno koristi kao lijek za bronhijalnu astmu u zemljama Balkanskog poluostrva. Sadrži etarsko ulje, gorke spojeve i inulin (Marković i sar., 2010). Fitohemijska istraživanja predstavljaju *T. speciosa* kao bogat izvor seskviterpenskikh laktona, naročito u korijenu (Radulović i sar., 2010). Ekstrakti nadzemnih dijelova sadrže masne kiseline, pod imenom palmitinska,

linoleinska, oleinska i kaproična kiselina (Orhan i Sener, 2003). Pseudogvajanolid (2,3-dihidroaromaticin) i tri derivata timola su izolovani kao glavni sekundarni metaboliti iz nadzemnih dijelova metanolnog ekstrakta *T. speciosae*. U ranijim istraživanjima su izolovani određeni derivati fenolnih kiselina iz ekstrakta cvjetova *T. speciosae*. Od izolovanih spojeva jedan je derivat ferulne, a pet derivati kafeine kiseline (Stojakowska i sar., 2015).

Cilj ovog istraživanja je da se odredi ukupan sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet ekstrakata nadzemnih dijelova i korijena *T. speciosae* sakupljene u ljeto i jesen 2015 godine na Karauli, Olovo, Bosna i Hercegovina (BiH) te da se identifikuju i kvantifikuju određene fenolne kiseline u pomenutim ekstraktima.

MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

Nadzemni dio i korijen *T. speciosae* je sakupljen na određenom lokalitetu na planinskom prevoju Karaula, opština Olovo, BiH tokom perioda cvjetanja biljke u julu 2015. godine i nakon cvjetanja biljke u oktobru 2015. godine. Geografske koordinate mjesta sakupljanja su N44°10'22.3" i E18°38'58.6". Biljni materijal je identifikovan korištenjem knjige Flora Hrvatske (Domac, 2002) od strane autora. Reprezentativni uzorci su pohranjeni na Odjelu za farmakognoziju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Tuzli. Biljni materijal je očišćen isitnjen i osušen.

2.2. Reagensi i hemikalije

Svi korišteni reagensi su analitičke čistoće. Fenolni Folin-Ciocalteu reagens, natrijum karbonat, bezvodni natrijum acetat i željezo (III) hlorid su dobiveni iz Merka (Njemačka). Acetonitril i mravlja kiselina HPLC čistoće su takođe dobiveni iz Merka. Voda za HPLC je dobivena pomoću Milli-Q sistema za prečišćavanje vode. Metanol,



Slika 1. *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. nadzemni dio - lijevo i korijen – desno (vlastita fotografija)

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), željezo (II) sulfat heptahidrat, hloridna kiselina, glacijalna sirćetna kiselina te fenolne kiseline HPLC čistoće: hlorogenska, kafena, elagna, galna i o-kumarna su dobivene iz Sigma - Aldrich (SAD). Rutin i ferulna kiselina su dobiveni iz Karl Roth-a (Njemačka).

2.3. Biljni ekstrakti

Osušeni biljni materijal je samljeven u mlinu do forme praška. Uzorci su ekstrahovani sa 98% metanolom na magnetnoj mješalici pod povratnim hladilom na temperaturi 50 °C 1 sat. Smjese su filtrirane kroz filter papir (Watman br. 1). Metanol je uklonjen isparavanjem. Osušeni ekstrakti su čuvani u frižideru na 4 °C, u staklenim bočicama za dalja ispitivanja.

2.4. Ukupan sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet

Ukupan sadržaj fenola je određen pomoću Folin Ciocalteu spektrofotometrijske metode (Gokbulut i sar., 2013). *In vitro* antioksidativni kapacitet je ispitivan pomoću 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal eseja (Mensor i sar., 2001) i željezo reducirajućeg antioksidativnog potencijala (FRAP) (Pavičić i sar., 2009).

2.5. HPLC analiza

HPLC analiza ekstrakata (3 mg/ml u metanolu) je urađena pomoću Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, SAD) sistema opremljenog sa Agilent 1260 Infinity kvaternarnom pumpom, Agilent 1260 Infinity standardnim autosemplerom, Agilent 1260 Infinity diodnim detektorom i Agilent 1260 Infinity termostatiranim odjelom za kolonu. Analiza je urađena na Merck LiChroCARTR250-4 C18 RP analitičkoj koloni (250 x 4,6mm i.d., 5µm). Mobilna faza se sastojala od 0,1% mravlje kiseline u vodi (rastvarač A) i acetonitrila (rastvarač B). Sljedeći gradijent je primjenjen: 0-15 min, linearni gradijent od 10% to 20% B; 15-30 min, linearni gradijent od 20% to 30% B; 30-35 min, linearni gradijent od 30% to 40% B; 35-40 min, linearni gradijent od 40% to

90% B; 40-45 min, povratak na početne uslove. Injekcioni volumen je bio 10 µl, protok 0,8 ml/min. Talasna dužina za detekciju je bila 325 nm i temperatura kolone je postavljena na 30 °C (Tran, 2013). Identifikacija komponenata je urađena poredeći njihova retencionna vremena i UV spektre sa retencionim vremenima i UV spektrima dobivenim za standarde. Kalibraciona kriva za hlorogensku kiselinu je dobivena pomoću metode eksternog standarda u koncentracionom rasponu 15,6-500 µg/ml uz jednačinu pravca $y=28,93x-220,2$, $R^2=0.9996$.

2.6. Statistička analiza

Sva mjerenja su rađena u triplikatu. Rezultati su predstavljani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija i analizirani pomoću programa IBM SPSS Statistics 21. Analiza varijanse (ANOVA) uz Tukey-ev test je korištena za provjeru uticaja biljnog dijela i godišnjeg doba na antioksidativni kapacitet. Nivo $p < 0,05$ je korišten kao kriterij za statističku značajnost.

REZULTATI

3.1. Prinosi ekstrakata *T. speciosae*

Prinosi metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova i korijena *T. speciosae* sakupljene u ljeto i jesen na Karauli, Olovo su predstavljani u Tabeli 1.

3.2. Rezultati ukupnog sadržaja fenola i antioksidativnog kapaciteta ekstrakata *T. speciosae*

Rezultati ukupnog sadržaja fenola određenih pomoću Folin Ciocalteu eseja i antioksidativnog kapaciteta određenog pomoću DPPH i FRAP eseja u *T. speciosa* ekstraktima su predstavljani u tabeli 2. Između analiziranih ekstrakata najveći antioksidativni kapacitet imao je ekstrakt korijena *T. speciosae* sakupljen u ljeto.

IC_{50} za rutin korišten kao standard u DPPH eseju je bio 12,42 µg ml⁻¹ i FRAP vrijednost za askorbinsku kiselinu korištenu kao standard je bila 7,41 x 10³ µmol Fe²⁺ g⁻¹ ekstrakta.

Tabela 1. Prinosi metanolnih ekstrakata *Telekia speciosae*

Metanolni ekstrakti	prinos (%) ^a - ljeto	prinos (%) ^a – jesen
<i>T. speciosa</i> nadzemni dio	5,03±0,20	5,59±0,17
<i>T. speciosa</i> korijen	12,46±0,90	17,38±1,11

^a srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (n=3)

Tabela 2. Ukupan sadržaj fenola, IC_{50} i FRAP vrijednosti metanolnih ekstrakata *T. speciosae*

Metanolni ekstrakti	Ukupan sadržaj fenola (mg GAE g ⁻¹ ekstrakta) ^a	IC_{50} (µg ml ⁻¹) ^a	FRAP µmol Fe ²⁺ g ⁻¹ ekstrakta ^a
TSH_SK	48,95±3,08	686,47±15,10	328,11±6,33
TSR_SK	146,06±0,78	112,57±4,47	1329,56±11,77
TSH_AK	28,84±9,80	>800	189,31±8,54
TSR_AK	99,61±4,56	227,97±6,50	906,11±21,00

TSH_SK = *T. speciosa* nadzemni dio ljeto Karaula, TSR_SK = *T. speciosa* korijen ljeto Karaula, TSH_AK = *T. speciosa* nadzemni dio jesen Karaula, TSR_AK = *T. speciosa* korijen jesen Karaula, GAE = ekvivalenti galne kiseline, ^a srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (n=3)

3.3. Sadržaj hlorogenske kiseline u *T. speciosa* ekstraktima

T. speciosa ekstrakti su analizirani na određene fenolne kiseline pomoću RP-HPLC metode. Hlorogenska kiselina i derivati kafene kiseline su prisutni u ekstraktima. Kafena kiselina i druge referentne supstance korištene u analizi (galna kiselina, o-kumarinska kiselina, ferulna kiselina, elagna kiselina i rutin nisu detektovane.

Sadržaj hlorogenske kiseline u *T. speciosa* ekstraktima je predstavljen na slici 2. Između analiziranih ekstrakata najveći sadržaj hlorogenske kiseline je pronađen u ekstraktu korijena *T. speciosae* sakupljenog u jesen sa $968,8 \pm 90$ mg hlorogenske kiseline po 100 g ekstrakta.

Uzevši u obzir najveći sadržaj hlorogenske kiseline u ekstraktu korijena *T. speciosae* sakupljenog u jesen, njegov HPLC hromatogram je predstavljen kao reprezentativni hromatogram (Slika 3).

Na hromatogramu (Slika 3) osim hlorogenske kiseline sa retencionim vremenom 9,497 min, derivati kafene kiseline sa retencionim vremenima 22.192 min, 22.445 min, 24.674 min, 25.428 min, 35.616 min i 37.687 min su također prisutni.

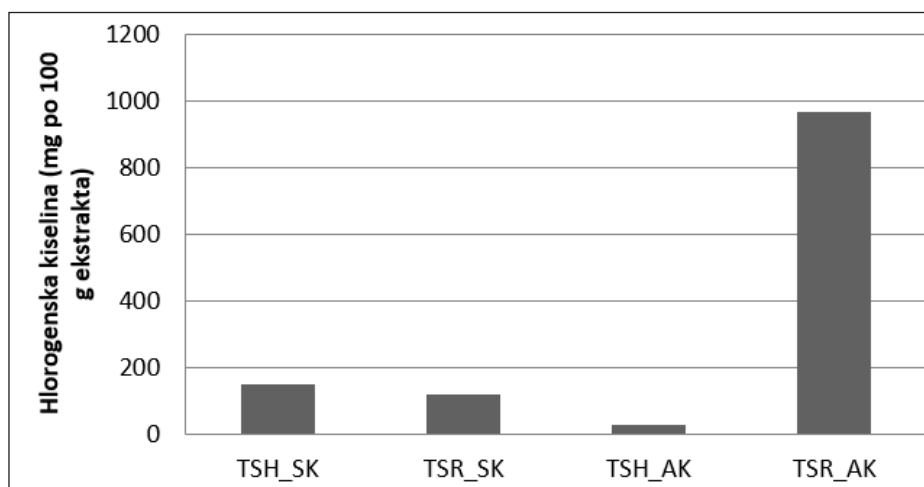
3.4. Statistička analiza rezultata

Postoji statistički značajna razlika u antioksidativnom kapacitetu izraženom kao IC_{50} između ekstrakata korjena i nadzemnog dijela *T. speciosae*; $F(1,17) = 114,664$; $p < 0,001$.

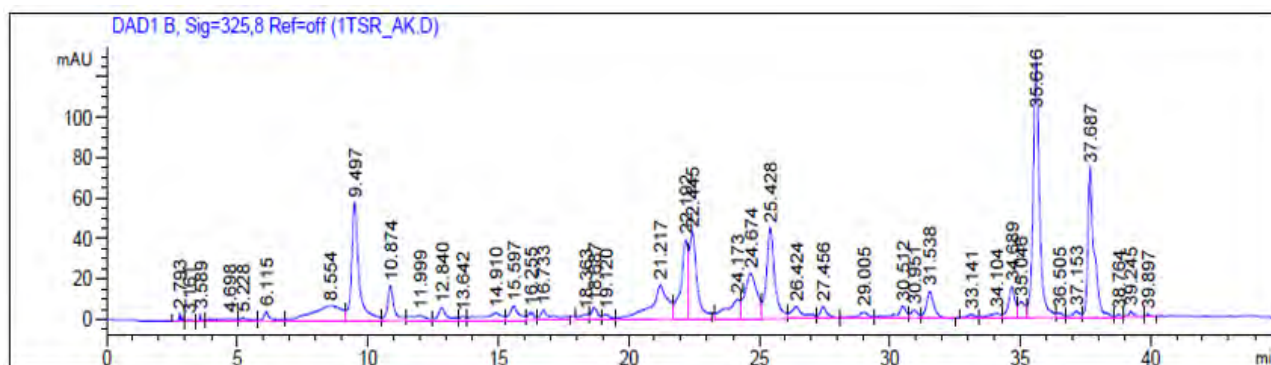
Isto tako postoji statistički značajna razlika u antioksidativnom kapacitetu izraženom kao FRAP između ekstrakata korjena i nadzemnog dijela *T. speciosae*; $F(1,12) = 97,164$; $p < 0,001$. Veći antioksidativni kapacitet ima korijen u odnosu na nadzemni dio biljke.

Postoji statistički značajna razlika u antioksidativnom kapacitetu izraženom kao IC_{50} [$F(1,8) = 233,115$; $p=0,001$] i kao FRAP [$F(1,5) = 485,154$ i $p=0,001$] kod ekstrakata korjena *T. speciosae* između ljeta i jeseni. Isto tako postoji statistički značajna razlika u antioksidativnom kapacitetu izraženom kao IC_{50} [$F(1,8) = 11,018$; $p=0,013$] i kao FRAP [$F(1,6) = 54,907$ i $p=0,001$] kod ekstrakata nadzemnog dijela *T. speciosae* između ljeta i jeseni. Veći antioksidativni kapacitet imaju ekstrakti sakupljeni u ljeto nego u jesen.

Postoji statistički značajna razlika u sadržaju hlorogenske kiseline između ekstrakata korjena i nadzemnog dijela *T. speciosae* u ljeto $F(1,5) = 10,352$; $p < 0,05$ i u jesen $F(1,5) = 124513,19$; $p < 0,001$. Veći sadržaj hlorogenske kiseline je u nadzemnom dijelu u ljeto i u korjenu u jesen.



Slika 2. Sadržaj hlorogenske kiseline u *T. speciosa* ekstraktima (TSH_SK = *T. speciosa* nadzemni dio ljeto Karaula, TSR_SK = *T. speciosa* korijen ljeto Karaula, TSH_AK = *T. speciosa* nadzemni dio jesen Karaula, TSR_AK = *T. speciosa* korijen jesen Karaula)



Slika 3. HPLC hromatogram ekstrakta korijena *T. speciosae* sakupljenog u jesen na Karauli ($\lambda = 325$ nm)

Postoji statistički značajna razlika u sadržaju hlorogenske kiseline između ljeta i jeseni u ekstraktima korjena [F(1,5) = 8574,457; p=0,001] i nadzemnih dijelova [F(1,5) = 1386,355; p=0,001] *T. speciosae*.

DISKUSIJA

Veći prinos imali su ekstrakti korijena u odnosu na nadzemne dijelove i to dva i po do tri i po puta. Razlog je veći sadržaj fenolnih spojeva u korijenu u odnosu na nadzemni dio biljke koji se ekstrahuju pomoću polarnog otapala (metanola).

Koliko nam je poznato, podaci o antioksidativnom kapacitetu *T. speciosa* ekstrakata do sada nisu objavljeni zbog čega je pomoću DPPH i FRAP eseja ispitan njihov antioksidativni kapacitet. Ekstrakti korijena *T. speciosae* imali su statistički značajno veći antioksidativni kapacitet u poređenju sa ekstraktima nadzemnih dijelova biljke dok je antioksidativni kapacitet ekstrakata sakupljenih u ljeto statistički značajno veći u odnosu na ekstrakte istih biljnih dijelova sakupljenih u jesen.

Antioksidativni kapacitet ekstrakta korijena *T. speciosae* sakupljenog u ljeto bio je šest puta manji u odnosu na askorbinsku kiselinu (vitamin C) i deset puta manji u odnosu na rutin. S obzirom da je analiziran biljni ekstrakt, a ne čista supstanca dobiveni rezultati imaju značajan antioksidativni potencijal. Dobiveni rezultati za ukupan sadržaj fenola, IC_{50} i FRAP vrijednosti potvrdili su od ranije dobro poznatu pozitivnu korelaciju između ukupnog sadržaja fenola i antioksidativnog kapaciteta.

U literaturi nisu pronađeni podaci o fenolnim kiselinama u korijenu i nadzemnim dijelovima *T. speciosae* osim nekoliko derivata fenolnih kiselina iz ekstrakta *T. speciosa* cvjetova. Hlorogenska kiselina je prisutna u svim analiziranim ekstraktima. U dosadašnjim studijama je objavljeno da ona pokazuje širok spektar farmakoloških aktivnosti uključujući antioksidativnu, anti-gojaznu, anti-edematoznu i analgetsku aktivnost (Cho i sar., 2010; Santos i sar., 2006).

Ekstrakti nadzemnih dijelova *T. speciosae* sakupljene u ljeto imaju statistički značajno veći sadržaj hlorogenske kiseline u poređenju sa ekstraktima nadzemnih dijelova sakupljenih u jesen. To se može objasniti nižom temperaturom i većom vlagom u jesen u odnosu na ljeto što oštećuje biljku, a samim tim i aktivne supstance u njoj.

Ekstrakti korjena *T. speciosae* sakupljene u jesen imaju statistički značajno veći sadržaj hlorogenske kiseline u poređenju sa ekstraktima korjena sakupljenog u ljeto. To se može objasniti deponovanjem aktivnih supstanci u korjenu tokom hladnog zimskog perioda.

ZAKLJUČCI

Antioksidansi imaju veliki značaj i primjenu u prevenciji i terapiji različitih oboljenja te u industriji hrane i u kozmetičkoj industriji. Pod stresom naš organizam proizvodi više reaktivnih oksigenovih vrsta nego enzimskih i neenzimskih antioksidanasa. Stoga, istraživanje novih antioksidanasa naročito iz prirodnih izvora ima veliki značaj i nalazi svoje mjesto u naučnim radovima.

Korijen biljke *T. speciosae*, koja je rasprostranjena na području BiH i ima tradicionalnu primjenu u terapiji bronhijalne astme, zbog dobrog antioksidativnog kapaciteta se može koristiti kao antioksidans u industriji i u svakodnevnom životu. Ekstrakti ove biljke imaju veći antioksidativni kapacitet u ljeto nego u jesen što je važno prilikom njenog sakupljanja i korištenja u terapijske, ali i u druge svrhe.

Koliko nam je poznato, hemijski sastav korijena kao i antioksidativni kapacitet ekstrakata *T. speciosae* do sada nisu istraživani. Hlorogenska kiselina prisutna u korijenu biljke koji je sakupljen u jesen, daje mogućnost za dalja ispitivanja i širu primjenu *T. speciosae* zbog brojnih farmakoloških djelovanja hlorogenske kiseline.

LITERATURA

- Bessada S M F, Barreira J C M and Oliveira M B P P (2015) *Asteraceae species* with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Ind Crop Prod* 76: 604-615 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.073>
- Chalchat C J, Maksimovic Z and Petrovic S (2004) Isoalantolactone, the principal constituent of the essential oil from underground parts of *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg., *Asteraceae*. *Arh farm 1-2*: 15-23
- Cho A, Jeon S and Kim M (2010) Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol* 48: 937-943
- Domac R (2002) *Flora Croatia*. School Book, Zagreb
- Gokbulut A, Ozhan O, Satilmis B et al (2013) Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Phenolic Compounds of Selected *Inula species* from Turkey. *Nat Prod Commun* 8(4): 475-478
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprod Process* 89: 217-233
- Kukrić Z, Jašić M, Samelak I (2013) Biohemija hrane biološki aktivne komponente. Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet Banja Luka; Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet Tuzla
- Lesjak M (2011) Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. (*Cupressaceae*). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet
- Marković M, Matović M, Pavlović D et al (2010) Resources of medical plants and herbs collector's calendar of Pirot Country (Serbia). *Biol Nyssana* 1(1-2): 9-21
- Mensor L L, Menezes F S, Leitao G G et al (2001) Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*. 15: 127-130
- Orhan I and Sener B (2003) Comparative fatty acid analysis of *Telekia speciosa*. *Chem Nat Compd* 39(3): 244-245
- Pavičić S, Kukrić Z, Topalić-Trifunović Lj et al (2009) Antioksidativna i antimikrobna aktivnost *Reynoutria japonica*. *Hem. Ind.* 63(5): 427-432
- Radulović N, Blagojević P, Palić R et al (2010) Volatiles of *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. (*Asteraceae*) from Serbia. *Journal of Essential Oil Research* 22: 250-254

ZBORNİK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE TUZLANSKOG KANTONA
ŠESTI SIMPOZIJ: „ANTIOKSIDANSI, ZNAČAJ I UPOTREBA“

Santos M D, Almeida M C, Lopes N P et al (2006) Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull* 29: 2236-2240

Shikov A, Lazukina M, Pozharitskaya O et al (2011) Pharmacological evaluation of *Potentilla alba* L. in mice: Adaptogenic and central nervous system effects. *Pharm Biol.* 1-6

Stojakowska A, Malarz J, Zylewski M et al (2015) Acylated hydroxycinnamic acid glucosides from flowers of *Telekia speciosa*. *Phytochem Lett* 12: 257-261

Tran T H (2013) Isolation of main components and method development for quantification of flower buds of *Lonicera japonica*. Master's degree, Department of Pharmacognosy, University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh city, Vietnam.

Zahvala

Ovo istraživanje je finansijski podržano od strane Fondacije za stipendiranje Republike Austrije (Grant No.ICM-2016-03154).

**ANTIOXIDATIVE CAPACITY OF
TELEKIA SPECIOSA (SCHREB.) BAUMG. EXTRACTS****Ermina Cilović¹, Adelheid Brantner², Huyen Thi Tran², Jelena Arsenijević³, Zoran Maksimović³**¹Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina²Department of Pharmacognosy, Institute of Pharmaceutical Sciences, University of Graz,
Universitaetsplatz 4/I, 8010 Graz, Austria³Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia*Original scientific paper***ABSTRACT**

Telekia speciosa (Schreb.) Baumg., family Asteraceae is traditionally used as a remedy for bronchial asthma in Balkan countries. The aim of the present study was to determine the total phenol content and the antioxidant capacity of the methanol extracts from the aerial parts and the roots of *T. speciosa* collected in the summer and the autumn 2015, at Karaula, Olovo, Bosnia and Herzegovina (BiH) and to analyse the phenolic acids in the mentioned extracts. Spectrophotometric methods were used for the determination of the total phenol content and in vitro antioxidant capacity of the extracts. Phenolic acids were analysed using the RP-HPLC method.

The total phenol content for *T. speciosa* extracts was from 28.84 to 146.06 mg gallic acid per g extract. IC_{50} values were from 112.57 to more than 800.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ while FRAP values were from 189.31 to 1329.56 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ per g extract. Chlorogenic acid content was from 26.80 to 968.80 mg per 100 g extract.

Extracts of *T. speciosa* roots had significantly higher antioxidant capacity in comparison to the aerial parts while the antioxidant capacity of the extracts collected in the summer was significantly higher in comparison to the extracts collected in the autumn. Statistically significant difference in the chlorogenic acid content in *T. speciosa* aerial parts and roots extracts between summer and autumn can be explained by a difference in temperature, a different degree of humidity and storing active principles in the root during the cold days.

As we know, the chemical composition of the root and the antioxidant capacity of *T. speciosa* extracts were not investigated by now. Chlorogenic acid presented in the extracts gives the opportunity for further investigations and additional application of *T. speciosa* because of its many pharmacological activities.

Keywords: antioxidant capacity, *Telekia speciosa*, chlorogenic acid (CGA)

Corresponding author: Ermina Cilović, M. Pharm. teaching assistant

Phone: +38761408288

E-mail: ermina.cilovic@untz.ba

ISPITIVANJE UTJECAJA RASTVARAČA NA ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST EKSTRAKATA SUHOG SMILJA (*HELICHRYSUM ITALICUM*)

Emir Horozić¹, Lamija Kolarević², Amila Zukić²,
Demir Bjelošević², Zahida Ademović¹, Broza Šarić Kundalić²

¹ Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, BiH

² Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, BiH

Autor za korespondenciju: Emir Horozić, MA, asistent

Kontakt telefon: +387 61 026 160
E-mail adresa: emir.horozić@untz.ba

SAŽETAK

Smilje (*Helichrysum italicum*) je ljekovita biljka čija eterična ulja sadrže supstance sa antibakterijskim, antigljivičnim i protuupalnim djelovanjem. Cvjetovi i listovi ove biljke su njeni najčešće korišteni dijelovi, prvenstveno u tretmanu alergija, prehlada, kašlja, oboljenja kože, jetre, mokraćnog mjehura. Cilj ovog rada je ispitati utjecaj organskih rastvarača na ekstrakciju biološki značajnih komponenti iz suhog smilja primjenom DPPH i FRAP metode. Rezultati su pokazali da metanol i etanol ekstrahuju najviše biološki aktivnih komponenata iz suhog smilja poslije 14 dana maceriranja. Najslabiji antioksidativni kapacitet pokazali su petroleterški i dihlormetanski ekstrakti.

Ključne riječi: suho smilje, DPPH, FRAP, organski rastvarači

1. UVOD

Helichrysum italicum je zimzelena biljka, koja pripada porodici *Asteraceae*, a porijeklo vodi iz mediteranskog područja. Izgled biljke prikazan je na slici 1. Od starih vremena, ekstrakti i eterična ulja iz nadzemnih dijelova ove biljke se koriste u tradicionalnoj medicini kao lijekovi (Guinoiseau i sar., 2013). Odavno se koristi u tradicionalnoj medicini zbog svojih protuupalnih, antimikrobnih i antioksidacijskih svojstava (Mastelić i sar., 2005).

Usljed raznolikosti specijaliziranih metabolita, *Helichrysum italicum* posjeduje širok spektar bioloških aktivnosti, ali najčešće prijavljene tradicionalne upotrebe povezane su uz respiratorne, probavne i kožne upalne procese (Antunes Viegas i sar., 2014; Maksimović et al., 2017). Tradicionalna upotreba je posebno zabilježena u Italiji, Španiji, Portugalu te Bosni i Hercegovini. Cvjetovi i listovi ove biljke su njeni najčešće korišteni dijelovi, prvenstveno u tretmanu alergija, prehlada, kašlja, oboljenja kože, jetre, mokraćnog mjehura (Antunes Viegas i sar., 2014). U mediteranskom području, čaj od cvjetova



Slika 1. Izgled smilja

Helichrysum italicum tradicionalno se koristi za liječenje probavnih, trbušnih i intestinalnih problema, što se povezuje sa dokazanim antispazmolitičkim djelovanjem ove biljne vrste (Rigano i sar., 2013). *Helichrysum italicum* je biljka bogata flavonoidima i terpenima, pa posjeduje antiinflamatornu i antialergijsku aktivnost (Facino i sar., 1990, Sala i sar., 2002). Među velikim brojem fitoprodukata izoliranih iz *Helichrysum* vrste, eterično ulje ima jednu od najvažnijih bioloških uloga (Staver i sar., 2018). Eterično ulje ove vrste prisutno je u svim zelenim dijelovima biljke. Vrlo je složenog hemijskog sastava s brojnim monoterpenskim i seskviterpenskima spojevima složenih struktura (Mastelić i sar., 2005). Eterično ulje ove vrste se može koristiti za regeneraciju kože i zacjeljivanje rana (Voinchet i Giraud-Rober, 2007). Nekoliko etnobotaničkih podataka prijavilo je upotrebu eteričnog ulja kao parazitnog eliminatora za životinjsku upotrebu (Rivera i sar., 2008). Biohemijski sastav eteričnog ulja *Helichrysum italicum* je već poznat (esteri 24-66%, uključujući neril acetat 20-62%; monoterpeni približno 24%; ketoni 15-22%, uključujući dione 11-20% i druge) (Rottenburg, 2015). Dokazana je antimikrobna aktivnost protiv Gram pozitivnih bakterija te inhibitorni efekat na rast bakterije *Staphylococcus aureus*, kao i na djelovanje njenih enzima koagulaze, dezoksiribonukleaze, termonukleaze i lipaze (Nostro i sar., 2001). *Helichrysum italicum* je također djelotvoran protiv multirezistentnih sojeva *S. aureus*, zahvaljujući heterodimernim floroglucinolima, što potvrđuje primjenu njegovih ekstrakata u prevenciji infekcija rana (Tagliatalata-Scafati i sar., 2013). Pronađeno je da su derivati floroglucinola i acetofenona ekstrahirani iz nadzemnih dijelova *Helichrysum italicum* aktivni protiv različitih vrsta *Penicilliuma* (Tomás-Barberán i sar., 1990).

2. MATERIJAL I METODE

Donirano smilje prikupljeno je sa iste lokacije u Splitu. Uzorci su sušeni na sobnoj temperaturi i čuvani u eksikatoru do početka analize.

2.1. Priprema ekstrakata

Ekstrakti suhog smilja pripremljeni su maceracijom u različitim organskim rastvaračima (metanol, etanol, aceton, hloroform, petroleter i dihlormetan). 15 grama suhog smilja prebačeno je u tikvice od 250 mL u koje je potom

dato 150 mL rastvarača. Smjesa je miješana 14 dana na sobnoj temperaturi nakon čega je vršeno filtriranje i analiza antioksidativnog kapaciteta dobijenih ekstrakata. Izgled ekstrakata poslije 14 dana maceracije prikazani su na slici 2.

2.2. DPPH metoda

Za svaki uzorak ekstrakta napravljena je serija odgovarajućih razblaženja. U svaku epruvetu je dodane odgovarajuće zapremine uzorka (orjentaciono od 1000 do 10 μ L, zavisno od uzorka), nakon čega su epruvete dopunjene do 2 mL sa metanolom. U svaku od epruveta potom je dodano 500 μ L 0,5 mM rastvora DPPH i uzorci su ostavljeni na inkubaciju 30 minuta u zatamljenom prostoru, na sobnoj temperaturi. Absorbanca je mjerena na 517 nm uz metanol kao slijepu probu. 500 μ L 0,5 mM rastvora DPPH razblaženog sa 4 mL metanola predstavljao je kontrolu. Inhibicija DPPH radikala izračunata je prema jednačini:

$$I(\%) = \frac{A_k - A_x}{A_k} \cdot 100$$

pri čemu je A_k - absorbanca kontrole a A_x - absorbanca uzorka.

2.3. FRAP metoda

Za izradu kalibracione krive pripremljeni su rastvori $FeSO_4 \cdot x \cdot 7H_2O$, u rasponu koncentracija od 200-1000 μ mol/L. U 5 epruveta odmjeren je po 3 mL FRAP reagensa i njima dodano 0.1 mL standardnih rastvora. Apsoabanca je mjerena u odnosu na slijepu probu (3 mL FRAP reagensa i 0,1 mL vode). U svrhu analize uzoraka u svaku epruvetu je dodano po 0.2 mL razblaženog ekstrakta i 6 mL FRAP reagensa. Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu 30 minuta na 37 °C nakon čega je mjerena absorbanca na 593 nm u odnosu na slijepu probu (6 mL FRAP reagensa i 0.2 mL metanola).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Dobijene vrijednosti antioksidativnog kapaciteta ekstrakata suhog smilja dobijenih DPPH metodom prikazani su u tabeli 1.

Na osnovu rezultata dobijenih DPPH metodom, najveći antioksidativni kapacitet imaju metanolni i etanolni

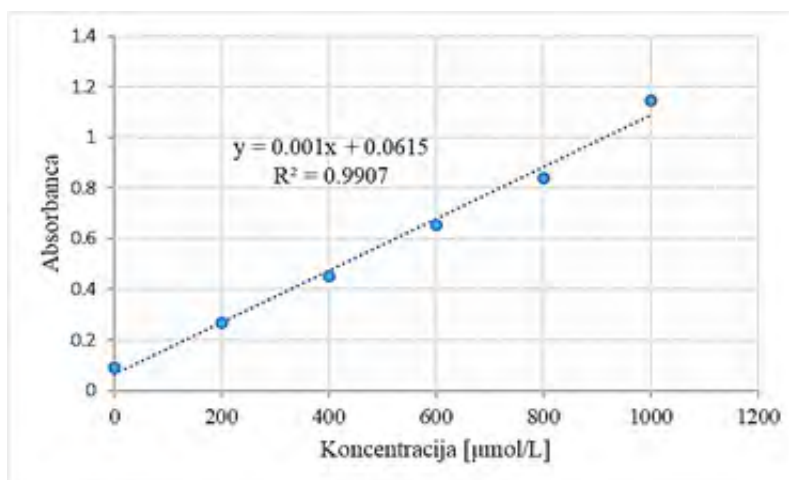


Slika 2. Izgled ekstrakata poslije maceracije

Tabela 1. Rezultati antioksidativnog kapaciteta dobijenih DPPH metodom

Ekstrakt	Met-OH	Et-OH	ACTN	DCM	PE	CF	Vit. C
IC ₅₀ [mg/mL]	0,1447	0,1667	0,5557	1,3600	1,3100	1,2336	0,0052

Met-OH - metanolni ekstrakt; Et-OH - etanolni ekstrakt; ACTN - acetonski ekstrakt; DCM - dihlormetanski ekstrakt; PE - petroleterski ekstrakt; CF - hloroformski ekstrakt; Vit. C - kontrola

**Slika 3.** Kalibraciona kriva standardnih rastvora FeSO₄ x 7H₂O**Tabela 2.** Rezultati dobijeni FRAP metodom izraženi u µmol/L

Ekstrakt	Met-OH	Et-OH	ACTN	DCM	PE	CF	Vit. C
γ [mg/mL]	1	1	5	10	10	5	0,02
FRAP	573,6	420,4	853,9	891,8	470,8	481,4	285

γ - konc. ekstrakata korištenih za analizu; Met-OH - metanolni ekstrakt; Et-OH - etanolni ekstrakt; ACTN - acetonski ekstrakt; DCM - dihlormetanski ekstrakt; PE - petroleterski ekstrakt; CF - hloroformski ekstrakt; Vit. C - kontrola

ekstrakti suhog smilja. Dihlormetan i petroleter, u poređenju sa ostalim organskim rastvaračima koji su korišteni za ispitivanje, nisu se pokazali adekvatnim za ekstrakciju bioaktivnih komponenti. Vitamin C koji je korišten kao kontrola pokazao je znatno veću antioksidativnu aktivnost od metanolnog i etanolnog ekstrakta. Prema publiciranim podacima, ekstrakti smilja dobijeni superkričnom CO₂ ekstrakcijom pokazuju antioksidativno djelovanje pri najnižoj testiranoj koncentraciji od 5 µg/mL (Poli i sar., 2003), što ukazuje da se navedenom metodom dobijaju ekstrakti većeg antioksidativnog kapaciteta u odnosu na klasičnu maceraciju. Ispitivanja su pokazala da neke Helichrysum specije, čiji su ekstrakti dobijeni ekstrakcijom u Soxhlet ekstraktoru, imaju antioksidativno djelovanje pri nižim koncentracijama (od 23,03 do 47,64 µg/mL) u odnosu na vrijednosti ustanovljene našim istraživanjem (Albayrak i sar., 2010).

Kalibraciona kriva standardnih rastvora FeSO₄ x 7H₂O prikazana je na slici 3. dok su rezultati dobijeni FRAP metodom prikazani u tabeli 2.

Rezultati dobijeni FRAP metodom potvrđuju rezultate dobijene DPPH metodom. Iako ranije publicirani rezultati ukazuju na veći antioksidativni kapacitet ekstrakata smilja

(Poli i sar., 2003; Albayrak i sar., 2010), treba uzeti u obzir i pripremu (stanje) uzorka, lokaciju sa koje uzorak potiče, načine ekstrakcije, izbor rastvarača i vrijeme trajanja ekstrakcije. Svi navedeni faktori mogu značajno utjecati na rezultate analiza sprovedenih u ovom radu.

4. ZAKLJUČAK

Rezultati analize pokazuju da su niži alkoholi (metanol i etanol) najpogodniji za procese maceracije budući da ekstrahiraju najviše bioaktivnih komponenti (fenola, flavonoida i dr.) čime direktno utiču na antioksidativni kapacitet.

5. LITERATURA

Albayrak S, Aksoy A, Sağdıç O, Budak U (2010) Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of Helichrysum species collected from eastern Anatolia, Turkey. Turk J Biol 34:463-473. DOI:10.3906/biy-0901-4

Antunes Viegas D, Palmeira-De-Oliveira A, Salgueiro L, Martinez-De-Oliveira J, Palmeira-De-Oliveira R (2014)

Helichrysum italicum: from traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol* 151(1):54-65. DOI: 10.1016/j.jep.2013.11.005

Facino RM, Carini M, Franzoi L, Pirola O, Bosisio E (1990) Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae). *Pharmacol Res* 22:709-721. DOI: 10.1016/S1043-6618(05)80097-0

Guinoiseau E, Lorenzi V, Luciani A, Muselli A, Costa J, Casanova J, Berti L (2013) Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. In: Méndez-Vilas A (ed) *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex Research Center, Badajoz.

Maksimović S, Tadić V, Skala D, Zizović I (2017) Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry* 138:9-28. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.01.001

Mastelić J, Politeo O, Jerković I, Radošević N (2005) Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem Nat Comp* 41:35-40. DOI: 10.1007/s10600-005-0069-z

Nostro A, Cannatelli MA, Musolino AD, Procopio F, Alonzo V (2002) *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* 35:181-184. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2002.01166.x

Poli F, Muzzoli M, Sacchetti G, Tassinato G, Lazzarin R, Bruni A (2003) Antioxidant Activity of Supercritical CO₂ Extracts of *Helichrysum italicum*. *Pharm Biol* 41(5):379-383.

DOI: 10.1076/phbi.41.5.379.15934

Rigano D, Formisano C, Senatore F, Piacente S, Pagano E, Capasso R, Borelli F, Izzo A (2013) Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients. *J Ethnopharmacol* 150:901-906.

DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.034

Rottenburg, T. von (2015). *Heilkunde der Ätherischen Öle*. Thom-as von Rottenburg (ed.) Neue Erde GmbH. Saarbrücken, Deutschland, 71-82 (De).

Sala A, Recio MC, Giner RM, Manez S, Tournier H, Schinella G, Rios JL (2002) Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *J Pharm Pharmacol* 54:365-371. DOI: 10.1211/0022357021778600

Staver MM, Gobin I, Ratkaj I, Petrović M, Vulinović A, Dinarina-Sablić M, Brzonić D (2018) In vitro Antiproliferative and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Flowers and Leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Growing in Central Dalmatia (Croatia). *J Essent Oil Bear* 21(1):77-91. DOI: 10.1080/0972060X.2018.1433071

Tagliatalata-Scafati O, Pollastro F, Chianese G, Minassi A, Gibbons S, Arunotayanun W, Mabebie B, Ballero M, Appendino G (2013) Antimicrobial Phenolics and Unusual Glycerides from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *J Nat Prod* 76:346-353.

DOI: 10.1021/np3007149

Tomás-Barberán F, Iniesta Sannmartín E, Tomás-Lorente F, Rumbero A (1990) Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species. *Phytochemistry* 29:1093-1095. DOI: 10.1016/0031-9422(90)85410-H

Voinchet V & Giraud-Robert AM (2007) Use of *Helichrysum* essential oil and musk rose oil after reconstructive or cosmetic surgery. *Phytothérapie* 5(2):67-72. DOI: 10.1007/s10298-007-0213-y

**INVESTIGATION OF SOLVENT EFFECTS ON ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF DRIED IMMORTELE EXTRACTS
(HELICHRYSUM ITALICUM)**

**Emir Horozić¹, Lamija Kolarević², Amila Zukić²,
Demir Bjelošević², Zahida Ademović¹, Broza Šarić Kundalić²**

¹ Faculty of Technology, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, B&H

² Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, B&H

Corresponding author: Emir Horozić, MA, teaching assistant

Phone: +387 61 026 160

E-mail address: emir.horozic@untz.ba

ABSTRACT:

Immortelle (*Helichrysum italicum*) is a medicinal plant whose essential oil contains substances with antibacterial, anti-inflammatory and anti-inflammatory action. The flowers and leaves of this plant are most commonly used parts, primarily in the treatment of allergies, colds, coughs, skin, liver and bladder diseases. The aim of this work was to investigate the influence of organic solvents on the extraction of biologically significant components from dry immortelle flowers and to study antioxidant properties of the extracts using DPPH and FRAP methods. The results showed that methanol and ethanol extracted the most biologically active components from dry immortelle flowers after 14 days of maceration. The lowest antioxidant capacity was demonstrated by extracts obtained using petroleum ether and dihydrochloride as solvent.

Key words: immortele, DPPH, FRAP, organic solvents

IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET PROTEINA I BIOAKTIVNIH PEPTIDA SIROVOG KOZIJEJEG MLIJEKA

Aida Smajlović¹, Emir Imamović², Adaleta Softić¹, Nahida Srabović¹

¹ Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

² Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

SHORT COMMUNICATION

SAŽETAK

Kozje mlijeko je izvor bioaktivnih komponenti, kao što su visokokvalitetni proteini, lipidi, ugljikohidrati, laktoza, vitamini, minerali, enzimi, hormoni, imunoglobulini, faktor rasta. Ove komponente, ne samo važne sa nutritivnog aspekta igraju veoma važnu ulogu u prevenciji različitih bolesti, kao što su hipertenzija, kardiovaskularne bolesti, gojaznost, osteoporoza, karijes, loše gastrointestinalno zdravlje, rak debelog crijeva, starenje,... Enzimskom hidrolizom proteina kozijeg mlijeka mogu se osloboditi bioaktivni peptidi, koji ostvaruju specifične biološke aktivnosti, kao što su antihipertenzivna, antimikrobna, opioidna, antioksidativna, imunomodulatorna ili vezivanje minerala. Bioaktivni peptidi su često porijeklom od prekursora neaktivnog proteina, a nastaju tokom gastrointestinalne probave i/ili tokom prerade hrane. Bioaktivni peptidi se mogu generirati tokom fermentacije mlijeka proteolitičkom aktivnošću starter kultura. Proteini ovčjeg i kozjeg mlijeka također su važni izvori bioaktivnih peptida angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE) i antihipertenzivnih peptida. Takođe, oni mogu osigurati odbranu od neimunih bolesti i kontrolu mikrobnih infekcija.

U ovom radu eksperimentalno su istražene strukture proteina netretiranog sirovog kozijeg mlijeka i uzoraka komercijalnog pasterizovanog kravljeg i sojinog mlijeka, primjenom fluorescentne spektroskopije. Spektri nativno svijenih proteina netretiranog, sirovog kozijeg mlijeka poređeni su sa spektrima denaturisanih proteina u pasterizovanom kravljem i sojinom mlijeku. Određen je antioksidativni kapacitet (AOK) proteina sirovog kozijeg mlijeka, kao i bioaktivnih peptida nastalih kiselinskom hidrolizom pepsinom, oksigen radikal apsorpcijskog kapaciteta (ORAC) metodom. Rezultati su pokazali da proteini sirovog kozijeg mlijeka imaju nativno svijenu strukturu sa djelimično izloženim hidrofobnim aminokiselinskim ostacima. Bioaktivni peptidi proteina < 3 kDa imaju veću AOK od onih u proteinima > 3 kDa.

Eksperimentalni dio ovog rada je potvrdio značaj fluorescentne spektroskopije i identifikacije bioaktivnih peptida u proizvodnji različitih nutritivnih proizvoda, koji se mogu koristiti i u terapeutske svrhe.

Ključne riječi: proteini kozijeg mlijeka, bioaktivni peptidi, fluorescentni spektri, ORAC metoda

Autor za korespondenciju: aida.krijestorac@untz.ba

UVOD

Mlijeko i mliječni proizvodi su veoma važni elementi uravnotežene ishrane, od značaja za pravilan rast i razvoj čovjeka, u svim starosnim dobima. Kozje mlijeko je izvor bioaktivnih komponenti, kao što su visokokvalitetni proteini, lipidi, ugljikohidrati, laktoza, vitamini, minerali, enzimi, hormoni, imunoglobulini, faktor rasta. Pored toga što su značajni za ljudsku ishranu, ove komponente igraju veoma važnu ulogu u prevenciji različitih bolesti, kao

što su hipertenzija, kardiovaskularne bolesti, gojaznost, osteoporoza, karijes, loše gastrointestinalno zdravlje, rak debelog crijeva, starenje,... (Nagpal i sar., 2012). U poređenju sa kravljim mlijekom, kozije mlijeko sadrži više proteina surutke, kalcija i neorganskog fosfora i ima izraženo baktericidno djelovanje, što se povezuje prisustvom antitijela, odnosno imunskim statusom kozijeg mlijeka (Nagpal i sar., 2011). Enzimskom hidrolizom proteina kozijeg mlijeka mogu se osloboditi bioaktivni peptidi, koji su odgovorni za specifične biološke aktivnosti, kao što su antihipertenzivna, antimikrobna, opioidna,

antioksidativna, imunomodulatorna ili vezivanje minerala (Park, 1994a). Bioaktivni peptidi su često porjeklom od prekursora neaktivnog proteina i nastaju tokom gastrointestinalne probave i/ili tokom prerade hrane (Tompa i sar., 2010). Zbog svoje fiziološke uloge i fizičko-hemijske strukture, peptidi mlijeka predstavljaju visoko vrijedne komponente hrane za poboljšanje zdravlja ili farmaceutskih formulacija (Hernandez'-Ledesma i sar., 2014). Bioaktivni peptidi se mogu generirati tokom fermentacije mlijeka proteolitičkom aktivnošću starter kultura. Proteini ovčjeg i kozjeg mlijeka također su važni izvori bioaktivnih peptida angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE) i antihipertenzivnih peptida. Oni mogu osigurati odbranu od neimunskih bolesti i kontrolu mikrobnih infekcija. Djelovanje ovih biofunktionalnih peptida temelji se na njihovoj strukturi, tj. slijedu aminokiselina. Veličina aktivnih sekvenci može varirati od dva do dvadeset aminokiselinskih ostataka. Ukupni antibakterijski učinak u mlijeku je veći od zbira individualnih doprinosa imunoglobulina i neimunoglobulinski odbrambenih proteina, kao što su laktoferin (LF), laktoperoksidaza (LP), lizozim i drugi peptidi. Proteini sudjeluju u gotovo svim procesima u organizmu, od građe do reprodukcije. Oni kataliziraju važne reakcije u ljudskom organizmu, vezuju minerale i vitamine, a daju okus mlijeku i mliječnim proizvodima.

Kazein je glavni protein mlijeka (čini oko 80% ukupnih proteina). Kazein, koji je u mlijeku u obliku većih koloidnih čestica, sadrži značajne količine kalcija i fosfata, a manje magnezija i citrata. Čestice kazeina nazivaju se kompleks kalcijev kazeinat fosfat, a u mlijeku se nalaze u obliku micela. Nekazeinske frakcije proteina mlijeka ili surutke se dijele na laktalbumine, laktoglobuline i proteozepeptone. Proteini surutke su biološki najvrjedniji proteini. Nutritivna vrijednost proteina ovisi o udjelu različitih aminokiselina što se apsorbiraju nakon probave u alimentarnom sistemu. Proteini kozjeg mlijeka su probavljiviji od proteina kravljeg mlijeka i efikasniji od apsorpcije aminokiselina (Park, 1994b).

Oksidativni stres (OS) je jedan od glavnih patofizioloških mehanizama odgovornih za pokretanje ili razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB). Danas je od posebne važnosti potraga za prirodnim antioksidansima (AO) koji pružaju dodatne pogodnosti za endogeni antioksidansni sistem odbrane. Najčešće su izučavani peptidi izvedeni iz hrane, sa AO svojstvima bez štetnih neželjenih efekata, porjeklom iz mlijeka.

Karakterizacija peptida sa antioksidativni kapacitet (AOK), porijeklom iz kazeina i proteina surutke, uglavnom je rađena *in vitro* hemijskim analizama. Međutim, njihova ograničena sličnost sa fiziološkim uslovima čini *in vitro* testove vrlo ograničenim, pa prijavljeni rezultati moraju biti potvrđeni na životinjskim uzorcima i/ili se testiraju na ljudima. Ipak, do danas je urađeno samo nekoliko *in vivo* ispitivanja AO učinka, peptida porijeklom iz mlijeka, a koji se odnose na zdravstvene prednosti kardiovaskularnog sistema (Zommara i sar., 1998). Zdravi ispitanici, koji su konzumirali fermentirano mlijeko su imali smanjen nivo oksidiranih lipoproteina niske gustoće, izoprostana i odnosa redoks sistema oksidovanog i redokovanog glutaciona. Primjećena su i mnoga poboljšanja usljed AO

učinka u plazma membrani i otpornosti lipoproteinske frakcije na oksidaciju (Kullisaar i sar., 2003). Jedinjenja odgovorna za posmatrane efekte još nisu ustanovljena, iako mliječni peptidi oslobođeni tokom procesa fermentacije mogu imati ovde ključnu ulogu. Stoga, dalja istraživanja AOP izvedenih mliječnih peptida u kardiovaskularnim i drugim bolestima su od velikog značaja. Hronična upala je još jedan odgovoran faktor za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Potiskivanje citokina uključenih u upale povezane sa endotelnom disfunkcijom komponentama hrane, uključujući peptide, može odložiti ili ublažiti upalu, a time i povoljno djelovati na razvoj kardiovaskularnih bolesti (Tompa i sar., 2010). Prema našim saznanjima, do sada je obavljeno samo jedno ispitivanje na ljudima u cilju pokazivanja antiupalnih svojstava mliječnih peptida. Pokazano je da do poboljšanja vaskularne funkcije dolazi usljed modulacije nivoa glukoze, upale i biomarkera OS nakon konzumiranja komercijalne surutke sa peptidom NOP-47 kod zdravih osoba (Ballard i sar., 2009).

MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni dio ovog rada obuhvata: izolaciju proteina iz uzorka netretiranog, sirovog kozjeg mlijeka i uzoraka komercijalnog pasterizovanog kravljeg i sojinog mlijeka, određivanje njihove koncentracije, snimanje fluorescentnih spektara proteina i određivanje AOP proteina sirovog kozjeg mlijeka odnosno bioaktivnih peptida sirovog kozjeg mlijeka.

Korišteno je sirovo kozije mlijeko sa područja Tuzlanskog kantona, Bosna i Hercegovina. Proteini su izolovani iz sirovog kozjeg, pasterizovanog kravljeg i sojinog mlijeka metodom centrifugiranja u centrikonima (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Centrifugiranje je izvedeno na 3500 obrtaja/minuti na centrifugi (Eppendorf Centrifuge 5702, Germany) u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi.

Proteinima izolovanim iz sirovog kozjeg, pasterizovanog kravljeg i sojinog mlijeka snimljeni su emisijski fluorescentni spektri metodom fluorescentne spektroskopije u području od 300 nm do 650 nm, pri ekscitaciji od 292 nm na Spektrofluorimetru (RF-5301 PC, Shimadzu, Japan). Emisijski fluorescentni spektri snimljeni su pri otvorima na ekscitacijskom odnosno emisijskom monohromatoru od 1,5 cm u 1 cm kvarcnoj kivetu i na sobnoj temperaturi (23-25°C). Spektri proteina izolovanih iz pasterizovanog kravljeg, odnosno mlijeka soje korišteni su samo za poređenje, jer se radi o spektrima denaturisanih proteina. Korak pri mjerenju za fluorescentne spektre iznosio je 1 nm. Snimanje intenziteta fluorescence na spektrofluorimetru RF-5301 izvodio se pomoću Panorama fluorescence 1.1 softvera (LabCognition, Analytical Software GmbH & Co. KG), koji omogućava snimanje fluorescentnih spektara i obradu podataka. Navedenim proteinima je prethodno određena koncentracija na spektrofotometru (Shimadzu UV mini 1240, Japan) pri talasnoj dužini od 280 nm.

Određivanje ukupnog AOP proteina sirovog kozjeg mlijeka odnosno bioaktivnih peptida sirovog kozjeg mlijeka izvršeno je u triplikatu metodom oksigen radikal apsorpcijskog kapaciteta (ORAC) na

spektrofluorofotometru (RF-5301 PC, Shimadzu, Japan), a u rezultatima su predstavljene srednje vrijednosti triplikata (Cao i sar., 1993; Ou i sar., 2001; Prior i sar., 2005; Niki, 2010).

Za određivanje AOK korišteni su uzorci proteina izolovani iz sirovog kozijeg mlijeka, odnosno smjesa peptida nastala djelovanjem pepsina. Svaka reakcija se kalibrira upotrebom standarda 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-karboksilne kiseline, troloksa (Trolox®). Ukupni AOK proteina odnosno bioaktivnih peptida je određen pri ekscitaciji na 494 nm i emisiji od 521 nm. Na spektrofluorimetru je korištena metoda „Time measurement“ čime je određena efektivnost prirodnih AO prisutnih u sirovom kozjem mlijeku. Mjerenje AOK izvedeno je pri brzini akvizicije 1,67 tokom vremenskog intervala od 4200 s. Uzorcima proteina sirovog kozijeg mlijeka, odnosno smjesi peptida sirovog kozijeg mlijeka određen je AOK u 1 cm kivetu, pri otvorima ekscitacijskog odnosno emisijskog monohromatora od 1,5 nm i na sobnoj temperaturi (23-25°C). Podaci dobiveni ORAC metodom obrađeni su u programu Microsoft Excel, primjenjujući jednačine (1) i (2) za određivanje površine ispod fluorescentne opadajuće krive:

$$ORAC_{(TE, \mu mol/g)} = k \times (S_U - S_{SP}) / (S_S - S_{SP}) \quad (1)$$

gdje je:

ORAC - oksigen radikal apsorpcijski kapacitet izražen u troloks ekvivalentima (TE, $\mu mol/g$)

k - faktor razrijeđenja otopine

S_U - površina ispod fluorescentne opadajuće krive za uzorak

S_{SP} - površina ispod fluorescentne opadajuće krive za slijepu probu

S_S - površina ispod fluorescentne opadajuće krive za standard

Površina integrala ispod fluorescentne opadajuće krive za uzorak, standard odnosno slijepu probu izračunava se po obrascu za određivanje površine trapeza:

$$S = 1/2 \times [(t_1 - t_0) \times (f_1 + f_0) + (t_2 - t_1) \times (f_2 + f_1) + \dots + (t_{i+1} - t_i) \times (f_{i+1} + f_i)] \quad (2)$$

gdje je:

S - površina integrala ispod fluorescentne opadajuće krive za uzorak, standard ili slijepu probu

Tabela 1: Testirani uzorci sirovog kozijeg mlijeka

Uzorak	ORAC
Slijepa proba (SL)	fluorescein
Standard (ST)	(6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-karboksilne kiseline, Trolox®)
Uzorak 1	sirovo kozije mlijeko (netretirano, nepasterizovano)
Uzorak 2	supernatant sirovog kozijeg mlijeka nakon centrifugiranja u centrikonima
Uzorak 3	supernatant sirovog kozijeg mlijeka nakon centrifugiranja u centrikonima i hidrolize sa pepsinom, peptidi < 3 kDa
Uzorak 4	uzorak sirovog kozijeg mlijeka nakon hidrolize pepsinom
Uzorak 5	sirovo kozije mlijeko nakon centrifugiranja u centrikonima

t - vrijeme inkubacije

f - relativni intenzitet fluorescence

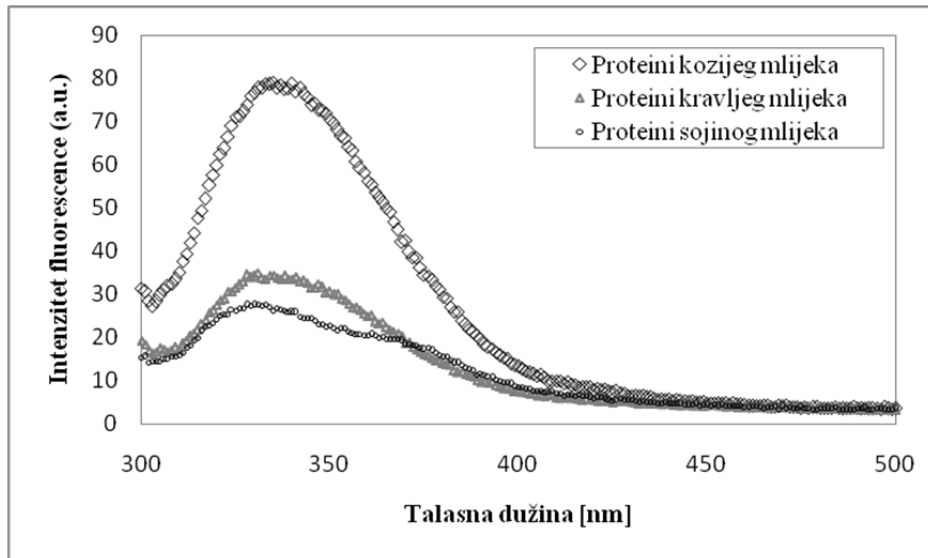
Ukupni AOK proteina ORAC metodom određen je u uzorcima koji su predstavljeni u tabeli 1

- Uzorak 1 je netretirano, nepasterizovano sirovo kozije mlijeko
- Uzorak 2 je pripremljen postupkom centrifugiranja u centrikonima u trajanju od 2 sata na 3600 obrtaja/minuti na sobnoj temperaturi (23-25°C), radi se o rastvoru peptida <3 kDa.
- Uzorak 3 predstavlja rastvor peptida <3 kDa, koji je dobiven nakon izvedene hidrolize pepsinom i procesa centrifugiranja na centrikonima. Hidroliza proteina sirovog kozijeg mlijeka pepsinom ($A_{280} = 1,288$) izvedena je na temperaturi 37°C uz dodatak HCl (pH≈2,88) u trajanju od 30 minuta. Rastvor peptida sirovog kozijeg mlijeka nastao nakon hidrolize pepsinom, dodatno je podvrgnut procesu centrifugiranja u centrikonima u trajanju od 2 sata i 5 minuta na 3600 obrtaja/minuti (sobna temperatura 23-25°C).
- Uzorak 4 je dobiven na isti način kao i uzorak 3, osim što se kao uzorak 4 koristi rastvor proteina >3 kDa.
- Uzorak 5 predstavlja uzorak pripremljen procesom centrifugiranja u centrikonima, dakle rastvor proteina >3 kDa.

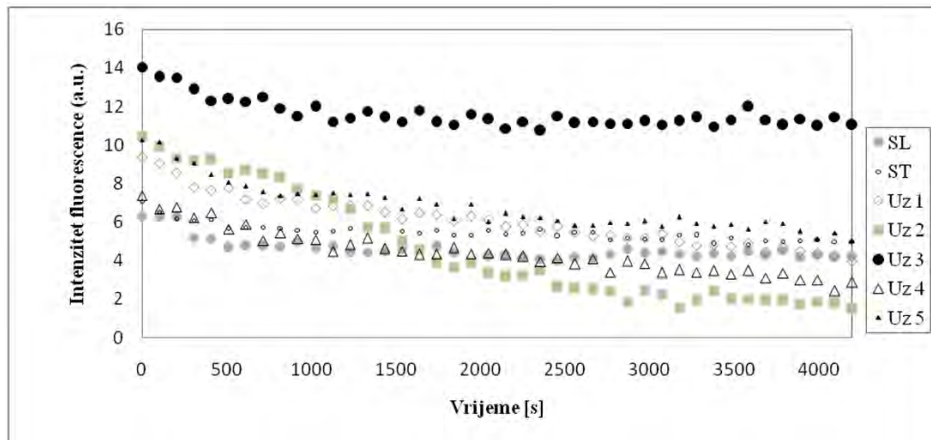
REZULTATI

Snimanje fluorescentnih spektara proteina sirovog kozijeg mlijeka, pasterizovanog kravljeg i sojinog mlijeka

Emisijski fluorescentni spektri proteina, izolovanih metodom centrifugiranja na centrikonima, sirovog kozijeg, pasterizovanog kravljeg i mlijeka soje snimljeni su u području od 300 nm do 500 nm, nakon ekscitacije na 292 nm i predstavljeni na grafikonu 1. Predstavljeni emisijski spektri su pokazali da se intenzitet maksimuma pika fluorescence kreće od 3,21 do 79 proizvoljnih jedinica „arbitrary units“ (a.u.). Najmanji intenzitet su pokazali proteini izolovani iz pasterizovanog sojinog mlijeka i iznosi 26 a.u., a najveću vrijednost su pokazali proteini sirovog kozijeg mlijeka, 79 a.u.



Grafikon 1. Emisijski fluorescentni spektri razblaženih proteina kozijeg, kravljeg i sojinog mlijeka. Uslovi fluorescentnog mjerenja: spektri su snimljeni pri emisiji u opsegu od 300 nm do 500 nm, a pri ekscitaciji na 292 nm u 1 cm kiveti na sobnoj temperaturi (23 – 25°C).



Grafikon 2. Intenzitet emisijske fluorescencije ispitivanih uzoraka. Fluorescentni spektri slijepe probe (SL), troloks standarda (St) i uzoraka sirovog kozijeg mlijeka (U1-U5) su snimljeni su pri talasnoj dužini od 521 nm i ekscitaciji 494 nm tokom 4200 sekundi i pri brzini akvizicije 1,67.

Određivanje antioksidativnog kapaciteta proteina i bioaktivnih peptida sirovog kozijeg mlijeka ORAC metodom

Intenzitet emisijske fluorescencije ispitivanih uzoraka je predstavljen grafikom 2.

Antioksidativni kapacitet za uzorke sirovog kozijeg mlijeka je određena na bazi površine ispod fluorescentne opadajuće krive (tabela 2).

Tabela 2: Antioksidativni kapacitet za uzorke sirovog kozijeg mlijeka

Uzorak	ORAC (TE, $\mu\text{mol/g}$)
Uzorak 1	107,96
Uzorak 2	143,14
Uzorak 3	275,18
Uzorak 4	27,74
Uzorak 5	144,2

Maksimalna vrijednost AOK dobivena je za uzorak 3, a radi se o rastvoru bioaktivnih peptida < 3 kDa, tabela 1. Rastvor bioaktivnih peptida je dobiven nakon kiseline hidrolize pepsinom u uslovima, koji imitiraju fiziološke uslove želuca (pH 2,88 i inkubacija 30 minuta na 37°C) i centrifugiranja uz pomoć centrikona sa filter membranom.

Minimalna vrijednost AOK dobivena je za uzorak koji je kiselinski hidroliziran pepsinom pri pomenutim uslovima, a potom su mu odstranjeni bioaktivni peptidi > 3 kDa (uzorak 4, tabela 1).

DISKUSIJA

Utvrđene su razlike u fluorescentnim spektrima nativnih proteina kozijeg mlijeka u poređenju sa denaturisanim proteinima pasterizovanog kravljeg odnosno pasterizovanog sojinog mlijeka. Intenzitet maksimuma pika fluorescentnog spektra sirovog kozijeg mlijeka je ukazao na postojanje nativno svjenih proteina u poređenju sa

pasterizovanim kravljim odnosno pasterizovanim sojinim mlijekom. Pošto se maksimum intenziteta fluorescence uzoraka sirovog kozijeg mlijeka, nalazi u području 330-340 nm, radi se o svijenim proteinima sa djelimično izloženim hidrofobnim aminokiselinskim ostacima. Maksimalni intenzitet fluorescence za uzorak sirovog kozijeg mlijeka zabilježen je na talasnoj dužini od 335 nm i iznosi 79,056 a.u.. Dakle, radi se o nativno svijenim proteinima u uzorku sirovog kozijeg mlijeka čiji maksimum amplitude pika 2,30x odnosno 2,85x veći od maksimuma amplitude pika pasterizovanog kravljeg odnosno pasterizovanog sojinog mlijeka.

Rezultati AOK uzoraka sirovog kozijeg mlijeka dobiveni ORAC metodom su pokazali da je maksimalna vrijednost dobivena za uzorak sirovog kozijeg mlijeka nakon kiselinske hidrolize pepsinom (simulacija *in vivo* uslova, pH 2,88 (pH sredina želuca), inkubacije u trajanju od 30 minuta na 37°C) i centrifugiranja na centrikonima. Nakon postupka centrifugiranja u uzorku su bili prisutni bioaktivni peptidi < 3 kDa, jer su proteini veće molekulske mase zadržani na filter membrani centrikona.

Pepsin je u optimalnim uslovima hidrolizirao proteine sirovog kozijeg mlijeka, ali ne u potpunosti. U skladu sa studijom Kusumaningtyas i saradnika (2016), dobivena vrijednost AOK ovako tretiranog uzorka je 2,55 puta veća od AOK proteina sirovog kozijeg mlijeka (Kusumaningtyas i sar., 2016).

Rezultati dobiveni za uzorak 4 (tabela 1), imaju najmanji AOK u poređenju sa uzorcima na kojima je rađeno istraživanje, što je bilo i za očekivati, jer su iz ovog uzorka izdvojeni svi peptidi < 3 kDa, koji su nastali kiselinskom hidrolizom pepsinom.

Dobiveni rezultati vezani za određivanje AOK doprinose razumijevanju kvaliteta sirovog kozijeg mlijeka i njegovih proteina odnosno bioaktivnih peptida, koji su od značaja za zaštitu zdravlja i za terapijske svrhe.

LITERATURA:

Ballard KD, Bruno RS, Seip RL (2009) Acute ingestion of a novel whey-derived peptide improves vascular endothelial responses in healthy individuals: a randomized, placebo controlled trial, *Nutrition Journal*, vol. 8, article 34.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993) "Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants". *Free Radic. Biol. Med.* 14 (3): 303-11. doi:10.1016/0891-5849(93)90027-R. PMID 8458588.

Hernandez-Ledesma B, García-Nebot MJ, Fernandez-Tome S, Amigo L, and Recio I (2014)

Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits, *International Dairy Journal*, vol. 38, no. 2, pp. 82-100.

Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, Zilmer K, Viha-lemm T and Zilmer M (2003) Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects, *British Journal of Nutrition*, vol. 90, no. 2, 449-456.

Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Kusumaningrum HD, Suhartono MT (2016) Antibacterial and Antioxidant Activities of Goat Milk Hydrolysate Generated by *Bacillus Sp.* E.13, *Global Veterinaria* 16 (1): 105-110

Nagpal R, Behare PV, Kumar M et al., (2012) Milk, milk products, and disease free health: an updated overview, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 52, no. 4, pp. 321-333.

Nagpal R, Behare P, Rana R et al., (2011) Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update, *Food and Function*, vol. 2, no. 1, pp. 18-27.

Niki, E., Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49: 503-515.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe". *J. Agric. Food Chem.* 49 (10): 4619-26. doi:10.1021/jf010586o. PMID 11599998.

Park YX (1994a) Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*, 14, 151-154.

Park YX (1994b) Nutrient and mineral composition of commercial US goat milk yogurts. *Small Ruminant Research*, 13, 63-70.

Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302

Tompa G, Laine A, Pihlanto A, Korhonen H, Rogelj I and Marnilab P (2010) Chemiluminescence of non-differentiated THP-1 promonocytes: developing an assay for screening anti-inflammatory milk proteins and peptides, *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, vol. 26, no. 4, pp. 251-258.

Zommara M, Toubou H, Sakono M and Imaizumi K (1998) Pre-vention of peroxidative stress in rats fed on a low vitamin e-containing diet by supplementing with a fermented bovine milk whey preparation: effect of lactic acid and -lactoglobulin on the antiperoxidative action, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 62, no. 4, pp. 710-717.

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDATIVE CAPACITY OF PROTEINS AND BIOACTIVE PEPTIDES OF RAW GOAT'S MILK

Aida Smajlović¹, Emir Imamović², Adaleta Softić¹, Nahida Srabović¹

¹Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

²Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT

Goat milk is the source of many bioactive components, such as high-quality proteins, lipids, carbohydrates, lactose, vitamins, minerals, enzymes, hormones, immunoglobulins, growth factors. These components, not only important from the nutritional aspect, play a very important role in the prevention of various diseases such as hypertension, cardiovascular disease, obesity, osteoporosis, caries, poor gastrointestinal health, colon cancer, aging, ... The enzymatic hydrolysis of milk proteins can liberate bioactive peptides that are capable of performing specific biological activities such as antihypertensive, antimicrobial, opioid, antioxidant, immunomodulatory or mineral binding. Bioactive peptides are often derived from inert protein precursors and occur during gastrointestinal digestion and/or during food processing. Bioactive peptides can be generated during milk fermentation by the proteolytic activity of starter cultures. Goat and sheep milk proteins are also important sources of bioactive ACE inhibiting peptides and antihypertensive peptides. They can provide protection against non-immune diseases and control of microbial infections.

In this paper the structures of untreated raw goat's milk protein and samples of commercial pasteurized cow's milk and soy milk were investigated using fluorescence spectroscopy. Spectra of native proteins of untreated, raw goat's milk are compared with the spectra of denatured proteins in pasteurized cow's milk and soy milk. Antioxidant capacity (AOC) of raw goat's milk proteins, as well as bioactive peptides produced by pepsin catalysed acid hydrolysis using oxygen absorption capacity radical (ORAC) method. The results showed that the proteins of raw goat's milk have a native folded structure with partially exposed hydrophobic amino acid residues. Bioactive protein peptides <3 kDa have higher AOC than those in proteins > 3 kDa.

The obtained results confirmed the importance of fluorescence spectroscopy and the identification of bioactive peptides in the production of various nutritional products, which can also be used for therapeutic purposes.

Keywords: proteins from goat's milk, bioactive peptides, fluorescence spectra, ORAC method

Corresponding author: aida.krijestorac@untz.ba

MALONDIALDEHID (MDA) U KARCINOMU DOJKE I NJEGOVA KORELACIJA SA BROJEM ERITROCITA I KONCENTRACIJOM HEMOGLOBINA

Jasmina Gradašević-Gubaljević¹, Nahida Srabović², Adaleta Softić², Aida Smajlović², Esmeralda Dautović², Adi Rifatbegović³, Adlija Čaušević⁴

¹ PZU „Mediflor“ Živinice, Živinice, Bosna i Hercegovina;

² Katedra za Biohemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Tuzla, Bosna i Hercegovina;

³ Klinika za Hirurgiju, Univerzitetsko Klinički Centar Tuzla, Tuzla, Bosna i Hercegovina;

⁴ Katedra za Biohemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo, Bosna i Hercegovina;

Autor za korespondenciju: nahida.srabovic@untz.ba

SAŽETAK

Cilj ove studije bio je ispitati cirkulirajuće nivoe markera oksidativnog stresa, malondialdehida (MDA) u pacijenata sa invazivnim karcinomom dojke i uporediti ih s nivoima MDA u pacijenata sa benignom bolešću dojke, te ispitati korelaciju MDA sa brojem eritrocita (RBC) i koncentracijom hemoglobina.

Ukupno 65 pacijenata je bilo uključeno u studiju (33 pacijentice sa dobro dokumentovanom dijagnozom invazivnog karcinoma dojke i 32 pacijentice sa benignom bolešću dojke). Fluorimetrijska metoda korištena je za određivanje nivoa MDA, a rutinska biohemijska analiza za određivanje broj eritrocita i koncentracije hemoglobina.

Nivoi MDA u pacijentica sa karcinomom dojke bili su značajno veći u odnosu na one sa benignom bolešću dojke ($p=0,031$). Nije nađena statistički značajna razlika u broju eritrocita ($p=0,376$), kao ni u nivou hemoglobina ($p=0,413$) između pacijentica sa karcinomom dojke i u onih sa benignom bolešću dojke. Takođe, nije nađena statistički značajna korelacija nivoa MDA i RBC ($p=0,230$) i MDA i hemoglobina ($p=0,156$) u pacijentica sa karcinomom dojke, niti statistički značajna korelacija između nivoa MDA i RBC ($p=0,466$), odnosno MDA i hemoglobina ($p=0,504$) u pacijentica sa benignom bolešću dojke. Dobiveni rezultati upućuju na značaj MDA u karcinogenezi karcinoma dojke, ali ne i na povezanost oksidativnog stresa i RBC, odnosno hemoglobina.

Ključne riječi: karcinom dojke, oksidativni stres, malondialdehid, broj eritrocita, hemoglobin.

UVOD

Karcinom dojke najčešći je maligni tumor u žena u svijetu (Rockenbach i sar., 2011). Etiologija karcinoma dojke je kompleksna i uključuje niz faktora kao što su genetski, okolišni, sociološki, demografski i hormonski (Hallivel i sar., 2007). Većina faktora razvoja i progresije ove bolesti vezana je za oksidativni stres i produkciju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (Pani i sar., 2009, Sheikhpour, 2014). Neke od posljedica oksidativnog stresa su: ubrzana progresija preko ROS posredovane inaktivacije tumor supresor gena unutar tumorske ćelije i povećanje ekspresije proto-onkogeno (Brown i sar., 2001), aktivacija signalnih puteva koji promoviraju rast tumora preko ROS posredovane promocije ćelijske proliferacije (Burdon i sar., 1995) i stimulacija neoangiogeneze (Brown i sar., 2000).

ROS induciraju proizvodnju proangiogenih citokina interleukina-8 (IL-8) i vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF), te promoviraju izlučivanje metaloproteinaze – 1 i kolagenaze što dovodi do ubrzanog rasta tumora (Brown i sar., 2000). Ubrzan rast tumora i neadekvatna krvna opskrba uzrokuju hipoksiju tkiva koja je prisutna u većini solidnih tumora. A aktivacija hipoksija-signalnog puta koji se odvija uglavnom preko transkripcijskog faktora HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) (Sullivan i sar., 2008) dodatno stimulira neoangiogenezu, mijenja metabolizam tumora, promovira agresivnije ponašanje tumora i utiče na odgovor na terapiju (Semenza, 2010). Uslijed hipoksije tkiva oslobađaju se proinflamatorni citokini koji uzrokuju smanjenu proizvodnju eritropoietina, a što dovodi do smanjenja proizvodnje eritrocita i tumorom izazvane anemije (Bron, 2001). Takođe, eksperimentalne studije su pokazale da je hipoksija tumorskog tkiva povezana sa

anemijom i da je opskrba tumora kisikom smanjena i hipoksija povećana kada je hemoglobin ispod 100-120 g/L (Vaupel i Harrison 2004).

Jedan od najznačajnijih markera oksidativnog stresa je produkt lipidne peroksidacije malondialdehid (MDA) (Lykkesfeldt, 2007), čija povećana produkcija je utvrđena u više različitih studija sa različitim tipovima karcinoma kao što su karcinom dojke (Sahu i sar., 2013, Zarrini i sar., 2016), jajnika (Didziapetriene i sar., 2014), želuca (Bakan i sar., 2002) i pluća (Gupta i sar., 2010).

Cilj ovog istraživanja je bio ispitati cirkulirajuće nivoe MDA kao markera oksidativnog stresa u pacijentica sa karcinomom dojke, te povezanost oksidativnog stresa i anemije, odnosno broja eritrocita (RBC) i koncentracije hemoglobina.

PACIJENTICE I METODE

Pacijentice

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Univerzitetskog kliničkog centra Tuzla. Svaka pacijentica potpisala je pristanak za učešće u istraživanju. Kriteriji za uključivanje pacijentica u istraživanje bili su: histološki dokazan invazivni karcinom dojke, bez udaljenih metastaza, bez prethodne adjuvantne terapije, trenutno bez tretmana i bez većih komorbiditeta. Sve pacijentice su

standarda izvedena je Yagijevom metodom, modificiranoj po Okhawi (Waowicz i sar., 1993, Yagi 1998).

Određivanje RBC i hemoglobina izvršeno je u okviru rutinskih biohemijskih analiza koje se provode po prijemu pacijenta na Kliniku za hirurgiju, a provedeno je u Poliklinici za laboratorijsku dijagnostiku, UKC, Tuzla.

Statistička analiza

Dobiveni rezultati statistički su obrađeni primjenom Mann-Whitney U testa i Spearman-ove korelacije. Za sve testove, $p < 0,05$ smatrano je statistički značajnim. Za statističku analizu korišten je SPSS 17.0 software (SPSS InC, USA).

REZULTATI

Cirkulirajući nivoe MDA, RBC i koncentracija hemoglobina određeni su u 33 pacijentice sa karcinomom dojke i u 32 pacijentice sa benignom bolešću dojke. Cirkulirajući nivoe MDA u pacijentica sa karcinomom dojke bili su značajno veći u odnosu na one sa benignom bolešću dojke ($p=0,031$) (Tabela 1). Nije nađena statistički značajna razlika u vrijednosti RBC ($p=0,376$) i koncentraciji hemoglobina ($p=0,413$) između pacijentica sa karcinomom dojke i u onih sa benignom bolešću dojke. Takođe, nije nađena statistički značajna korelacija RBC i MDA

Tabela 1. Cirkulirajući nivoe MDA u pacijentica karcinomom dojke i u pacijentica sa benignom bolešću dojke

Grupa	N	MDA nivoe Median (min-max) [nmol/mL]	RBC Median (min-max)	Hemoglobin Median (min-max) [g/L]
1. Pacijentice s karcinomom dojke	33	23,27 (5,13-74,63)	4,49 (3,19-5,2)	134 (113-156)
2. Pacijentice s benignom bolešću dojke	32	17,7 (4,92-68,35)	4,51(3,82-5,34)	136 (112-158)

primljene u Kliniku za hirurgiju, UKC Tuzla radi operacije. U istraživanje je bilo uključeno ukupno 65 pacijentica, od čega 33 sa histološki dokazanom dijagnozom invazivnog karcinoma dojke i 32 pacijentice sa benignom bolešću dojke.

Uzorci krvi za određivanje MDA prikupljeni su tokom 2014. godine na Klinici za Hirurgiju UKC Tuzla. Venska krv uzimana je 24 sata prije operacije venepunkcijom (7 mL krvi za analizu). Nakon što su sat vremena stajali na sobnoj temperaturi uzorci krvi su centrifugirani na 3000 rpm 10 minuta. Uzorci dobivenog seruma pohranjeni su u plastičnim mikropručetama od 0,5 mL na -80°C . Priprema seruma i pohranjivanje provedeno je na Poliklinici za laboratorijsku dijagnostiku, UKC Tuzla.

Određivanje MDA, RBC i hemoglobina

Određivanje MDA u serumu pacijentica sa karcinomom dojke i u pacijentica sa benignom bolešću dojke provedeno je fluorimetrijskom metodom (Hallivel i Chirico, 1993, Conti i sar., 1991). Spektri MDA-TBA fluorescentnog kompleksa snimljeni su na spektrofotometru RF-5301 PC (Shimadzu, Japan). Fluorescentna emisija snimljena je na 530 nm poslije eksitacije na 516 nm. Priprema uzoraka i

($p=0,230$), koncentracije hemoglobina i MDA ($p=0,156$) u grupi pacijentica sa karcinomom dojke, kao i u onih sa benignom bolešću dojke ($p=0,466$; $p=0,504$).

DISKUSIJA

Veliki broj studija potvrdio je ulogu oksidativnog stresa u etiologiji i progresiji različitih tipova karcinoma (Lykkesfeldt 2007, Sahu i sar., 2013, Zarrini i sar. 2016, Didziapetriene i sar., 2014, Bakan i sar., 2002, Gupta i sar., 2010, Gonenc i sar., 2006). Rezultati istraživanja potvrdili su povećanje markera oksidativnog stresa MDA u serumu bolesnica sa karcinomom dojke u odnosu na one sa benignom bolešću dojke ($p=0,031$). Prethodna istraživanja su pokazala da je oksidativni stres povezan sa angiogenezom (Brown i sar., 2000) i hipoksijom tumorskog tkiva (Sullivan i sar., 2008, Semenza 2010, Bron i sar., 2001, Vaupel i Harrison 2004). Hipoksija je prisutna u većini solidnih tumora, oko 90%, zbog nesposobnosti vaskularnog sistema da opskrbi brzorastući tumor sa potrebnom količinom kisika (Cosse i Michiels, 2008). Hipoksični tumori su rezistentni na konvencionalnu hemoterapiju, radioterapiju i ćelijsku terapiju (Yotnda i sar. 2010). Takođe, hipoksija

je ključan faktor koji inducira tumorske metastaze, povećava adaptaciju tumorskih ćelija na preživljavanje (neovaskularizacija, rezistencija na apoptozu) i stimulira tumorsku agresivnost (genska nestabilnost, metastaze i diferencijacija (Lin i Yun, 2010). Dakle, angiogeneza i hipoksija, udružene, pokazatelji su agresivnosti tumorske bolesti. Hipoksiju tumorskog tkiva, pored perfuzije i difuzije može uzrokovati i anemija (Vaupel i Harrison, 2004). Hipoksija povezana sa anemijom uzrokovana je sa smanjenom sposobnosti krvi da prenosi kisik i može nastati kao posljedica tumorom uzrokovane anemije ili terapijom inducirane anemije. Eksperimentalne studije su pokazale da je opskrba tumora kisikom znatno smanjena i hipoksija povećana kada je koncentracija hemoglobina ispod 100-120g/L (Vaupel i Harrison, 2004). Da bi utvrdili povezanost oksidativnog stresa i anemije određene su vrijednosti RBC i koncentracija hemoglobina u bolesnica sa karcinomom dojke i u onih sa benignom bolešću dojke (Tabela 1). Nije nađena statistički značajna razlika u vrijednostima RBC kao ni u koncentraciji hemoglobina između pacijentica sa karcinomom ($p=0,376$; $p=0,413$) i onih sa benignom bolešću dojke, iako se uočava blaga tendencija pada broja eritrocita i koncentracije hemoglobina u bolesnica sa karcinomom. Obzirom da bolesnice uključene u studiju nisu bile podvrgnute adjuvantnoj terapiji, niti imaju udaljenih metastaza, što je i bio kriterij isključenja, razumljivo je da nemaju terapijom i/ili tumorom uzrokovanu anemiju, a što je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja (Bron i sar., 2001, Vaupel i Harrison 2004). Rezultati ove studije nisu pokazali povezanost oksidativnog stresa i RBC, odnosno koncentracije hemoglobina. Naime, nije nađena statistički značajna korelacija između cirkulirajućeg MDA i RBC ($p=0,230$), te cirkulirajućeg MDA i koncentracije hemoglobina ($p=0,156$) u bolesnica sa karcinomom dojke, kao niti značajna korelacija MDA i RBC i koncentracije hemoglobina u bolesnica sa benignom bolešću dojke ($p=0,466$; $p=0,504$). Izostanak anemije u bolesnica sa karcinomom dojke koje nisu bile podvrgnute adjuvantnoj terapiji i nemaju udaljenih metastaza vjerovatno je razlog odsustva značajne korelacije između MDA i RBC, odnosno MDA i koncentracije hemoglobina, a što je u skladu sa podacima iz literature (Bron i sar., 2001, Vaupel i Harrison 2004).

Zaključak

Rezultati istraživanja su pokazali da je MDA povišen u bolesnica sa karcinomom dojke što upućuje na ulogu oksidativnog stresa u ovoj bolesti, ali nije utvrđeno prisustvo tumorom uzrokovane anemije, niti povezanost oksidativnog stresa i RBC i koncentracije hemoglobina kao indikatora anemije.

Obzirom da je u više različitih studija utvrđena povezanost oksidativnog stresa i angiogeneze (Brown i sar., 2000), kao i angiogeneze i hipoksije sa anemijom (Vaupel i sar, 2004), te da se hipoksija i angiogeneza smatraju indikatorima agresivnosti tumorske bolesti (Yotnda i sar. 2010), bilo bi potrebno provesti istraživanje sa većim brojem bolesnica uključujući i one sa udaljenim metastazama i uključenom terapijom, te utvrditi nivo MDA u uzorcima seruma, tumorskog tkiva i okolnog nepromijenjenog

tkiva dojke bolesnica sa karcinomom, kao i u uzorcima zdravog tkiva dojke. Takođe, bilo bi potrebno korelirati markere oksidativnog stresa i indikatore anemije sa drugim markerima agresivnosti karcinoma dojke kao što su zauzetost limfnih čvorova, prisustvo udaljenih metastaza, veličina primarnog tumora, status hormonskih receptora i td, te sa proangiogenim faktorima poput VEGF-a.

LITERATURA

Bakan E, Tayasi S, Polat MF, Dalga S, Umudum Z, Bakan N, Gumus M (2002) Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 32:162-6

Bron D, Meuleman N, Mascaux C (2001) Biological basis of anemia. *Semin Oncol* 28(suppl 8):1-6

Brown NS, Jones A, Fujiyama C, Harris AL, Bicknell R (2000) Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. *Cancer Res* 60:6298-6302

Brown SN, Bicknell R (2001) Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Oxidative stress: its effects on growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3:323-327

Burdon RH (1995) Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18:775-794

Conti M, Morand P.C, Levillain P, Lemonnier A (1991) Improved Fluorimetric Determination of Malondialdehyde. *Clin Chem* 7(7): 1273-5

Cosse JP, Michiels (2008) Tumor hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Mol Cancer Ther* 8(7):790-797

Didziapetriene J, Bublevic J, Smailyte G, Kazbariene B, Stukas R (2014) Significance of blood serum catalase activity and malondialdehyde level for survival prognosis of ovarian cancer patients. *Medicina* 50:2014-208.

Gonenc A, Erten D, Aslan S, Akinci M, Sximssek B, Torun M (2006) Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumour and benign breast disease- *Cell Biol Int* 30:376-380

Gupta A, Srivastava S, Prasad R, Natu SM, Mittal B, Negi MP, Srivastava AN (2010) Oxidative stress in non-small cell lung cancer patients after chemotherapy: association with treatment response. *Respirology* 15:349-356.

Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 57: 715-25

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence and death. U Halliwell B, ed. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University, New York

Lin Q, Yun Z (2010) Impact of hypoxic tumor microenvironment on the regulation of cancer stem cells characteristics. *Cancer Biol Ther* 9:949-956.

Lykkesfeldt J (2007) Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 380:50-58.

Pani G, Giannoni e, Galeotti T, Chiarugi P (2009) Redox -based escape mechanism from death: the cancer lesson. *Antiox Redox Signal* 11(11):2791-2802

Rockenbach G, Di Pietro PF, Ambrosi C, Boaventura BC, Vieira FG, Crippa CG, Di Pietro PF (2011) Dietary intake and oxidative stress in breast cancer: before and after treatments. *Nutricion hospitalaria* 26(4):737-744

Sahu A, Varma M, Kachhawa KA (2013) Prognostic Study od MDA, SOD and Catalase in Breast Cancer Patients. *Int J Sci and Res* 4(5):157-159.

Semenza GL (2010) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29:625-634.

Sheikhpour R (2014) Evaluation of Tp53 codon 72 polymorphism and resulted protein in breast cancer patients in Yazd city Iran. *J Breast Dis* 7(3):20-29.

Sullivan R, Pare GC, Frederiksen LJ, Semanza GL, Graham CH (2008) Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is activity associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther* 7:1961-1973

Vaupel P, Harrison L (2004) Tumor hypoxia: causative factros, compensatory mechanisms, and cellual response. *Oncologist* 9:4-9

Wasowicz W, Neve J, Peretz A (1993) Optimized Steps in Fluorimetric Determination of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in Serum: Importance of Extraction pH and Influence of Sample Preservation and Storage. *Clin Chem* 39(12): 2522-26

Yagi K (1998) Simple Assay for the Level of Total Lipid Peroxides in Serum or Plasma. *Methods in Molecular Biology* 108:101-6

Yotnda P, Wu D, Swanson AM (2010) Hypoxic tumors and their effect on immune cells and cancer therapy. U Yotnda P, ed. *Immunotherapy of Cancer, Methods in Molecular Biology*, Springer Science+Business Media, New York, str.1-29

Zarrini AS, Moslemi D, Parsian H, Vessal M, Mosapour A, Kelagari ZS (2016) The status of antioxidants, malondialdehyde and some trace elemnts in serum of patients with breast cancer. *Caspian J Intern Med* 7(1):31-36

MALONDIALDEHYDE (MDA) IN BREAST CANCER AND ITS CORRELATION TO ERYTHROCYTE COUNTS AND HEMOGLOBIN CONCENTRATION

Jasmina Gradašević-Gubaljević¹, Nahida Srabović², Adaleta Softić², Aida Smajlović²,
Esmeralda Dautović², Adi Rifatbegović³, Adlija Čaušević⁴

¹ Private Health Institution „Mediflor“ Živinice, Živinice, Bosnia and Herzegovina;

² Biochemistry department, Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Tuzla, Bosnia and Herzegovina;

³ Clinic of Surgery, University Clinical Centre of Tuzla, Tuzla, Bosnia and Herzegovina;

⁴ Biochemistry department, Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina;

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the circulating levels of oxidative stress marker, malondialdehyde (MDA) in patients with invasive breast cancer in relation to its circulating levels in patients with benign breast disease, and to investigate correlation between MDA serum levels with erythrocyte counts (RBC) and hemoglobin concentration

A total of 65 patients were included in this study (33 patients with well documented invasive breast cancer and 32 patients with benign breast disease). MDA determination in serum of breast cancer and benign breast disease patients was performed by fluorimetric method. Routine biochemical analysis was conducted for RBC and hemoglobin concentration. MDA serum levels in breast cancer patients were significantly higher than MDA serum levels in benign breast disease patients ($p=0,031$). No statistically significant difference between RBC in breast cancer patients and benign breast patients was found ($p=0,376$), as well as in hemoglobin concentration ($p=0,413$). No statistically significant correlations between MDA serum levels of breast cancer patients and RBC ($p=0,230$) and hemoglobin ($p=0,156$) were found, nor between MDA levels of benign breast disease patients and RBC ($p=0,466$) and hemoglobin ($p=0,504$).

Obtained results support the importance of MDA in the carcinogenesis of breast cancer. According to our findings oxidative stress is not related to alteration of RBC and hemoglobin in breast cancer.

Keywords: breast cancer, oxidative stress, malondialdehyde, erythrocyte counts, hemoglobin.

Corresponding author: nahida.srabovic@untz.ba

**PROTEKTIVNI EFEKAT DISULFIRAMA NA STATUS JETRE
PACOVA NAKON SUBAKUTNE EKSPozICIJE ETANOLU**Aida Begić¹, Ana Đurić², Mirjana Đukić²¹ Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, Bosna i Hercegovina² Katedra za Toksikološku hemiju "Danilo Soldatović", Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11 000 Beograd, Srbija**SAŽETAK**

Ranija istraživanja nisu u potpunosti razjasnila u kojoj mjeri se oštećenje ćelija jetre pri ekspoziciji etanolu može pripisati nastanku oksidativnog stresa. Obzirom da disulfiram (DSF) reaguje s tiolnim (-SH) grupama proteina i enzima, cilj istraživanja je ispitati mogući uticaj averzivne terapije na redoks i funkcionalni status jetre.

Eksperiment je izveden na mužjacima Wistar pacova uz kontrolnu grupu (n = 6) i pacove tretirane *per os* sa 3 ml 20 % rastvora etanola tokom 21 dan (A₁₋₂₁ grupa; n = 6) i grupa A₁₋₂₁ kojoj je nastavljen tretman sa 178,5 mg/kg tjelesne mase DSF (doza održavanja u averzivnoj terapiji) tokom naredna 21 dana uz prekid unosa etanola (A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂; n = 6).

Povećan nivo malondialdehida (MDA) i superoksid anion radikala (O₂^{•-}) u jetri, nakon ekspozicije etanolu, postepeno opada po uvođenju DSF u tretman i po završetku tretmana ostaje iznad kontrolne vrijednosti (A₁₋₂₁ grupa: MDA 167% i O₂^{•-} 166%; A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂: MDA 29% i O₂^{•-} 102%). Ekspozicija etanolu dovodi do redukcije aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT). Uvođenje DSF u tretman dovodi do rasta aktivnosti CAT (89% iznad kontrolne vrijednosti; p < 0,0001 u odnosu na A₁₋₂₁ grupu), dok aktivnost SOD ostaje reducirana. Po završetku kombinovanog tretmana, glutationski status (GSSG/GSH) je u nivou kontrolne vrijednosti. Smanjenje nivoa GSH ne dešava se na račun oksidacije, nego zbog reakcija tiolizacije, što je potvrđeno visokom aktivnosti glutathion-S-transferaze (GST). Povećanje aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) nakon ekspozicije etanolu (62%) opada uvođenjem DSF u tretman za 33%. Porast koncentracije Fe je po završetku kombinovanog tretmana veći u odnosu na ekspoziciju etanolu (p < 0,008), što znači da i DSF doprinosi porastu Fe (44% iznad kontrolne vrijednosti).

Smanjenje sadržaja O₂^{•-} omogućilo je obnovu funkcije CAT. Značajno umanjena lipidna peroksidacija (zbog aktivnosti CAT i efikasne funkcije GST), te odsustvo praznjenja rezervi GSH ukazuje na antioksidativni/djelimično protektivni efekat DSF.

Ključne riječi: averzivna terapija, oksidativni stres, reaktivne kisikove vrste, lipidna peroksidacija, glutathion, bioelementi, antioksidativna zaštita

Autor za korespondenciju: Dr.sc. Aida Begić, doc.

Tel: +387 61 743 398

E-mail: aida.begic@outlook.com

PROTECTIVE EFFECT OF DISULFIRAM ON LIVER STATUS OF RATS SUBACUTELY EXPOSED TO ETHANOL

Aida Begić¹, Ana Djurić², Mirjana Djukić²

¹ Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

² Department of Toxicology “Danilo Soldatović”, Faculty of Pharmacy,
University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11 000 Belgrade, Serbia

ABSTRACT

Previous reports have not clarified the contribution of oxidative stress to liver damage following ethanol consumption. The aim of the study was to investigate possible effect of aversive treatment on redox and functional liver status, considering that disulfiram (DSF) reacts with thiol (-SH) groups of proteins and enzymes.

The experiment was conducted on male Wistar rats with control (n = 6) and groups per orally administered 3 ml of 20 % ethanol for 21 days (A₁₋₂₁ group; n = 6) and group A₁₋₂₁ with the introduction of 178.5 mg/kg/b.w. of DSF in the treatment (corresponding to the dose in aversive treatment) for additional 21 days (ethanol was further excluded) (A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂; n = 6).

Increased levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide anion radical (O₂^{•-}) in liver following ethanol exposure, gradually decreased following introduction of DSF and remained above control values at the end of treatment (A₁₋₂₁: MDA 167% and O₂^{•-} 166%; A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂: MDA 29% and O₂^{•-} 102%). Exposure to ethanol lead to reduction in superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities. Introduction of DSF increased only CAT activity (89% above control value; p < 0,0001 compared to A₁₋₂₁ group). Glutathione status (GSSG/GSH) remained around control value. Decrease of GSH does not occur on the account of oxidation but thiolization, which confirmed increased glutathione-S-transferase activity (GST). Increase in alanine aminotransferase (ALT) activity following exposure to ethanol (62%) decreased with the introduction of DSF by 33%. The increase of Fe level is even greater following combined treatment (p < 0,008), which confirms that DSF also exerts increase in Fe level (44% above control value).

Decrease of O₂^{•-} content enabled the restoration of CAT activity. Significantly diminished lipid peroxidation (due to CAT and GST activities) and the absence of glutathione depletion point to antioxidative/partially protective effect of DSF.

Keywords: aversive treatment, oxidative stress, reactive oxygen species, lipid peroxidation, glutathione, bioelements, antioxidative protection

Corresponding author: Dr.sc. Aida Begić, doc.

Tel: +387 61 743 398

E-mail: aida.begic@outlook.com

UTICAJ *IN VITRO* GLIKACIJE NA STRUKTURU I ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA HUMANOG SERUM ALBUMINA

Jasmina Lukić¹, Aida Smajlović²

¹ PZU Apoteka Alma, Turalibegova 48, Tuzla, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

² Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

Autor za korespondenciju: jasminastudent@yahoo.com

SAŽETAK

Humani serum albumin (HSA) je najzastupljeniji serumski protein koji sadrži 59 lizinskih i 23 argininska ostataka i samo jedan ostatak triptofana. Učestvuje u transportu hormona, holesterola, masnih kiselina, žučnih pigmenata, makromolekula, lijekova, i dr. Dakle posjeduje nekoliko važnih fizioloških i farmakoloških funkcija. Dokazano je da su specifični lizinski ostaci HSA uključeni u glikaciju *in vivo*. Njegova uloga kao glavnog antioksidansa u plazmi je od velike važnosti radi mogućih terapijskih učinaka. U hiperglikemijskom stanju, ne-enzimska glikacija proteina dovodi do povećanog stvaranja naprednih krajnjih produkata glikacije (AGE). Ovi produkti formiraju slobodne radikale, koji dovode do razvoja diabetesa, Alzhajmerove bolesti, retinopatija, neuropatija i nefropatija.

U eksperimentalnom dijelu ovog rada istraživana je ne-enzimska glikacija HSA u *in vitro* uslovima, praćena je interakcija glikiranog HSA i inzulina detemira u ovisnosti od vremena i pH, kao i prisustvo fibrila u navedenim uzorcima, metodom fluorescentne spektroskopije. Rezultati su pokazali da čak i pri fiziološkim vrijednostima pH i graničnim vrijednostima glukoze od 6,9 mmol/L, usljed glikacije HSA, dolazi do neznatnih promjena u strukturi α -heliksa. Intenzitet ThT fluorescence pri istim uslovima ukazuje na mogućnost nastanka fibrila pri inkubaciji glikiranog HSA i inzulina detemira. Znatno veće promjene u strukturi HSA nastaju pri smanjenju vrijednosti pH 7,4 na pH 6,0. Opažene su veće promjene u strukturi α -heliksa, a intenzitet ThT fluorescence postiže svoju maksimalnu vrijednost pri pH 6,0 i vrijednosti glukoze od 22 mmol/L i interakciji glikiranog HSA sa 16 IJ inzulina detemira.

Glikacija HSA i blago kisele vrijednosti pH (pH 6,0) su vjerovatno uključeni u otpočinjanju procesa fibrilacije, slabe interakciju glikiranog HSA i inzulina detemira, što dalje može dovesti do promjena u konformaciji veznih mjesta glikiranog HSA, a koja su odgovorna za njegovu antioksidativnu aktivnost.

Ključne riječi: human serum albumin, antioksidativna svojstva, *in vitro* glikirani humani serum albumin, inzulin detemir

UVOD

Humani serum albumin ima nekoliko važnih fizioloških i farmakoloških funkcija, od transporta metala, masnih kiselina, holesterola, žučnih pigmenata do lijekova. Albumin je glavni antioksidans u plazmi koji pomaže organizmu u borbi protiv oksidativnog stresa. Veliki udio ukupnih antioksidativnih svojstava seruma može se upravo pripisati albuminu. Prethodne studije su pokazale da više od 70% antioksidativne aktivnosti seruma otpada na humani serum albumin (HSA), što je pokazao test hemolize inducirane slobodnim radikalima

(Bourdon i Blache, 2001). Antioksidativna aktivnost albumina proizlazi iz njegove fleksibilne strukture sa tri domene, koja se lako prilagođava ligandima i osigurava mnoštvo veznih mjesta (Peters, 1996). Oksidativni stres, koji je jedan od etioloških faktora u patogenezi dijabetesa melitusa, povezan je i sa smanjenjem sadržaja HSA-tiolne skupine (HSA-SH) i povećanjem karbonilnog stresa (Rasheed i sar., 2006), što predstavlja potencijalno objašnjenje za komplikacije kod dijabetesa. Ne-enzimska glikacija HSA opažena je u položajima lizin 199, lizin 281, lizin 439 i lizin 525, kao i kod lizinskih i argininskih ostataka na N-terminalnim krajevima polipeptida (Ali i sar., 2008). Takođe je dokazano da su specifični lizinski

ostaci HSA uključeni u glikaciju *in vivo* (Frolov i sar., 2006). Ne-enzimska glikacija može imati različite važne fiziološke učinke, a *in vitro* modifikacija proteina glukozom se smatra prikladnim modelom za istraživanje promjena u strukturi i funkciji proteina relevantnih za dijabetes i njegove srodne komplikacije. Radi se o spontanoj reakciji, koja zavisi od stepena i trajanja hiperglikemije, poluživota proteina i propusnosti tkiva za molekule slobodne glukoze (Baynes i Thorpe, 2000). U ne-enzimskoj glikaciji molekule glukoze vezane za slobodne aminske ostatke proteina, tvore Schiffovu bazu. Kroz kiselinsko-baznu katalizu, nastaju prelazni spojevi koji prolaze kroz različite konformacije i pretvaraju se u stabilnije, reverzibilne rane glikirane produkte poznate kao Amadori produkti. Ranije studije ukazivale su na sličnu reakciju sa glukozom, dajući stabilan glikirani oblik albumina, koji je izrazito povišen kod dijabetesa u poređenju sa ostatkom populacije (Guthrow i sar., 1979; Zheng i sar., 2012; Correa Freitas i sar., 2017).

Otkriće i klinička primjena inzulina u prošlom stoljeću, dramatično je poboljšala izgled pacijenata oboljelih od dijabetesa. Inzulin detemir je novi dugo-djelujući inzulin analog razvijen za pacijente koji zahtijevaju bazalni inzulin za regulaciju hiperglikemije (David i Owens, 2011). Molekula inzulina sastoji se iz dva polipeptidna lanca: lanac A ima 21 amino kiselinski ostatak i lanac B ima 30 aminokiselina (Whittingham i sar., 1997). Struktura inzulina detemira sastoji se od četiri molekule inzulina u asimetričnim jedinicama, plus četiri iona cinka, četiri hloridna iona, pet molekula fenola, četiri ostatka masnih kiselina i 153 molekule vode. Četiri molekule inzulina agregiraju do forme dimera, molekule cinka i fenola omogućavaju strukturu heksamera, sličnu fiziološkom humanom serumu (Whittingham i sar., 1997; Cada i sar., 2005; Home i sar., 2006).

Istraživanja su pokazala da Amadori albumin ima preciznu ulogu u predviđanju rane nefropatije i retinopatije kod dijabetičara (McCance i sar., 1993), a učestvuje i u patogenezi mikrovaskularnih komplikacija kod dijabetesa (Cohen i sar., 2008). Reakcije u kojima Amadori produkti grade ireverzibilne i složene napredne krajnje produkte glikacije (AGE) postaju sve raznovrsnije i kompliciranije, a samo mali procenat dovodi do stvaranja AGE (Casper i sar., 2012). AGE produkti koji se mogu vezati za plazma proteine, mogu se smatrati novom klasom uremičnih toksina (Thornaley i sar., 2000), markera za različita oboljenja, kao što su arteroskleroza, renalna oboljenja, Alzhajmerova bolest, dijabetes, ali se povećavaju i tokom normalnog starenja (Vlasara, 2005, Ulrich i sar., 2001).

U ovom radu istraživao je uticaj glikacije HSA i promjena pH u *in vitro* uslovima na konformaciju HSA, njegovu interakciju sa inzulinom detemirom i mogućnost otpočinjanja procesa fibrilacije.

MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni dio ovog rada obuhvata: glikaciju HSA u *in vitro* uslovima, praćenje interakcije glikiranog HSA i inzulina detemira u ovisnosti od vremena i pH, kao i određivanje prisustva fibrila u navedenim uzorcima. Glikacija HSA izvedena je u *in vitro* uslovima, inkubacijom HSA u 6,9 mmol/L odnosno 22 mmol/L

glukozi i fosfatnom puferu (50 mmol/L Na₂ HPO₄/ NaH₂ PO₄ pH 7,4; 1 mmol/L EDTA i 0,1 mmol/L natrijum azid) u vremenskom intervalu od 6 h, 120 h i 240 h na 37 °C i tamnom. Navedenim proteinima je prethodno određena koncentracija na spektrofotometru (Shimadzu UV mini 1240, Japan) pri talasnoj dužini od 280 nm. Emisijski fluorescentni spektri snimljeni su na Spektrofluorimetru (RF-5301 PC, Shimadzu, Japan) pri talasnim dužinama (ekscitacija/emisija 322/431, 342/440, 352/453, 375/460, 381/460) za uzorke HSA, koji su glikirani inkubacijom *in vitro* sa 6,9 odnosno 22 mmol/L 6 h, 120 h odnosno 240 h u fosfatnom puferu pH 7,4 odnosno pH 6,0. Emisijski fluorescentni spektri snimljeni su pri otvorima na ekscitacijskom odnosno emisijskom monohromatoru od 1,5 cm u 1 cm kvarčnoj kivetu i na sobnoj temperaturi (23-25 oC). Snimanje fluorescentnih spektara i obrada podataka izvedena je na spektrofluorimetru RF-5301 pomoću softvera, Panorama fluorescence 1.1 (LabCognition, Analytical Software GmbH & Co. KG). Nakon inkubacije u uzorke glikiranog HSA dodane su različite koncentracije inzulina detemira (1IJ, 2IJ, 4IJ, 8IJ i 16IJ) radi praćenja interakcije inzulina detemir-glikirani HSA i prisustva fibrila, a korišten je fosfatni pufer pH 6,0 odnosno pH 7,4. Prisustvo fibrila je praćeno određivanjem intenziteta Tioflavin T (ThT) fluorescence na 482 nm i pri ekscitaciji od 440 nm na Spektrofluorimetru (RF-5301 PC, Shimadzu, Japan). Fibrilacija je praćena nakon inkubacije glikiranog HSA i inzulina detemira u trajanju od 0h, 3h i 30h na sobnoj temperaturi. ThT boja je otopljena u 25 mM fosfatnom puferu koji je sadržavao 0,1 M NaCl kod pH 7,4 do konačne koncentracije 15 μM (A416 = 0,6).

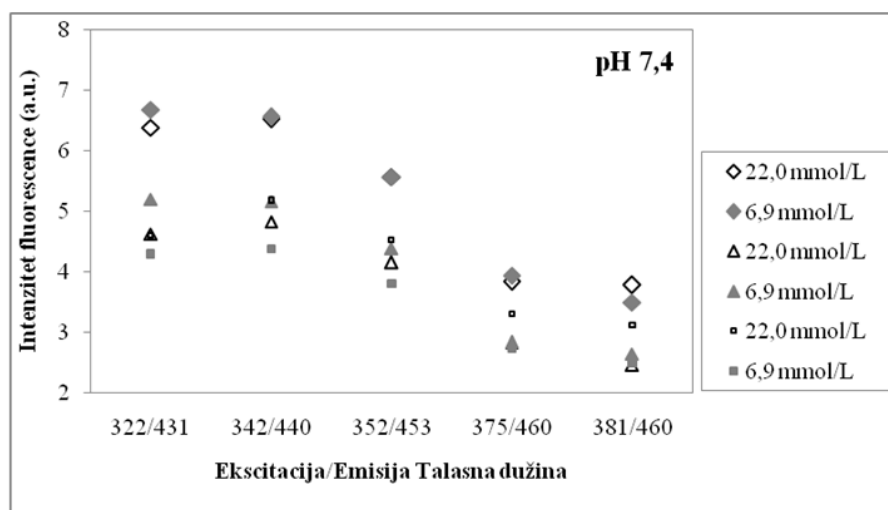
REZULTATI

Omjeri intenziteta fluorescence za uzorke HSA, koji su glikirani *in vitro* sa 6,9 mmol/L odnosno 22 mmol/L 6 h, 120 h odnosno 240 h prikazani su na **grafikonu 1**. Rezultati su pokazali da uzorci HSA inkubirani u 22 mmol/L glukozi u poređenju sa uzorcima HSA u 6,9 mmol/L imaju manju vrijednost intenziteta fluorescence usljed smanjenja udjela α-heliksa u strukturi HSA.

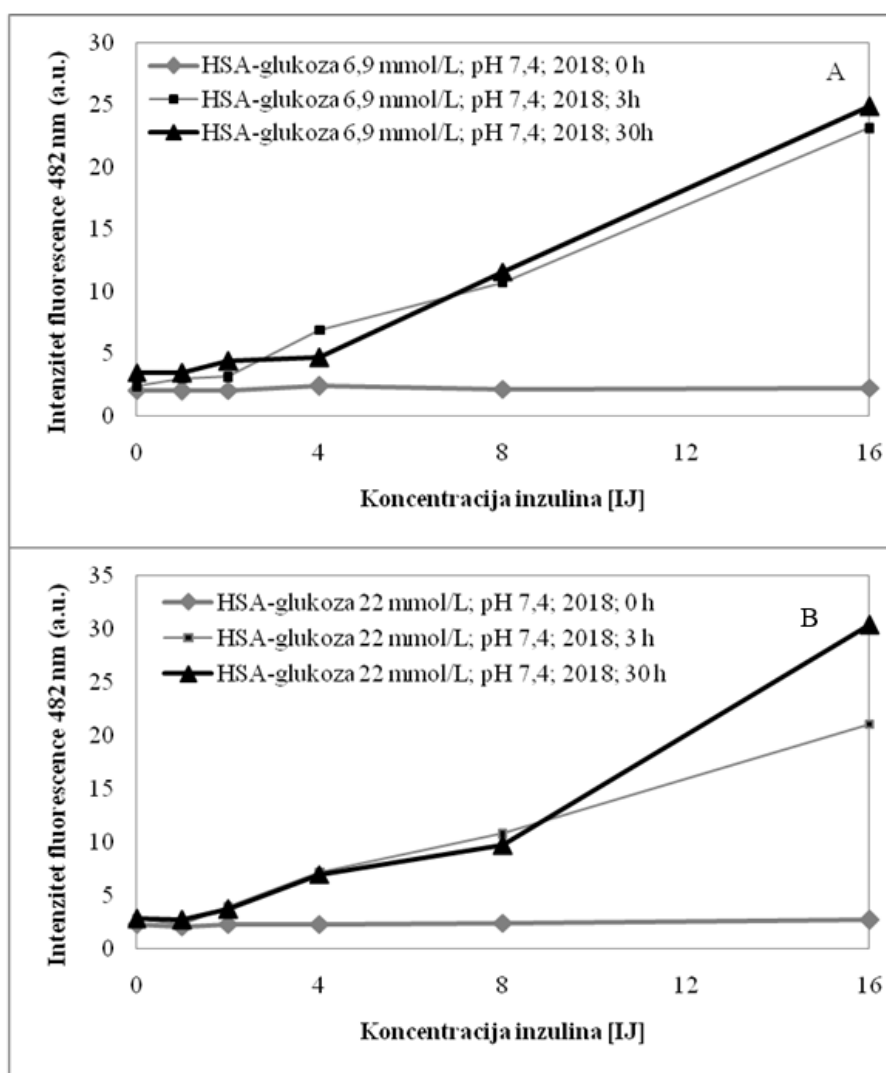
Prisustvo fibrila nakon inkubacije glikiranog HSA i inzulina detemira u trajanju od 0h, 3h i 30h na sobnoj temperaturi prikazano je na **grafikonu 2** i 3. Prisustvo fibrila je određeno u fiziološkim uslovima pH i pri graničnoj fiziološkoj vrijednosti glukoze od 6,9 mmol/L (**grafikon 2A**) odnosno fiziološkim uslovima pH i ekstremno visokim patološkim vrijednostima glukoze od 22 mmol/L (**grafikon 2B**). Na **grafikonu 3A** predstavljena je ovisnost intenziteta emisijske ThT fluorescence u zavisnosti od interakcije inzulina detemira sa glikiranim HSA (glukoza, 6,9 mmol/L) u blago kiselim uslovima (pH 6,0) odnosno inzulina detemira sa glikiranim HSA (glukoza 22 mmol/L) u blago kiselim uslovima (pH 6,0) (**grafikon 3B**).

DISKUSIJA

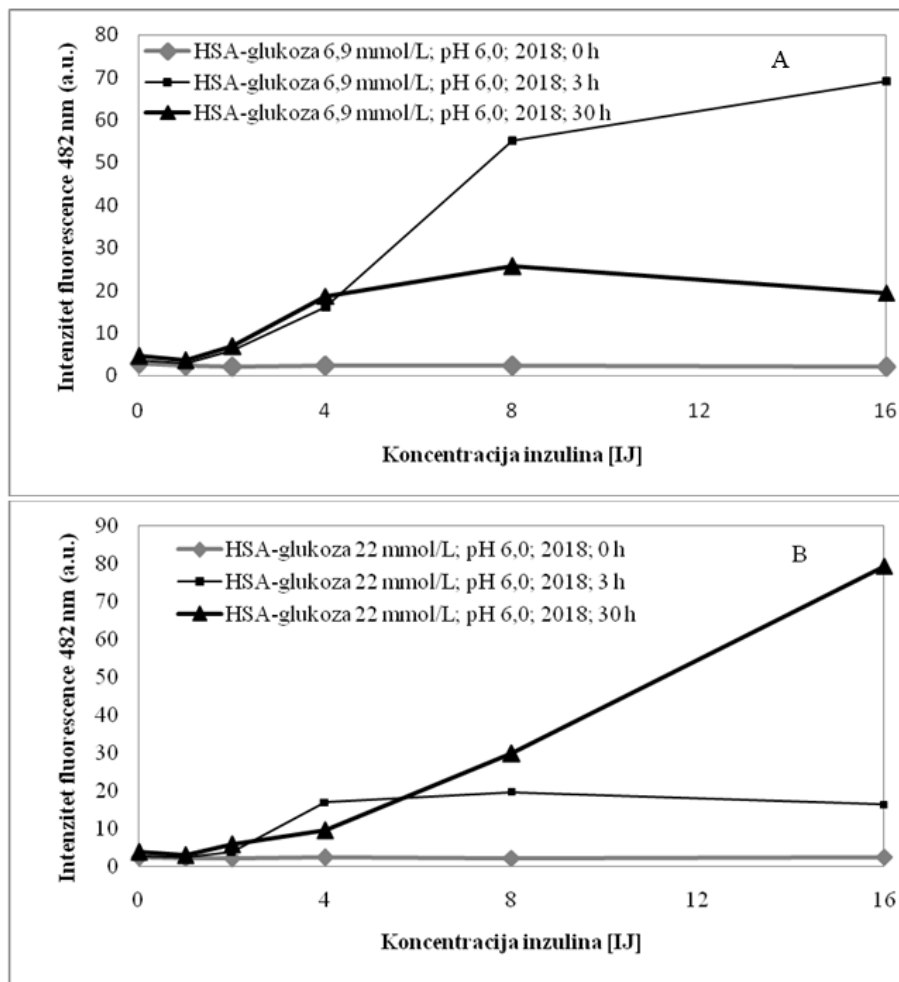
Rezultati su pokazali da čak i pri fiziološkim vrijednostima pH i graničnim vrijednostima glukoze od 6,9 mmol/L, usljed glikacije HSA, dolazi do neznatnih promjena u strukturi α-heliksa, **grafikon 1**. Intenzitet ThT



Grafikon 1. Omjeri intenziteta fluorescence snimljeni metodom fluorescentne spektroskopije na Spektrofluorimetru (RF-5301 PC, Shimadzu, Japan). Ekscitacija/emisija pri različitim talasnim dužinama (322/431, 342/440, 352/453, 375/460, 381/460) za uzorke HSA, koji su glikirani in vitro sa 6,9 odnosno 22 mmol/L i inkubirani 6 h (◊◊), 120 h (◻◻)odnosno 240 h (▲▲) u fosfatnom puferu pH 7,4.



Grafikon 2. Intenzitet emisijske ThT fluorescence pri talasnoj dužini od 482 nm i ekscitaciji od 440 nm ekstrapoliran kao funkcija vremena. (A) Vremenska ovisnost vezivanja inzulina detemira na glikirani HSA (inkubacija HSA u 6,9 mmol/L glukozi pri pH 7,4 u trajanju od 120 h na 37°C). (B) Vremenska ovisnost vezivanja inzulina detemira na glikirani HSA (inkubacija HSA u 22 mmol/L glukozi pri pH 7,4 u trajanju od 120 h na 37°C).



Grafikon 3. Intenzitet emisije ThT fluorescence pri talasnoj dužini od 482 nm i ekscitaciji od 440 nm ekstrapoliran kao funkcija vremena. (A) Vremenska ovisnost vezivanja inzulina detemira na glikirani HSA (inkubacija HSA u 6,9 mmol/L glukozi pri pH 6,0 u trajanju od 120 h na 37°C). (B) Vremenska ovisnost vezivanja inzulina detemira na glikirani HSA (inkubacija HSA u 22 mmol/L glukozi pri pH 6,0 u trajanju od 120 h na 37°C).

fluorescence pri istim uslovima ukazuje na mogućnost nastanka fibrila pri inkubaciji glikiranog HSA i inzulina detemira, **grafikon 2(A)**. Znatno veće promjene u strukturi HSA nastaju pri smanjenju vrijednosti pH sa pH 7,4 na pH 6,0. Dolazi do znatno većih promjena u strukturi α -heliksa (**grafikon 1**), a intenzitet ThT fluorescence postiže svoju maksimalnu vrijednost pri pH 6,0, inkubaciji sa 22 mmol/L glukozom i interakciji glikiranog HSA sa 16 IJ inzulina detemira. Koncentracije inzulina detemira korištene u *in vitro* uslovima su u skladu sa dozama pacijenata oboljelih od dijabetesa u početnim fazama bolesti. Opaženi rezultati su pokazali promjene u konformaciji glikiranog HSA, koje mogu voditi otpočinjanju procesa fibrilacije (Bouma i sar., 2003), kao i smanjenju stepena vezivanja inzulina detemira smanjenju antioksidativne aktivnosti.

ZAKLJUČAK

Vjerovatno da blago kisele vrijednosti pH i glikacija HSA doprinose otpočinjanju procesa fibrilacije, slabljenju

interakcije glikiranog HSA i inzulina detemira, što dalje može dovesti do promjena u konformaciji veznih mjesta glikiranog HSA odgovornih za njegovu antioksidativnu aktivnost.

LITERATURA

Ali O, Bernett G, Comstock P i sar. (2008) Glycated albumin: An intermediate glycemic index an analytical review. Corporate Information Series – 2. Irvine, CA: Epinex Diagnostics Inc.

Baynes JW, Thorpe SR (2000) Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. Free Radic Biol Med. 28:1708–1716.

Bouma B, Kroon-Batenburg LM, Wu YP, Brünjes B, Posthuma G, Kranenburg O, de Groot PG, Voest EE, Gebbink MF (2003) Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. J Biol Chem. 278 (43): 41810-9. Bourdon E, Blache D (2001) The importance of proteins in defense against oxidation. Antioxid. Redox

- Signal. 3:293–311. Cada DJ, Levien T, Baker DE (2005) Formulary drug reviews: Insulin detemir. *Hosp Pharm* 42:1062-1074.
- Cohen MP, Hud E, Wu VY, Shearman CW (2008) Amelioration of diabetes-associated abnormalities in the vitreous fluid by an inhibitor of albumin glycation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56:5089–5093.
- Correa Freitas PA, Ehlert LR, Camargo JL (2017) Glycated albumin: a potential biomarker in diabetes. *Arch. Endocrinol. Metab.* 61 (3): 2359-3997.
- David R. Owens (2011) Insulin Preparations with Prolonged Effect, *Diabetes Technology & Therapeutic* Vol 13, Supplement 1
- Guthrow CE, Morris MA, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW (1979) Enhanced nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Sci. USA*, 76, 4258-4261.
- Frolov A, Singer D, Hoffmann R (2006) Site-specific synthesis of Amadori-modified peptides on solid phase. *J Peptide Sci.*, 12, 389-395.
- Home P, Kurtzals P (2006) Insulin detemir: from concept to clinical experience. *Expert Opin Pharmacother*, 7: 325-342.
- McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SE, Baynes JW, Lyons TJ (1993) Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 91, 2470–2478.
- Peters TJ (1996) *All About Albumin*, Academic Press, San Diego.
- Rasheed Z, Ali R (2006) Reactive oxygen species damaged human serum albumin in patients with type 1 diabetes mellitus: biochemical and immunological studies. *Life Sci.*, 79: 2320-2328.
- Sattarahmady N, Ali A, Moosavi-Movahedi AA, Habibi-Rezaei M (2001) A biophysical comparison of human serum albumin to be glycated in vivo and in vitro. *J Med Biochem* 30:5-10.
- Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi AA, Ahmad F, Hakimelahi GH, Habibi-Razaei M, Saboury AA, Sheibani N (2007) Formation of the Molten Globule-Like State during Prolonged Glycation of Human Serum Albumin. *Biochem Biophys Acta*;1770: 933-942.
- Schalkwijk CG, Miyata T (2012) Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids* 42:1193–1204.
- Thornalley PJ, Argirova M, Ahmed N, Mann VM, Agirov O, Dawnay A (2000) Mass spectrometric monitoring of albumin in uremia. *Kidney Int* 58:2228-2234.
- Urlich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent progress in hormone research* 56:1-22.
- Vlassara H (2005) Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci* 1043:452-460.
- Whittingham JL, Havelund S, Jonassen I (1997) Crystal structure of a prolonged-acting insulin with albumin-binding properties. *Biochemistry*; 36:2826-2831.
- Zheng CM, Ma WY, Wu CC, Lu KC (2012) Glycated albumin in diabetic patients with chronic kidney disease. *Clin Chim Acta.*; 413(19-20):1555-61.

THE INFLUENCE OF *IN VITRO* GLYCATION ON THE STRUCTURE AND THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF HUMAN SERUM ALBUMIN

Jasmina Lukić¹, Aida Smajlović²

¹ PZU Apoteka Alma, Turalibegova 48, Tuzla, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

² Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

Original scientific work

ABSTRACT

Human serum albumin (HSA), most abundant serum protein containing 59 lysine and 23 arginine residues and only one tryptophan residue. It participates in the transport of hormones, cholesterol, fatty acids, bile pigments, macromolecules, drugs and others. So it has several important physiological and pharmacological functions. It has been proved that specific lysine residues in HSA are involved in glycation *in vivo*. Its role as the main antioxidant in plasma is of great importance for possible therapeutic effects. In the hyperglycemic state, non-enzymatic glycation of the protein leads to increased creation of advanced glycation end-products (AGE). These products form free radicals, leading to the development of diabetes, Alzheimer's disease, retinopathy, neuropathy and nephropathy.

In the experimental part of this paper, non-enzyme glycated HSA was investigated *in vitro* conditions, followed by interaction of glycated HSA and insulin detemir in accordance with time and pH, as well as the presence of fibrils in the samples by the fluorescence spectroscopy method. The results showed that even at physiological pH values and glucose limit values of 6.9 mmol/L, due to glycation HSA, minor changes in α -helical structure occur. The ThT fluorescence intensity under the same conditions indicates the possibility of fibril formation at the incubation of glycated HSA and insulin detemir. Significantly larger changes in HSA structure occur when the pH value of pH 7.4 is reduced to pH 6.0. Greater changes in α -helix structure were observed, and ThT fluorescence intensity achieved its maximum value at pH 6.0, 22 mmol/L glucose and the interaction of glycated HSA with 16 IJ insulin detemir.

It is highly probable that the glycation of HSA and slightly acidic pH values (pH 6.0) contribute to the initiation of the fibrillation process, weaken interaction of glycated HSA and insulin detemir, which can further lead to a change in the conformation of the glycated HSA binding sites responsible for its antioxidant activity.

Key words: human serum albumin, antioxidant properties,
in vitro glycated human serum albumin, insulin detemir

Corresponding author: jasminastudent@yahoo.com

ANTIOKSIDANSI U BORBI PROTIV OBOLJENJA I STARENJA ORGANIZMA

Halida Mahmutbegović¹, Amra Dervišević²

¹ PZU Apoteke „Ibn Sina“, Ismeta Mujezinovića 29, 75000 Tuzla; Bosna i Hercegovina; Europski Univerzitet „Kallos“, Ul. Maršala Tita 2A-2B, 75000 Tuzla; Bosna i Hercegovina.

² Europski Univerzitet „Kallos“, Ul. Maršala Tita 2A-2B, 75000 Tuzla; Bosna i Hercegovina.

SAŽETAK

Prekomjernim stvaranjem i gomilanjem slobodnih radikala nastaje oksidacijski stres, koji je uključen u patofiziologiju mnogih različitih kliničkih oboljenja kao što su: bolesti kardiovaskularnog sistema, poremećaji imunološkog sistema, bolesti pluća, probavnog sistema, bubrega, centralnog nervnog sistema, oštećenje vida, uslovi ishemije/reperfuzije, dijabetes melitus, razvoj malignih bolesti, ali i fiziološki proces starenja.

Antioksidans je tvar koja uspješno može ukloniti prooksidans uz stvaranje produkata koji nisu toksični i ne oštećuju ćelije. Antioksidansi štite organizam od prooksidativnog djelovanja i uništavaju već stvorene radikale ili popravljaju oštećenja u ćeliji nastala njihovim djelovanjem.

S obzirom na to da je naš organizam izložen raznovrsnim izvorima oksidacijskog stresa, neophodno je učiniti sve u cilju njegove zaštite. Prvo pravilo je da povećamo tjelesnu aktivnost i da uravnotežimo prehranu koja vodi zdravijem životu. Dokazano je da nutraceutici pružaju fiziološke koristi, smanjuju rizik od hroničnih bolesti i usporavaju starenje, izvan njihovih osnovnih prehrambenih funkcija. Takvi proizvodi uključuju: dodatke prehrani, genetski modificiranu "dizajnersku" hranu, biljne ekstrakte, itd..

Danas se proizvode brojni preparati antioksidansi koji se mogu koristiti u cilju smanjenja oboljenja i starenja organizma. Nije poželjno koristiti visoku dozu samo jednog antioksidansa, već kombinaciju antioksidanasa u dozama blizu RDA. Tako korišteni antioksidansi štite organizam od nastanka ateroskleroze, infarkta miokarda, upalnih procesa, ali i pojačavaju obnovu tkiva, uključujući jetru, srce, krvne sudove i kožu.

Kombinacija efikasne kozmetike i dodataka prehrani je novi višestruki pristup u svrhu smanjenja bioloških procesa starenja kože. Koenzim Q10, alfa-lipoična kiselina, beta-karoten, vitamini A, C, E i brojni drugi antioksidansi mogu se koristiti lokalno i per os u cilju poboljšanja kvaliteta kože i smanjenja degenerativnih promjena na koži.

Ključne riječi: slobodni radikali, antioksidansi, nutraceutici, starenje, oboljenja organizma.

Autor za korespondenciju: Halida Mahmutbegović, mr.ph.

e-mail: halida_mahmutbegovic@hotmail.com;

Telefon:+38762 368 475

1. UVOD

Pojam „anti-aging medicine“ nastoji redefinirati starenje kao cilj za biomedicinske i znanstvene intervencije. Činjenica da je starenje "prirodno" nije više prihvatljiva, jer postoje načini na koje se može uticati na to (Mykytyn, 2006).

Nutraceutici su sastojci hrane koji obezbjeđuju medicinske i zdravstvene koristi, uključujući prevenciju i / ili liječenje bolesti. Takvi proizvodi uključuju: dodatke prehrani, genetski modificiranu "dizajnersku" hranu, biljne ekstrakte itd. (Kwak i Jukes, 2001).

Postoji nekoliko teorija koje pokušavaju protumačiti fenomen starenja. Te se teorije temelje na zajedničkim pretpostavkama, ali nijedna od njih ne daje zadovoljavajuće

objašnjenje. Postoje tri glavne teorije starenja: genetska teorija, fiziološka teorija i teorija promijenjenih funkcija organa. Fiziološka teorija sadrži teoriju slobodnih radikala, teoriju unakrsnog povezivanja i teoriju nakupljanja otpadnog materijala (Duraković i sar., 2007).

Pedesetih godina prošlog stoljeća Denham Harman pretpostavio je da je starenje posljedica prekomjerne proizvodnje slobodnih radikala (Bonney i sar., 2002).

Slobodni radikali nastaju u aerobnom metabolizmu tokom stvaranja energije, tj. ATP (adenozin difosfat) molekule u mitohondrijama. Kako ljudski organizam stari, efikasnost mitohondrija u proizvodnji ATP-a je smanjena, što znači da se slobodni radikali nakupljaju, prolaze kroz mitohondrijsku membranu i oštećuju druge dijelove ćelije. Mogu se identificirati dva faktora koji djeluju u korist starenja: smanjena proizvodnja energije i povećana oksidativna oštećenja. Znanstvene studije pokazuju da postoji više mutacija u mitohondrijskoj DNA (deoksiribonukleinska kiselina) nego u DNA jezgra (Bonney i sar., 2002).

Telomere, DNA sekvence na krajevima hromosoma, skraćuju se kako se ćelije repliciraju i stare. Ćelija ima ograničen broj mogućih ponavljanja i dužina telomera je pokazatelj biološkog starenja. Unos multivitamina utiče na dužinu telomera moduliranjem oksidacijskog stresa i upalnih procesa. Telomere su duže u žena koje koriste multivitamine u poređenju sa ženama koje ih ne koriste (Xu i sar., 2009).

2. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikal je svaki atom ili skupina koja ima jedan nespareni elektron ili više njih u vanjskoj ljusci. Zajednička osobina svih slobodnih radikala je visoka hemijska reaktivnost, te izrazita nestabilnost pošto su kratkog trajanja, odnosno brzo se spajaju s proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama te ugljikohidratima, što rezultira oštećenjem navedenih molekula (Pine, 1994).

Njihovo obilježje je lančana reakcija, odnosno jedan radikal potiče stvaranje drugog. Zato mnogi novonastali spojevi također imaju svojstva radikala (Gamulin i sar., 2005; Vrhovac i sar., 2003).

Pri umjerenim, fiziološkim koncentracijama, NO i superoksidni anion (najvažniji radikali u biološkoj regulaciji), te druge reaktivne vrste kisika (ROS) imaju važne uloge:

- kao regulatorni posrednici u signalnim putevima važnim za mnoge ćelijske funkcije;
- kao prva linija odbrane od patogenih imunološkim ćelijama, u regulaciji vaskularnog tonusa, inhibiciji adhezije trombocita... (Gamulin i sar., 2005; Dröge, 2002).

Ravnoteža u metaboličkim procesima pomaknuta je u smjeru nastanka viška slobodnih radikala, što može biti jedan od mogućih razloga starenja ljudskog organizma, jer što smo stariji, smanjuje se i odbrana organizma od radikala, pa možemo reći da nastaje zatvoreni krug između procesa oksidacijskog stresa i starenja organizma kao uzroka i posljedice. Upravo zbog toga je bitna konzumacija antioksidansa, bilo putem prehrane ili preparata (Puljak i sar., 2004).

Ako nastaju u abnormalnim količinama, slobodni radikali mogu uzrokovati oštećenje organizma, te na taj način dovode do stvaranja različitih bolesti. Također su međuprodukti u brojnim laboratorijskim i industrijskim procesima (Pine, 1994).

3. OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres nastaje prekomjernim stvaranjem i gomilanjem slobodnih radikala. On je uzrok mnogih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, karcinomi, dijabetes, kožne i autoimune bolesti. Posljedice oksidacijskog stresa najizraženije su u starijoj životnoj dobi. Za oksidacijski stres možemo reći da je to normalna pojava, tj. prisutan je kod zdravih ljudi i usko je povezan sa starenjem (Puljak i sar., 2004).

Prooksidans je tvar koja inducira razna oksidativna oštećenja bioloških meta (nukleinskih kiselina, proteina, lipida). Antioksidans je tvar koja uklanja prooksidans stvarajući produkte koji nisu toksični i ne uzrokuju oštećenja (Segundo i sar., 2007).

Oksidativni stres je uključen u patofiziologiju mnogih različitih kliničkih oboljenja kao što su: bolesti kardiovaskularnog sistema (ateroskleroza, hipertenzija, kardiomiopatija), poremećaji imunološkog sistema (autoimune bolesti: reumatoidni artritis, multipla skleroza), bolesti pluća, probavnog sistema, bubrega, centralnog nervnog sistema (Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest), oštećenje vida, uslovi ishemijske/reperfuzije (infarkt miokarda), dijabetes melitus, razvoj malignih bolesti, ali i fiziološki proces starenja (Vrhovac i sar., 2003).

Kao i oksidativni stres koji se temelji na ROS postoji i "nitrosativni" stres kojem su uzrok reaktivni azotovi spojevi (RNS). U praksi, pojam "oksidativni stres" se koristi općenito, i za oksidativni, i za "nitrosativni" stres, tj. on uključuje i ROS i RNS (Klandorf i Van Dyke, 2012).

4. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su tvari koje uspješno mogu ukloniti prooksidans uz stvaranje produkata koji ne oštećuju ćelije. Oni štite organizam od prooksidativnog djelovanja na više načina: inhibicijom stvaranja ROS/RNS, smanjenjem oksidativne sposobnosti prooksidansa, heliranjem s metalnim jonima, inhibicijom oksidativnih enzima (Segundo i sar., 2007).

Antioksidansi nastaju u ćeliji ili se u organizam unose hranom ili putem suplemenata. Djeluju tako da onemogućavaju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, uništavaju već stvorene radikale ili popravljaju oštećenja u ćeliji nastala njihovim djelovanjem (Wotton-Beard i Ryan, 2011).

Aktivnost antioksidansa ovisi o mnogim faktorima među kojima su najvažniji biodostupnost, oksidativni potencijal, brzina reakcije sa slobodnim radikalom te stabilnost i mala reaktivnost nastalog derivata antioksidans-slobodni radikal (Bisby i sar., 2008.).

Voće i povrće su dominantan izvor polifenola, karotenoida, vitamina i minerala, ali s obzirom da se modernom prehranom ne unose dovoljne količine antioksidansa, suplementacija dobiva na važnosti.

Antioksidansi iz hrane se definiraju kao supstance koje mogu „očistiti“ ROS/RNS te zaustaviti lančane reakcije koje uzrokuju slobodni radikali, odnosno zaustaviti njihov nastanak (Wotton-Beard i Ryan, 2011).

Postoji nekoliko podjela po kojima se mogu razvrstati antioksidansi. Prema načinu djelovanja antioksidanse možemo podijeliti na primarne, sekundarne i tercijarne. Primarni sprječavaju nastanak slobodnih radikala (albumin, transferin...). Sekundarni uklanjaju nastale slobodne radikale (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation, vitamin C, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi). Tercijarni popravljaju nastala oštećenja ili uklanjaju biomolekule oštećene radikalima prije nego njihovo nakupljanje uzrokuje nova oštećenja (fosfolipaze, proteaze, peptidaze, DNA polimeraza I...) (Huang i sar., 2005).

U neenzimske antioksidanse ubrajamo metaboličke antioksidanse i antioksidanse iz hrane. Metabolički antioksidansi su produkti metaboličkih reakcija u tijelu, a oni su glutation, koenzim Q, lipoična kiselina itd. (Willcox i sar., 2004). Antioksidansi iz hrane su spojevi koje se ne proizvode u organizmu pa ih stoga moramo unositi putem raznovrsne prehrane. Tu spadaju vitamin A, vitamin C, vitamin E, minerali selen i cink, resveratrol itd.. Svi antioksidansi iz hrane su se pokazali vrlo uspješnim u detoksifikaciji organizma od ROS-a (Gupta i Singh, 2013).

Antioksidansi se također mogu podijeliti na liposolubilne (nalaze se uglavnom na membranama) i hidrosolubilne (slobodno cirkulišu u krvi). Tako npr.: visoko liposolubilni vitamin E ima afinitet prema lipoproteinima, dok je vitamin C visoko topiv u vodi, slobodno cirkuliše i ima minimalnu vezu sa proteinima (Cornelli, 2009).

Provedena su brojna istraživanja za ispitivanje efikasnosti i uticaja antioksidativnih preparata na organizam. Tako je provedeno istraživanje o tome da li će dnevna potrošnja oralnog dodatka koji sadrži likopen, ekstrakt soje i vitamin C u periodu od šest mjeseci potaknuti promjene u općem stanju kože, a posebno njena biomehanička svojstva i kvalitet. Rezultati su pokazali stimulaciju proliferacije ćelija i povećanje sadržaja kolagena i hijaluronske kiseline (Dréno, 2006).

Jedna klinička studija ispitala je efikasnost dva antioksidativna pripravka (emulziju za lokalnu primjenu i preparat za unos per os) na elastičnost kože žena u menopauzi. Stanje kože bilo je znatno bolje kod žena koje su primile kombinacija antioksidanasa (lokalno + per os) u odnosu na one koje su primale samo per os. I oralni i lokalni pripravci bili su efikasni, ali samo njihova kombinacija poboljšala je elastičnosti kože (Cornelli, 2009). Zbog toga će u ovom radu biti dodatno istraženi antioksidansi koji se mogu primjenjivati lokalno i oralno.

4.1. Koenzim Q10

Ubikinson ili koenzim Q10 (CoQ10) je antioksidans prisutan u svim ćelijama koje učestvuju u pretvaranju energije. Postoje razni homolozi koenzima Q, koji sadrže različit broj izoprenoidnih jedinica u lancu, a u ljudskoj plazmi su prisutni CoQ9 i CoQ10 (dominantan homolog) (Molyneux i sar., 2008).

Mehanizam djelovanja CoQ10 u zaštiti DNA od oksidativnog oštećenja je sljedeći:

- 1) direktno hvatanje ROS u lipidnom dvosloju (manji broj ROS dolazi do DNA);
- 2) prekidanje lančane reakcije čime se sprečava dalja peroksidacija lipida kojom nastaju štetni radikali koji mogu djelovati na DNA;
- 3) djelovanje na stanični redoks status uključen u regulaciju transkripcijskih faktora i regulatornih proteina te sudjelovanje u trans-aktivaciji enzima-popravljača DNA (Tomasetti i sar., 2001).

Godinama je poznata uloga CoQ10 u mitohondrijskoj bioenergetici. Novija saznanja su dokazala njegovu prisutnost i u drugim ćelijskim dijelovima i u plazmi, te se intenzivno istražuje njegova antioksidativna uloga. Također, u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, CoQ10 je prepoznat kao obavezan kofaktor za funkciju nevezanih proteina i alosterički modulator pora, odnosno kanala u ćelijskoj membrani. Nedavni podaci otkrivaju da CoQ10 sudjeluje i u ekspresiji nekih gena uključenih u ćelijsku signalizaciju, metabolizam i transport u ćeliji (Littarru i Tiano, 2007).

CoQ10 ima direktan efekat na endotelnu funkciju. Kod pacijenata s kongestivnim zatajenjem srca, suplementacija s CoQ10 je imala pozitivan efekat na kontraktilnost srca i endotelnu funkciju. Također, utvrđena je i jaka korelacija između vanćelijske SOD (superoksid dismutaze) vezane za endotel i endotel-posredovane dilatacije ovisne o toku (funkcionalni parametar koji se često koristi kao biomarker vaskularne funkcije) (Littarru i Tiano, 2007).

CoQ10 inhibira smanjenje serumske koncentracije HDL-a ali i smanjuje serumske vrijednosti lipoproteina kod pacijenata s visokim vrijednostima triglicerida i koronarnom arterijskom bolešću. Kao liposolubilna molekula prisutan je u lipoproteinu, te može inhibirati ekspresiju receptora lipoproteina. To znači da CoQ10 ima hipolipidemična svojstva (Ahmadvand i Ghasemi-Dehnoo, 2014).

U studiji (Tomasetti i sar., 2001) je istraživana utjecaj suplementacije s CoQ10 na zaštitu DNA u limfocitima od oksidativnog oštećenja. Praćena je i obnova DNA nakon oksidativnog oštećenja. In vitro obogaćenje limfocita s CoQ10 inhibira kidanje DNA lanaca pod uticajem atmosferskog kisika, te je popravak štete na DNA lancima ubrzan, u odnosu na limfocite bez CoQ10. Suplementacija CoQ10 in vivo povećava endogenu razinu ubikvinola-10 u limfocitima, koji inhibira kidanje lanaca DNA, te poboljšava popravak pokidanih DNA lanaca, zbog poboljšane enzimске aktivnosti. Zaključak ove studije je da CoQ10 ima pozitivne efekte na zaštitu DNA od slobodnih radikala.

Topikalno primijenjen CoQ10 može prodrijeti kroz žive slojeve epidermisa i smanjiti dubinu bora. Također je djelotvoran protiv UVA-posredovanog oksidativnog stresa keratinocita te može značajno smanjiti ekspresiju kolagenaze u dermalnim fibroblastima nakon UV-zračenja (Dahiya i Romano, 2006).

4.2. Alfa-lipoična kiselina

Alfa-lipoična kiselina (ALA) je snažan antioksidans slabo zastupljen u prehrani. ALA je nužna za oksidativnu dekarboksilaciju piruvata u acetyl-CoA, kritični korak koji povezuje glikolizu i Krebsov ciklus, a djeluje i u Krebsovom ciklusu, pa je zato važna i za aerobni metabolizam. Djeluje kao kofaktor piruvat-dehidrogenaze i alfa-ketoglutarat-dehidrogenaze. S obzirom da je ALA i hidrofилna i lipofilna, njene biološke funkcije nisu ograničene samo na jednu okolinu. Utvrđeno je da ALA ima pozitivan utjecaj na profil lipida u krvi, oksidaciju LDL-a, formaciju ateroma i modulaciju hipertenzije (Wollin i Jones, 2003).

Stoga, ALA bi mogla imati važnu ulogu u smanjenju faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. ALA/DHLA redoks par su jedan od najjačih bioloških antioksidativnih sistema. Njihove funkcije su:

- 1) hvatanje reaktivnih kisikovih spojeva -ALA: hidroksil radikal, singletni kisik, vodikov peroksid, hipohlorna kiselina, peroksinitrit i azotov oksid -DHLA: peroksid radikal, hidroksil radikal, superoksid anion radikal, hipohlorna kiselina;
- 2) regeneracija egzogenih i endogenih antioksidanasa, uključujući vitamine C i E te glutathion koji obnavlja koenzim Q10, NADPH te NADH u ćelijama (Sola i sar., 2005);
- 3) heliranje metalnih jona (bakar, željezo, drugi prelazni metali);
- 4) reparacija oksidiranih proteina;
- 5) sprečavanje adhezije monocita inhibicijom ekspresije adhezijskih molekula: E-selektina, VCAM-1, ICAM-1, MCP-1. (Zhang i Frei, 2001);
- 6) povećanje aktivnosti endotelne NO sintaze, te poboljšanje iskorištavanja glukoze, što je značajno u terapiji dijabetesa tipa 2;
- 7) smanjenje proliferacije i migracije vaskularnih glatkih mišićnih stanica stimuliranih faktorom rasta iz trombocita (Lee i sar., 2012).

ALA se može sintetizirati *de novo* u mitohondriju sintazom lipoične kiseline iz oktanske kiseline i cisteina. S obzirom da se u sisavaca prehranom ne mogu unijeti dovoljne količine ALA, *de novo* sinteza u srcu, jetri i testisima je vrlo važna, jer se tako zadovoljava potrebna količina za inkorporaciju u postojeće enzimске komplekse. Jedino suplementacijom se mogu postići terapijske vrijednosti ALA u cirkulaciji (Petersen Shay i sar. 2008).

Nakon što dospije u ćeliju, ALA se translocira u mitohondrij i tu se reducira u DHLA lipoamidnom-dehidrogenazom ovisnom o NADH. U ćelijama bez mitohondrija, redukcija ide uz NADPH, glutathion-reduktazom i tioredoksin-reduktazom. Nakon redukcije, DHLA može biti prebačena u okolinu ćelije te djelovati u vanćelijskim tečnostima. Smatra se da u toj formi ima najveći antioksidativni potencijal (Wollin i Jones, 2003).

ALA prevenira preuranjenu aterosklerozu antioksidativnim efektom. Ona smanjuje vrijednost karbonila u plazmi i odgađa oksidaciju LDL-a uzrokovanu lipidnim peroksidima (Wollin i Jones, 2003).

Moguća je i topikalna primjena alfa lipoične kiseline. Topikalna primjena kreme s 5% lipoične kiseline

procjenjivana je kliničkim ispitivanjima na uzorku od 33 žene. Žene su kremu koristile dva puta dnevno kroz 12 sedmica, te je uočeno da značajno smanjuje hrapavost kože i fine bore (Dahiya i Romano, 2006).

4.3. Beta-karoten

Beta-karoten je crveno-narandžasti pigment koji je zastupljen u voću i povrću. Beta-karoteni se u organizmu prevode u vitamin A, koji je neophodan za dobar vid i zdravlje očiju, za jak imuni sistem, zdravlje kože i sluzokože. Velike količine vitamina A mogu biti toksične, pa organizam koristi onoliko beta-karotena koliko mu je potrebno. Zato se oni smatraju bezbjednijim izvorom vitamina A od retinola (Lisa, 2012).

Proučavan je efekat beta-karotena u LDL-u i makrofazima na makrofazima-posredovanu oksidaciju LDL-a. Primjenom beta-karotena putem suplemenata došlo je do povećanja njegove koncentracije u LDL-u i makrofazima. Rezultat toga bila je smanjena lipidna peroksidacija u plazmi, te smanjena podložnost LDL-a oksidaciji (Levy i sar., 1996).

Antiaterosklerotsko djelovanje beta-karotena posljedica je i ostalih njegovih efekata, a to su: smanjenje sposobnosti makrofaga da oksidira LDL, smanjenje mogućnosti modifikacije LDL čestica djelovanjem u glatkim mišićnim ćelijama i ćelijama endotela, povećanje koncentracije HDL-a u plazmi, smanjenje koncentracije LDL-a i ukupnog holesterola, te smanjenje aterosklerotske lezije, odnosno debljine intime (Sun i sar., 1997; Reaven i sar., 1994). Beta-karoten se pokazao i kao dobar hvatač lipidnih radikala in vitro (Grune i sar., 2010).

Djelovanje beta-karotena na oksidativni status ovisi o parcijalnom pritisku kisika. Antioksidativni efekat ima pri značajno nižem pritisku kisika nego što je u zraku. Pri višim vrijednostima pokazuje čak i prooksidativno djelovanje. Doduše, te vrijednosti se ne mogu postići u tkivima (Paolini i sar., 2001). Dodatno, jako velike doze beta-karotena ne djeluju inhibicijski prema oksidaciji. S druge strane, podložan je autooksidaciji pa stvara metabolite koji također mogu generirati slobodne radikale. Stoga, primjena beta-karotena u prevelikim količinama, ne djeluje antioksidativno (Reaven i sar., 1994).

Najbolji efekti u zaštiti kože od UV zračenja se postižu prilikom kombinovanja oralne primjene karotenoida i kozmetičkih preparata sa istim sastavom (Darvin i sar., 2011). Beta-karoten primijenjen u liposomima kao nosačima za humane fibroblaste prije izlaganja UVB zračenju u koncentraciji od 2 $\mu\text{mol/l}$ do 28 $\mu\text{mol/l}$, smanjuje formiranje reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline čije stvaranje podstiče UVB zračenje. Ispitivanja na humanim fibroblastima kože pokazala su da beta-karoten sprečava oštećenja membrane fibroblasta koja izaziva UVA zračenje (Britton i sar., 2009).

4.4. Vitamin A

Vitamin A je primarni alkohol poliizoprenoidnog sastava, koji zajedno s vitaminima D, E i K čini skupinu vitamina topljivih u mastima. Snažan je antioksidans koji doprinosi čovjekovom zdravlju (Kniewald, 1993).

Vitamin A i njegovi aktivni metaboliti imaju važnu ulogu u imunološkom sistemu. Uključeni su u diferencijaciju ćelija imunološkog sistema i održavanje imunološke homeostaze. Na primjer, mogu smanjiti upalu kod nekih bolesti kao što su dijabetes melitus tip 1, reumatoidni artritis i ateroskleroza (Mottaghi i sar., 2012).

Zbog antiinflamatornog i ateromstabilizirajućeg efekta TGF- β (indukcijom sinteze ekstracelularnog matriksa) i antiinflamatornog efekta IL-10 te supresivnog djelovanja Treg-stanica na efektorne-T-stanice (kojih ima mnogo u aterosklerotskom plaku), vitamin A ima ulogu u usporejnu razvoja bolesti (Mottaghi i sar., 2014; Mottaghi i sar., 2012).

Poznato je da je vitamin A izrazito važan za oči, rast, kosu i kožu. Ispunjava važne funkcije kao hvatač radikala, te na taj način preventivno djeluje protiv nekih oblika raka. Vitamin A utiče na različite metaboličke procese. Bez vitamina A nema zdrave kože niti sluznica može obavljati svoje funkcije (Mühleib, 1994).

Koristi se u otklanjanju brojnih dermatoloških bolesti, kao što su akne, ekcemi, psorijaza, opekotine i ostale kožne bolesti. S obzirom na to da potiče proizvodnju kolagena tako doprinosi regeneraciji oštećenog tkiva, tj. bržem zarastanju rana, bilo da je riječ o ozljedama ili hirurškom zahvatu. Preveniraju pojavu hiperpigmentacije, hrani, njeguje i vlaži kožu te je štiti od bora i ostalih znakova preranog starenja. Zbog djelotvornog i pozitivnog efekta na kožu često je sastojak krema i ostalih kozmetičkih preparata (Mühleib, 1994).

Oblici vitamina A koje se najčešće koriste u kozmetičke svrhe su: retinol, esteri retinola (acetat, propionat, palmitat) i retinalaldehid. Djelovanjem endogenih enzima u organizmu svi prelaze u trans-retinoičnu kiselinu, koja ujedno predstavlja i aktivni oblik vitamina A.

Među brojnim promjenama ekspresije gena koje uzrokuju retinoidi, samo neke od njih imaju značajan efekat na sprječavanje starenja kože. Takve promjene su: povećanje epidermalne proliferacije i diferencijacije, povećanje produkcije epidermalnih tvari, povećanje produkcije komponenti vanćelijskog dermalnog matriksa kao što je kolagen. Zbog takvih promjena dolazi do smanjenja finih linija i bora.

Osim stimulacijskih efekata, retinoidi također imaju i inhibitorne efekte. Reduciraju produkciju kolagenaza, inhibiraju proizvodnju viška tvari koje uzrokuju fotostarenje kože. Retinoidi također smanjuju ekspresiju tirozinaze, ključnog enzima u pretvaranju tirozina u melanin. Topikalno primjenjeni retinoidi pokazuju vrlo brzo efekte na epidermis, stoga se i smanjenje finih linija očekuje već nakon par dana od primjene proizvoda. Efekti na dermis javljaju se tek za nekoliko sedmica, pa čak i mjeseci, pa se i smanjenje dubokih bora očekuje u tom periodu (Bissett, 2009).

4.5. Vitamin C

Askorbinska kiselina (AA) je vrlo važan hidrosolubilni vitamin. Većina biljaka i životinja sintetizira askorbinsku kiselinu iz D-glukoze i D-galaktoze. Međutim, ljudi ne mogu sintetizirati askorbinsku kiselinu zbog nedostatka enzima gulonolakton-oksidge, pa se ona mora unositi prehranom. Mnogi blagotvorni efekti na zdravlje pripisani

su askorbinskoj kiselini, a uključuju antioksidativna, antiaterogena, antikarcinogena i imunomodulatorna svojstva, te prevenciju prehlade...

AA iz hrane se lako apsorbira (80-90%) aktivnim transportom u crijevima. Osjetljiva je na zrak, svjetlost, toplinu i lahko se uništava predugim skladištenjem i obradom hrane. AA se ne pohranjuje u tijelu, a poluživot joj je 10-20 dana, pa se mora redovno unositi u organizam. Glavni metaboliti su dehidroaskorbinska kiselina (DHA), 2,3-diketogulonska kiselina i oksalna kiselina. Eliminacija metabolita i nemetabolizirane AA je putem urina (Akhilender, 2003).

Fiziološka funkcija vitamina C ovisi o oksidoredukcijskim svojstvima ovog vitamina. L-askorbinska kiselina je kofaktor za hidroksilaze i monooksigenaze, enzime uključene u sintezu kolagena, karnitina i neurotransmitera. Ona ubrzava reakcije hidroksilacije tako da održava metalne ione u aktivnom centru enzima u reduciranom stanju te time osigurava optimalnu aktivnost enzima. Također sudjeluje u transformaciji holesterola u žučne kiseline tako što modulira mikrosomsku 7- α -hidroksilaciju, limitirajuću reakciju katabolizma holesterola u jetri. U nedostatku AA ta reakcija bude usporena, rezultirajući nakupljanjem holesterola u jetri, hiperholesterolemijom, formacijom žučnih kamenaca, itd. (Akhilender, 2003).

Hvatanjem reaktivnih spojeva AA sprječava oksidativnu štetu na značajnim biološkim makromolekulama, a to su DNA, lipidi i proteini. Vitamin C je efektivan antioksidans iz više razloga. Prvo, askorbat i askorbil radikal, koji je stvoren hvatanjem jednog elektrona na askorbat, imaju niske redukcijske potencijale i mogu reagovati s većinom drugih biološki važnih radikala i oksidansa. Drugo, askorbil radikal je slabo reaktivan zbog rezonantne stabilizacije nesporenog elektrona i brzo se prevodi u askorbat ili dehidroaskorbinsku kiselinu (Carr i Frei, 1999).

Osim hvatanja reaktivnih spojeva, vitamin C može regenerirati druge antioksidanse: α -tokoferol, glutation, urat i β -karoten. Askorbat regenerira α -tokoferol redukcijom α -tokoferoksil radikala, tako da premješta radikale iz lipidne faze u vodu, te time prevenira tokoferol-ovisnu peroksidaciju (Carr i sar., 2000).

Uvjerljivi su dokazi iz in vitro studija (Carr i sar., 2000; Martin i Frei, 1997) da fiziološke koncentracije vitamina C snažno inhibiraju oksidaciju LDL-a preko vaskularnih ćelija i neutrofila. Askorbat sprječava oksidativnu modifikaciju LDL-a primarno suzbijajući slobodne radikale u vodenom okruženju. Direktno i brzo hvatanje tih vodenih reaktivnih spojeva askorbatom sprječava njihovu interakciju s LDL-om te time i njegovu oksidaciju (Carr i sar., 2000).

Studije (Hornig i sar., 1998; Ting i sar., 1997; Solzbach i sar. 1997; Ting i sar., 1996; Levine i sar., 1996; Heitzer i sar., 1996) pokazuju da akutna primjena AA povećava endotel-ovisnu vazodilataciju i kod pacijenata s dijabetesom, koronarnom bolesti arterija, hipertenzijom, hiperholesterolemijom, hroničnim zatajenjem srca, te kod pušača.

Askorbinska kiselina se skladišti u velikoj koncentraciji u leukocitima i umiješana je u veliki broj imunih funkcija, kao što je protekcija neutrofila od oksidativnog stresa (Gleeson i sar., 2004).

Zbog svog antioksidativnog djelovanja i inhibicije tirozinaze, vitamin C je često korišten kao tvar za osvježavanje kože. Zbog toga što smanjuje pojavu eritema nakon primjene lasera, poznat je i kao protuupalno sredstvo. Askorbinska kiselina je i bitan kofaktor za enzime koji su potrebni u procesima posttranslacijske biosinteze kolagena. Sudjelovanjem u ovim biosintetskim koracima, askorbinska kiselina ima veliki značaj u proizvodnji kolagena, koji onda posljedično smanjuje bore. Glavni problemi u radu s vitaminom C i njegovim derivatima su njihova stabilnost tj. osjetljivost na kisik i isporuka vitamina C u kožu (Bissett, 2009).

4.6. Vitamin E

Vitamin E uključuje 8 različitih formi: α -, β -, γ - i δ -tokoferol i α -, β -, γ - i δ -tokotrienol. Tokotrienoli imaju nezasićeni bočni ogranak, dok tokoferoli sadrže rep s 3 hiralna centra koji su prirodno RRR konfiguracije (Brigelius-Flohé i sar., 2002).

Kao i drugi lipofilni vitamini, veže se za specifične proteine ili lipoproteine tokom apsorpcije, transporta i distribucije. Unos apsorbiranog vitamina E u cirkulaciju se odvija preko hilomikrona, a sljedeća stanica je jetra. U jetri se α -oblik tokoferola odvaja od ostalih formi pomoću α -TTP (α -tokoferol transportni protein), koji specifično veže α -tokoferol za ugradnju u VLDL. Druge forme se kraće zadržavaju i uglavnom izlučuju putem žuči ili urina. Transport vitamina E plazmom se odvija vezanjem za lipoproteine, a unutar ćelije tokoferol-vezujućim proteinima. Za održavanje normalne koncentracije α -tokoferola u plazmi, ključna je uloga α -TTP-a. Vitamin E se apsorbira zajedno s lipidima pa je važno da se unese uz obrok s dovoljnom količinom masnoća da bi se ostvarila optimalna biodostupnost (Brigelius-Flohé i sar., 2002).

Sposobnost α -tokoferola da inhibira oksidaciju LDL-a *in vitro* je neupitna. Ta spoznaja je temelj pretpostavke da vitamin E može prevenirati aterosklerozu, a inhibicija oksidacije LDL-a bi trebala dovesti do inhibicije ranih događaja ateroskleroze. S obzirom da većina kliničkih studija uključuje pacijente s prisutnom aterosklerozom, te studije ne pokazuju jasno da vitamin E odgađa početni napredak bolesti (Brigelius-Flohé i sar., 2002).

Kada α -tokoferol djeluje kao antioksidans *in vivo*, konvertira se u tokoferoksil radikal i prekida lančanu reakciju. Ako se ne reducira koantioksidansom, tokoferoksil radikal može reagirati s lipidima i generirati lipidne radikale, time promovirajući novu lančanu reakciju. Stoga, α -tokoferol nužno treba koantioksidans da bi imao povoljan efekat. Dokazana je inhibicija progresije ateroskleroze u ASAP studiji (Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention) zajedničkom korištenjem vitamina E i vitamina C zajedno (Salonen i sar., 2000).

U plazmi se α -tokoferol nalazi u LDL-česticama. U prosjeku, svaka LDL-čestica nosi 5 do 9 molekula α -tokoferola za koje se smatra da djeluju protektivno na LDL od oksidativnog oštećenja. Vitamin E u LDL-česticama djeluje antioksidativno prekidajući lančanu reakciju i prevenirajući lipidnu peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina i modifikaciju proteina u LDL-u, uzrokovanu ROS. Osim što se prenosi LDL-česticama koje pritom štiti od oksidativnih modifikacija, vitamin E je inkorporiran

i u druge komponente vaskularnog sistema: endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije, trombocite i imune ćelije. Također, vitamin E modulira mnoštvo upalnih procesa koji su uključeni u aterogenezu. On inhibira produkciju proupalnih citokina u endotelnim i imunim ćelijama, te potiskuje ekspresiju adhezijskih molekula na endotelnim ćelijama i liganada na monocitima, tako reducirajući njihove adhezivne interakcije (Meydani, 2001).

Visoke doze vitamina E imaju značajne efekte na kožu. Vitamin E sprječava i poboljšava kožne probleme, akutne i hronične, koji su uzrokovani slobodnim kisikovim radikalima. Tako pozitivno djeluje na probleme koje uzrokuje izloženost UV zračenjem, kao što su opekotine, bore i hiperpigmentacija. S obzirom da su tokoferol i tokoferil acetat topljivi u lipidima, glavni izazov u oblikovanju kozmetičkih preparata je kako napraviti nemasan oblik (Bissett, 2009).

5. ZAKLJUČAK

Današnji način života mijenja naše životne navike. Posljedice oksidacijskog stresa poput neuravnotežene prehrane, životnih problema, nasljednih bolesti, trauma i povreda dovode do povećanog stvaranja oksidanasa i smanjenja antioksidativne odbrane. Mnoge kardiovaskularne bolesti, karcinomi, dijabetes, kožne i autoimune bolesti nastaju u ovakvim uslovima. S obzirom na to da je naš organizam izložen raznovrsnim izvorima oksidacijskog stresa, neophodno je učiniti sve u cilju njegove zaštite.

Prvo pravilo je da povećamo tjelesnu aktivnost i da uravnotežimo prehranu koja vodi zdravijem životu. Dokazano je da nutraceutici pružaju fiziološke koristi, smanjuju rizik od hroničnih bolesti i usporavaju starenje, izvan njihovih osnovnih prehrambenih funkcija.

Danas se proizvode brojni preparati antioksidansi koji se mogu koristiti u cilju smanjenja oboljenja i starenja organizma. Nije poželjno koristiti visoku dozu samo jednog antioksidansa, budući da je moguće da njegova prooksidacijska aktivnost zamjenjuje njegovu antioksidacijsku aktivnost. Bolje je koristiti kombinaciju antioksidanasa u dozama blizu RDA. Tako korišteni antioksidansi štite organizam od nastanka ateroskleroze, infarkta miokarda, upalnih procesa, ali i pojačavaju obnovu tkiva, uključujući jetru, srce, krvne sudove i kožu.

Kombinacija efikasne kozmetike i dodataka prehrani je novi višestruki pristup u svrhu smanjenja bioloških procesa starenja kože. Koenzim Q10, alfa-lipoična kiselina, beta-karoten, vitamini A, C, E i brojni drugi antioksidansi mogu se koristiti lokalno i per os u cilju poboljšanja kvaliteta kože i smanjenja degenerativnih promjena na koži.

6. LITERATURA

1. Ahmadvand H, Ghasemi-Dehnoo M. (2014.) Antiatherogenic, hepatoprotective, and hypolipidemic effects of coenzyme Q10 in alloxan-induced type 1 diabetic rats. *ARYA Atheroscler*, 10, 192–198.
2. Akhilender Naidu K. (2003.) Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *J Nutr*, 2, 7.

3. Amom Z, Zakaria Z, Mohamed J, Azlan A, Bahari H, Hidayat Baharuldin MT, Moklas MA, Osman K, Asmawi Z, Nik Hassan MK. (2008.) Lipid Lowering Effect of Antioxidant Alpha-Lipoic Acid in Experimental Atherosclerosis. *J Clin Biochem Nutr*, 43, 88–94.
4. Bisby RH, Brooke R, Navaratnam S. (2008.) Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chem*, 108, 1003-1007.
5. Bissett DL. (2009.) Common cosmeceuticals. *Clin Dermatol*, 27, 435-445.
6. Bonnefoy M, Drai J, Kostka T. (2002.) Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med*;31:1174-84.
7. Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. (2002). The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*,76, 703-716.
8. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. (2009.) Carotenoides Volume 5: Nutrition and Health. Basel: Birkhauser Verlag. 431 p.
9. Carr A, Frei B. (1999.) Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB* . 13, 1007-1024.
10. Carr AC, Tijerina T, Frei B. (2000.) Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid- and chloramine-dependent modifications of low-density lipoprotein. *Biochem J*, 346, 491–499.
11. Cornelli U. (2009.) Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol*; 27:175-34.
12. Dahiya A, Romano JF. (2006.) Cosmeceuticals: A review of their use for aging and photoaged skin, *Cosmetic Dermatol*, 19, 479-484.
13. Darvin ME, Fluhr JW, Meinke MC, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. (2011.) Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. *Exp Dermatol*.;20:125-29.
14. Dréno B. (2006.) New assessment methods applied to a patented Lacto-Lycopene, soy isoflavones and vitamin C formula in the correction of skin ageing. *Nouv Dermatol*.;22:1-6.
15. Dröge W. (2002.) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Am J Physiol*, 1, 47-95.
16. Duraković Z, et al., (2007.) Gerijatrija: medicina starije dobi. Zagreb: C.T.-Poslovne informacije d.o.o.,3-6.
17. Ford I, Cotter MA, Cameron NE, Greaves M. (2001.) The effects of treatment with α -lipoic acid or evening primrose oil on vascular haemostatic and lipid risk factors, blood flow, and peripheral nerve conduction in the streptozotocin-diabetic rat. *Metabolism*,50, 868-875.
18. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. (2005.) Patofiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, str. 187-193; 408-410.
19. Gleeson M., Nieman D.C. et al., (2004), Exercise, nutrition and immune function, (str.115–125).
20. Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin S, Biesalski HK. (2010.) β -Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans. *J Nutr*, 140, 2268S-2285S.
21. Gupta RK, Singh N. Morinda citrifolia (Noni) alters oxidative stress marker and antioxidant activity in cervical cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(8):4603-6.
22. Heitzer T, Just H, Munzel T. (1996). Antioxidant Vitamin C Improves Endothelial Dysfunction in Chronic Smokers. *Circulation*, 94, 6-9.
23. Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. (1998.) Vitamin C Improves Endothelial Function of Conduit Arteries in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation*, 97, 363-368.
24. Huang D, Ou B, Prior RL. (2005.) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem.*, 53, 1841–1856.
25. Klandorf H, Van Dyke K. (2012.) Oxidative and Nitrosative Stresses: Their Role in Health and Disease in Man and Birds, Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects. West Virginia, InTech, 47-60.
26. Kniewald Z. (1993.), Vitamini i hormoni: proizvodnja i primjena, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb.
27. Kwak NS, Jukes DJ. (2001.) Functional foods. Part 2: The impact on current regulatory terminology. *Food Control*;12:109-17
28. Lee WR, Kim A, Kim KS, Park YY, Park JH, Kim KH, Kim SJ, Park KK. (2012.) Alpha-lipoic acid attenuates atherosclerotic lesions and inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells through targeting of the Ras/MEK/ERK signaling pathway. *Mol Biol Rep*, 39, 6857-6866.
29. Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney Jr JF, Vita JA. (1996.) Ascorbic Acid Reverses Endothelial Vasomotor Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*. 93,1107-1113.
30. Levy Y, Kaplan M, Ben-Amotz A, Aviram M. (1996.) Effect of dietary supplementation of beta-carotene on human monocyte-macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein. *Isr J Med Sci*, 32, 473-478.
31. Lisa A. Burgon. (2012.) Practical Nutrition for Sports Medicine and Fitness Professionals.
32. Littarru GP, Tiano L. (2007.) Bioenergetic and Antioxidant Properties of Coenzyme Q10:Recent Developments. *Mol Biotechnol*, 37, 31-37.
33. Martin A, Frei B. (1997.) Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 1583–1590.
34. Meydani M. (2001.) Vitamin E and Atherosclerosis: Beyond Prevention of LDL Oxidation. *J Nutr*, 131, 366S-368S.
35. Molyneux SL, Young JM, Florkowski CM, Lever M, George PM. (2008.) Coenzyme Q10: Is There a Clinical Role and a Case for Measurement? *Clin Biochem Rev*, 29, 71–82.
36. Mottaghi A, Ebrahimof S, Angoorani P, Saboor-Yaraghi AA. (2014.) Vitamin A supplementation reduces IL-17 and RORc gene expression in atherosclerotic patients. *Scand J Immunol*, 80, 151-157.
37. Mottaghi A, Salehi E, Keshvarz A, Sezevar H, Saboor-Yaraghi AA. (2012.) The Influence of Vitamin A Supplementation on Foxp3 and TGF- β Gene

- Expression in Atherosclerotic Patients. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 5, 314–326.
38. Mühleib F. (1994.) Vitamini za dobru formu, ljepotu i zdravlje, DZS d.d., Zagreb
 39. Mykityn CE. (2006.) Anti-aging medicine: a patient/practitioner movement to redefine aging. *Soc Sci Med*;62:643-53.
 40. Petersen Shay K, Moreau RF, Smith EJ Hagen TM. (2008.) Is α -lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life*, 60, 362-367.
 41. Pine S. H., (1994.), *Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb.*
 42. Poon H. F. (2004.) Free radicals and brain aging, *Clin Geriatr Med*, 20 (329-359).
 43. Puljak A., Perko G., Mihok D., Radašević H. (2004). Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix*, 10(52), 98-102.
 44. Reaven PD, Ferguson E, Navab M, Powell FL. (1994.) Susceptibility of human LDL to oxidative modification. Effects of variations in beta-carotene concentration and oxygen tension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 14, 1162-1169.
 45. Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R, i sar. (2000). Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med*, 248, 377–86.
 46. Segundo M, Magalhães L, Reis S. (2007.) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta.*, 613, 1-19.
 47. Shahidi F. (2000.) Antioxidants in food and food antioxidants. *Mol Nutr Food Res*, 44,158-163.
 48. Sola S, Mir MQS, Cheema FA, Khan-Merchant N, Menon RG, Parthasarathy S, Khan BV. (2005.) Irbesartan and Lipoic Acid Improve Endothelial Function and Reduce Markers of Inflammation in the Metabolic Syndrome. *Circulation*, 111, 343-348.
 49. Solzbach U, Hornig B, Jeserich M, Just H. (1997). Vitamin C Improves Endothelial Dysfunction of Epicardial Coronary Arteries in Hypertensive Patients. *Circulation*, 96, 1513-1519.
 50. Stevanović J., Borozan S., Jović S., Ignjatović I. (2011). Fiziologija slobodnih radikala. *Vet. glasnik*, 65(1-2), 95-107.
 51. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. (2000.) Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*;3:373-84.
 52. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. (1996.) Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 97, 22–28.
 53. Ting HH, Timimi fK, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. (1997.) Vitamin C Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Forearm Resistance Vessels of Humans With Hypercholesterolemia. *Circulation*. 95, 2617-2622.
 54. Tomasetti M, Alleva R, Borghi B, Collins AR. (2001.) In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage. *FASEB J*, 15, 1425-1427.
 55. Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B. (2003.) *Interna medicina*. Zagreb, Ljevak, str. 584-589; 408-409.
 56. Wang D, Yan X, Xia M, Yang Y, Li D, Li X, Song F, Ling W. (2014.) Coenzyme Q10 promotes macrophage cholesterol efflux by regulation of the activator protein-1/miR-378/ATP-binding cassette transporter G1-signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 1860-1870.
 57. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44(4):275-95.
 58. Wollin SD, Jones PJ. (2003.) α -Lipoic Acid and Cardiovascular Disease. *J Nutr*,133, 3327-3330.
 59. Wollin SD, Jones PJ. (2003.) α -Lipoic Acid and Cardiovascular Disease. *J Nutr*,133, 3327-3330.
 60. Wootton-Beard PC, Ryan L. (2011.) Improving public health: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res Int*, 44, 3135-3136.
 61. Xu Q, Parks CG, DeRoo LA, Cawthon RM, Sandler DP, Chen H. (2009.) Multivitamin use and telomere length in women. *Am J Clin Nutr*;89:1857-63.
 62. Zhang WJ, Frei B. (2001.) α -Lipoic acid inhibits TNF- α -induced NF- κ B activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *FASEB J*,15, 2423-2432.

ANTIOXIDANTS IN THE FIGHT AGAINST CLINICAL DISEASES AND AGING PROCESS

Halida Mahmutbegović¹, Amra Dervišević²

¹ PZU Apoteke „Ibn Sina“, Ismeta Mujezinovića 29, 75000 Tuzla; Bosna i Hercegovina;
Europski Univerzitet „Kallos“, Ul. Maršala Tita 2A-2B, 75000 Tuzla; Bosna i Hercegovina.

² Europski Univerzitet „Kallos“, Ul. Maršala Tita 2A-2B, 75000 Tuzla; Bosna i Hercegovina.

ABSTRACT

Excessive creation and accumulation of free radicals causes oxidative stress, which is involved in the pathophysiology of many different clinical diseases such as: cardiovascular diseases, immune system disorders, diseases of lungs, digestive system, kidneys, central nervous system, visual impairment, ischemia/reperfusion conditions, diabetes mellitus, development of malignant diseases, and also the physiological aging process.

Antioxidant is a substance that can successfully remove prooxidants by creating products that are not toxic and do not damage the cells. Antioxidants protect the organism from prooxidative action and they destroy already created radicals or repair damage produced by their action in the cells.

Since our organism is exposed to various sources of oxidative stress, it is necessary to do everything in order to protect it. The first rule is to increase physical activity and to balance the diet that leads to a healthier life. It has been proven that nutraceuticals provide physiological benefits, reduce the risk of chronic diseases and slow aging, beyond their basic nutritional functions. Such products include: food supplements, genetically modified "designer" foods, herbal extracts, etc..

Today, there are numerous antioxidant preparations that can be used to reduce diseases and aging of the organism. It is not recommended to use a high dose of only one antioxidant, but a combination of antioxidants at doses near the RDA. Antioxidants used so protect the body from the onset of atherosclerosis, myocardial infarction, and inflammatory processes, but also enhance tissue reconstruction, including the liver, heart, blood vessels and skin.

The combination of effective cosmetics and nutritional supplements is a new multiple approach to reduce the biological aging process of the skin. Coenzyme Q10, alpha-lipoic acid, beta-carotene, vitamins A, C, E, and many other antioxidants can be used locally and per os in order to improve skin quality and reduce degenerative changes of the skin.

Key words: free radicals, antioxidants, nutraceuticals, aging, diseases of the organism

Corresponding author: Halida Mahmutbegović, MPharm.

e-mail: halida_mahmutbegovic@hotmail.com;

Phone:+38762 368 475.

MODULIRANJE OKSIDACIJSKIH STANJA FUNKCIONALNIH GRUPA U DIZAJNIRANJU LIJEKOVA

Amer Sarajlić¹, Miralem Smajić¹, Amra Džambić¹

¹ Farmaceutski Fakultet, Univerzitet u Tuzli, Univerzitetaska br. 8, 75000 Tuzla

SAŽETAK

Odnos strukture i aktivnosti (*Structure-activity relationship* - SAR) predstavlja relaciju između 2D ili 3D hemijske strukture molekula i njegove biološke aktivnosti. SAR analiza omogućava određivanje hemijskih grupa odgovornih za izazivanje ciljnih bioloških efekata u organizmu. Ona omogućava racionalne modifikacije efekta ili potentnosti bioaktivnih jedinjenja promjenama hemijske strukture. Na temelju poznavanja ovog dijela hemije došlo je do otkrića i napredovanja u dizajniranju lijekova.

Medicinska hemija istražuje kako hemijska struktura utiče na biološku aktivnost. Takođe, uključuje i istraživanje već postojećih tržišnih lijekova, njihovih bioloških svojstava i njihovog kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti (QSARs). Modeli kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (QSAR), matematički su modeli koji se mogu upotrebljavati za predviđanje fizikalno-hemijskih i bioloških svojstava spojeva te svojstava spojeva koji se odnose na njihovu sudbinu u organizmu na temelju poznavanja njihove hemijske strukture.

Neophodno je razumjeti ne samo mehanizam pomoću kojeg lijek sprovodi svoj efekat, već i kako molekularna i fizičko-hemijska svojstva molekula utiču na farmakokinetiku (apsorpcija, distribucija, metabolizam, toksičnost i eliminacija) i farmakodinamiku (šta lijek radi organizmu). Bitno je istaknuti i da stereochemija ima sve značajniju ulogu u dizajnu lijekova. Fizičko-hemijska svojstva molekule lijeka zavise ne samo od sastava funkcionalnih grupa koje su prisutne u molekulu, već i od prostornog uređenja ovih grupa. Jedan, od svaka četiri lijeka koji su trenutno na tržištu predstavljaju neku vrstu izomerne smjese. Za mnoge od ovih lijekova, biološka aktivnost može postojati samo u jednom izomeru.

Tokom protekle dvije decenije, tehnološki napredak u eksperimentalnim metodama, kao što su NMR i rentgenska kristalografija, omogućili su da na strukturi zasnovani dizajn lijekova (SBDD) zauzme vitalnu poziciju u medicinskoj hemiji. Zahvaljujući naglom povećanju dostupnosti 3D struktura proteinskih meta i brzog napretka u računarskoj hemiji, SBDD je postao integralna strategija za proizvodnju i optimizaciju vodećih komponenti.

Ključne riječi: dizajn lijekova, funkcionalne grupe, farmakofore

Amer Sarajlić

Tel: +387 35 320 990

e-mail: amer.sarajlic@hotmail.com

1. UVOD

Medicinska hemija predstavlja interdisciplinarnu nauku koja ima puno zajedničkih interesnih sfera izučavanja sa organskom hemijom, biohemijom, računarskom hemijom, farmakologijom, farmakognozijom, molekularnom biologijom i fizikalnom hemijom. Ova grana hemije je uključena u procese identifikacije, dizajna, sinteze i razvoja novih lijekova koji su sigurni i efikasni za terapijsku

primjenu na ljudima i životinjama. Takođe, uključuje i istraživanje tržišnih lijekova, njihovih bioloških svojstava i njihovog kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti (QSARs).

Medicinska hemija se bavi istraživanjem utjecaja hemijske strukture na biološku aktivnost molekula. Neophodno je dobro poznavati i razumjeti mehanizam pomoću kojeg lijek ispoljava svoj efekat, kao i način na koji molekularna i fizičko-hemijska svojstva molekula utiču na farmakokinetiku (apsorpcija, distribucija, metabolizam,

toksičnost i eliminacija) i farmakodinamiku (uticaj lijeka na organizam). Termin „fizikalno-hemijska“ svojstva odnosi se na uticaj funkcionalnih grupa molekula na kiselinsko-bazna svojstva, rastvorljivost u vodi, koeficijent raspodjele, kristalnu strukturu, stereohemijska svojstva i sposobnost interakcije sa biološkim sistemima, kao što su aktivna mjesta enzima i mjesta receptora. Za dizajniranje boljih lijekovitih sredstava mora se procijeniti relativni doprinos svake funkcionalne grupe u ukupnim fizičko-hemijskim svojstvima molekule. Studije ove vrste podrazumijevaju modifikaciju molekula na sistematski način, uz praćenje uticaja ovih promjena na biološku aktivnost molekule. Takve studije nazivaju se odnosima strukture i aktivnosti - to je odnos kako strukturne osobine molekula pozitivno ili negativno doprinose biološkoj aktivnosti. Hemijska jedinjenja, obično izolovana iz biljaka i drugih prirodnih izvora, su korištena hiljadama godina kako bi ublažila bol, dijareju, infekcije i razne druge bolesti. Do 19. stoljeća, ti lijekovi su prvenstveno bili sirovi preparati biljnog materijala nepoznatog sastava. Revolucija u sintetičkoj organskoj hemiji tokom 19. stoljeća omogućila je identifikaciju struktura aktivnih sastojaka ovih prirodno pripremljenih lijekova, a nakon toga i sintezu lijekova koji će imati još bolje efekte. Određivanjem molekularnih struktura aktivnih komponenti ovih kompleksnih smjesa, omogućeno je bolje razumijevanje djelovanja ovih aktivnih sastojaka.

2. VEZA IZMEĐU HEMIJSKE STRUKTURE I BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

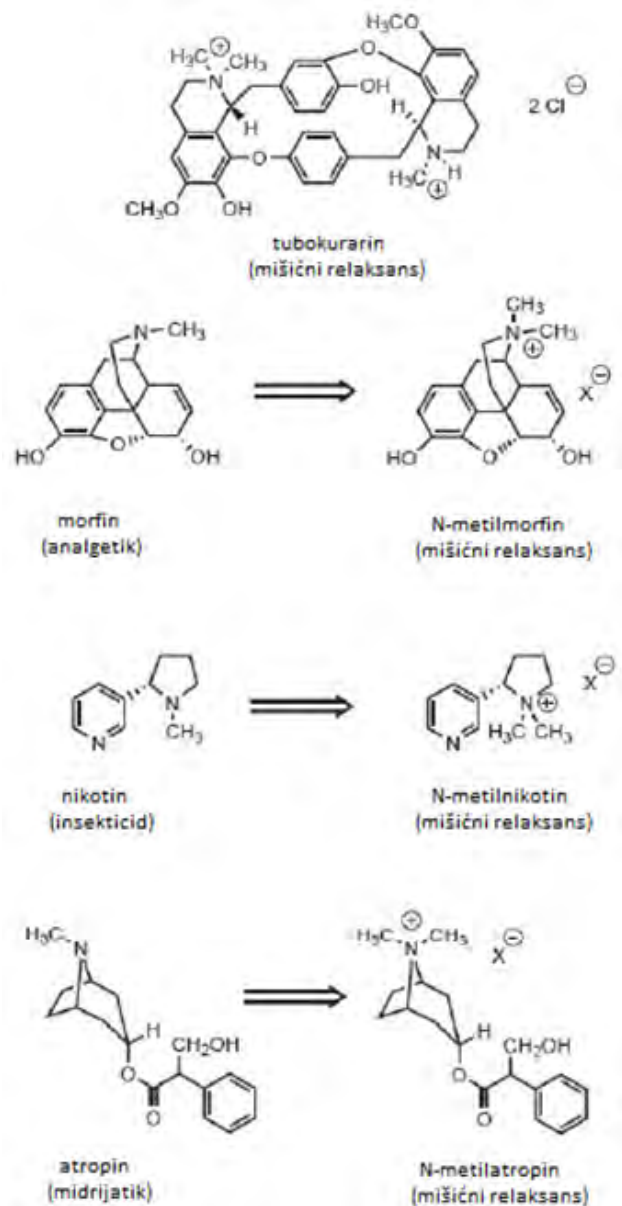
Rane studije o vezi između hemijske strukture i biološke aktivnosti provodili su Crum-Brown i Fraser 1869. godine. Oni su pokazali da mnoga jedinjenja, koja sadrže tercijarne amino grupe, djeluju kao mišićni relaksansi kada se pretvore u kvaternarna amonijumska jedinjenja. Molekuli sa značajno različitim farmakološkim svojstvima, kao što su strihnin (konvulziv), morfin (analgetik), nikotin (insekticid) i atropin (antiholinergik), metilacijom mogu biti pretvoreni u mišićne relaksanse sa sličnim farmakološkim svojstvima kao i tubokurarin (mišićni relaksans). Crum-Brown i Fraser su stoga zaključili da je za miorelaksantno djelovanje u ovim strukturama neophodno prisustvo kvaternarnih amonijevih grupa. Ova početna hipoteza je kasnije odbačena otkrivanjem acetilholina, prirodnog neurotransmitera i aktivatora mišićne kontrakcije. Iako je ova hipoteza bila pogrešna, pokazala je koncept da molekularna struktura utiče na biološku aktivnost hemijskih jedinjenja i da promjene u strukturi dovode do promjena u biološkoj aktivnosti. (Crum-Brown A, 1869)

Sa otkrićem Crum-Browna i Fradera da spojevi koji u svojoj strukturi sadrže kvaternarne amonijeve grupe mogu proizvesti miorelaksantno dejstvo, naučnici su počeli sa istraživanjima i drugih funkcionalnih grupa koje mogu proizvesti određeni specifični biološki odgovor. U to vrijeme, smatralo se da su specifične hemijske grupe, ili jezgre (prstenovi), odgovorne za specifičnu biološku aktivnost. Ovo je dovelo do postulata, da „jedna funkcionalna grupa daje jednu biološku aktivnost“. (Aliens EJ, 1971)

Čak i nakon otkrića acetilholina od strane Loewia ili Navratia, ovo se i dalje smatralo dogmom i trebalo je puno vremena da se opovrgne. (Loewi O, 1926)

3. SELEKTIVNOST DEJSTVA LIJEKA I RECEPTORA ZA LIJEKOVE

Iako su strukture mnogih lijekova i ksenobiotika ili sastav njihovih funkcionalnih grupa, bili poznati još početkom 20. stoljeća, način na koji oni ispoljavaju svoje efekte još uvijek je bio nepoznat. Koristeći svoja zapažanja s obzirom na ponašanje mikroorganizama, Ehrlich je razvio koncept receptora za lijekove. Zamisljao je da su određeni "bočni lanci" na površini ćelija "komplementarni" bojama (ili lijekovima) i na taj način bi ostvarivali međusobnu komunikaciju. Kada je riječ o antimikrobnim komponentama, njihovom interakcijom sa „bočnim lancima“ na površini ćelija, dolazi do stvaranja toksičnih

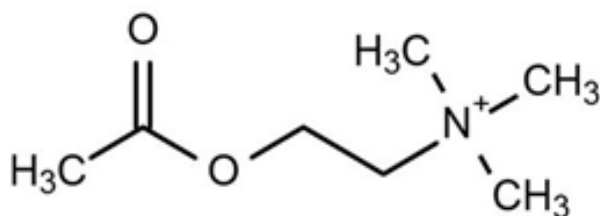


Slika 1. Efekti metilacije na biološku aktivnost

efekata. Ovaj koncept je bio prvi opis onoga što je kasnije postalo poznato kao hipoteza receptora za objašnjavanje biološkog djelovanja hemijskih entiteta. Ehrlich je istraživao o selektivnoj aktivnosti lijekova putem koncepta "magičnog metka". Smatrao je da će ovakva selektivnost omogućiti potpuno popravljavanje stanja bolesti bez značajne štete na organizam koji se liječi. (Ehrlich P, 1957)

Ovo je kasnije modificirao Alberti, što se danas smatra "selektivnom toksičnošću". Primjer slabe selektivnosti dokazan je kada je Ehrlich razvio organske arsenale koji su toksični za tripanozome kao rezultat njihove ireverzibilne reakcije sa tiolnim grupama (-SH) na vitalnim proteinima. Formiranje As-S veza rezultiralo je smrću ciljnih organizama. Nažalost, ova jedinjenja su bila otrovna ne samo za ciljni organizam, već i za domaćina kada su postignuti određeni nivoi arsena u krvi. (Albert A, 1982)

Antagonisti ovih peptida su obično manje veličine od prirodnog jedinjenja. Međutim, bez obzira na vrstu neurotransmitera (biogeni amini ili peptidi), i agonisti i antagonisti dijele zajednička strukturna svojstva sa neurotransmitterom na koji utiču. Ovo daje podršku konceptu da struktura molekule, njen sastav i raspored funkcionalnih grupa određuje vrstu farmakološkog efekta koji posjeduje. Na primjer, jedinjenja koja predstavljaju mišićne relaksanse, koji djeluju preko holinergičkog nervnog sistema, posjeduju kvaternarnu amonijum ili protoniranu tercijarnu amonijumsku grupu i veća su od acetilholina (poređenje acetilholina sa tubokurarinom). (Ing HR, 1940)



Slika 2. Acetilholin, neurotransmiter i mišićni relaksans

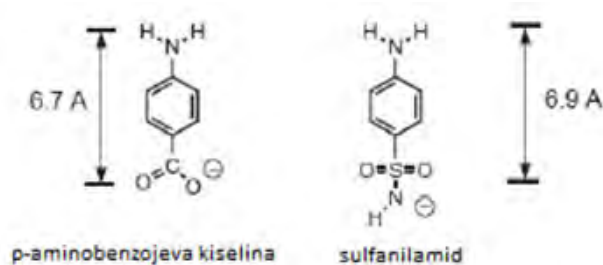
SAR (odnos strukture i aktivnosti) je osnovni fokus izučavanja medicinske hemije. Slični molekuli ispoljavaju slična biološka dejstva u kvalitativnom smislu. U skladu sa tim, strukturni elementi (funkcionalne grupe) unutar molekula najčešće doprinose dodatnim fizičko-hemijskim osobinama molekula, a samim time i njihovom biološkom djelovanju. Zbog toga molekule sličnih struktura uglavnom pripadaju jednoj farmakološkoj klasi (histaminski H1 antagonisti, histaminski H2 antagonisti, β -adrenergički antagonisti). U potrazi za boljim ljekovitim sredstvima, neophodno je odrediti koje su funkcionalne grupe u određenoj strukturi važne za farmakološku aktivnost i kako se ove grupe mogu modificirati kako bi se proizvela snažnija, selektivnija i sigurnija jedinjenja.

Sulfanilamidni antibiotici su primjer kako različite funkcionalne grupe mogu dati hemijske entitete sa sličnim fizičko-hemijskim svojstvima. Na slici 3. prikazane su strukture sulfanilamida i p-aminobenzojeve kiseline (PABA). 1940. godine Woods je pokazao da PABA antagonizira antibakterijsko dejstvo sulfanilamida (i

drugih antibiotika na bazi sulfonilamida) te da PABA i sulfonilamid imaju slična sterična i elektronska svojstva. Oba molekula sadrže kisele funkcionalne grupe, PABA sadrži aromatičnu karbonsku kiselinu, a sulfanilamid aromatični sulfonamid. Kada su ionizovani pri fiziološkom pH, oba jedinjenja imaju sličnu elektronsku konfiguraciju, a rastojanje između jonizovane kiseline i slabije bazične amino grupe je takođe vrlo slično. Nije iznenađenje da sulfanilamid djeluje kao antagonist u metabolizmu PABA kod bakterija. (Woods DD, 1940)

3.1. Biološke mete za djelovanje lijekova

Da bi molekuli lijekova pokazali svoju farmakološku aktivnost, moraju stupiti u interakciju sa svojom biološkom metom, obično receptorom, enzimom, nukleinskom kiselinom ili podražljivom membranom ili drugim biopolimerom. Ove interakcije se javljaju između funkcionalnih grupa pronađenih u molekuli lijeka i onih pronađenih unutar bioloških meta. Sposobnost vezivanja molekula lijeka sa biološkim metama ovisi od brojnih fizičko-hemijskih karakteristika, kao što su acido-bazni status, srodnost jonizacija, oblik i veličina funkcionalnih grupa, trodimenzionalna prostorna orijentacija. Karakteristike funkcionalnih grupe su sredstva za bolje razumijevanje ukupne apsorpcije molekula, distribucije, metabolizma i izlučivanja, kao i potencijalne interakcije sa biološkim ciljem.



Slika 3. Ionizovani oblici p-aminobenzojeve kiseline (PABA) i sulfanilamida - poređenje razdaljine između amina i jonizovanih kiselina svakog jedinjenja.

Obratite pažnju na to koliko su međusobno slični

4. DIZAJN LIJEKOVA: OTKRIVANJE I STRUKTURNA MODIFIKACIJA VODEĆIH KOMPONENTI

4.1. Proces otkrivanja lijekova

Proces otkrivanja lijekova započinje sa identifikacijom novih, prethodno neotkrivenih, biološki aktivnih komponenti, često označavanih kao pogoci ili „hits“, koji se obično otkrivaju ispitivanjem odnosno „screeningom“ velikog broja jedinjenja za koje se smatra da mogu da posjeduju željena biološka svojstva. U nastavku će biti predstavljeni različiti pristupi koji se koriste za identifikaciju „pogodaka“ i načina na koji se oni mogu pretvoriti u „vodeće“ komponente, a potom i u potencijalne kandidate za lijekove koji su pogodni za klinička ispitivanja.

„Pogoci“ mogu poticati iz prirodnih izvora kao što su biljke, životinje ili gljive, zatim, iz sintetičkih ili hemijskih izvora. Modifikacije hemijskih i funkcionalnih grupa „pogodaka“ provode se u cilju poboljšanja farmakoloških, toksikoloških, fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina „pogodaka“ kako bi se oni preveli u vodeće komponente.

Modifikacije hemijske ili funkcionalne grupe "hitova" se izvode u cilju poboljšanja farmakoloških, toksikoloških, fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina "hits" jedinjenja u "vodeće" jedinjenje. Vodeća komponenta koju treba optimizirati trebalo bi da ima poznatu hemijsku strukturu i da posjeduje poznati mehanizam djelovanja, uključujući i poznavanje njegovih funkcionalnih grupa (farmakoforičnih grupa) koje su prepoznate od strane receptora / aktivnog mjesta i odgovorne su za afinitet tog molekula prema ciljnom mjestu na receptoru.

"Optimizacija vodeće komponente" je proces u kome se izvršavaju modifikacije funkcionalnih grupa vodećeg jedinjenja kako bi se poboljšalo njegovo prepoznavanje, afinitet i geometrija vezivanja farmakoforičnih grupa za ciljano mjesto (receptor ili enzim); njegova farmakokinetika; ili njegova reaktivnost i stabilnost prema metaboličkoj degradaciji. Zadnji korak procesa otkrivanja lijekova podrazumijeva prevođenje vodećeg jedinjenja u kandidata za lijek, koji je siguran i pogodan za korištenje u kliničkim ispitivanjima kod ljudi, uključujući i pripremu odgovarajuće formulacije lijeka.

Tokom protekle dvije decenije, tehnološki napredak u eksperimentalnim metodama, kao što su NMR i rentgenska kristalografija, omogućili su da na strukturi zasnovani dizajn lijekova (SBDD) zauzme vitalnu poziciju u medicinskoj hemiji. Zahvaljujući naglom povećanju dostupnosti 3D struktura proteinskih meta i brzog napretka u računarskoj hemiji, SBDD je postao integralna strategija za proizvodnju i optimizaciju vodećih komponenti. Pored toga, računarski podržani molekularni "docking" ima neke značajne prednosti u odnosu na tradicionalni skrining velikog protoka (HTS). Medicinski hemičari sada imaju pristup strukturnim informacijama o molekulima kandidatima vezanim za terapijski cilj u roku od nekoliko dana od sinteze jedinjenja. SBDD dozvoljava stvaranje novih liganda sa aranžmanom atoma ili molekularnih fragmenata koji su u skladu sa džepom za vezivanje. Ova sposobnost generisanja novih struktura koje nisu pronađene ni u jednoj bazi podataka je postavila SBDD kao ključnu metodu za savremeno otkrivanje lijekova. (Kemp JD, 1936)

4.2. Prirodni pregled proizvoda

Najteži aspekt u otkrivanju lijekova jeste možda otkrivanje vodeće komponente. Do kraja XIX stoljeća, razvoj novih hemijskih jedinjenja za medicinske svrhe postignut je prvenstveno kroz upotrebu prirodnih proizvoda, obično izvedenih iz biljnih izvor. Pošto su evropske kolonijalne sile otkrile nova zemljišta na zapadnoj hemisferi i kolonizovanoj Aziji, Evropljani su od autohtonih stanovnika iz novootkrivenih zemalja naučili lijekove za mnoge bolesti a koji su izolovani iz biljaka.

Salicilna kiselina je izolovana iz kore stabla vrbe (Salicis cortex), nakon što se saznalo da su Indijanci koristili kore kako bi tretirali inflamatorne bolesti. Strukturna optimizacija ovog vodećeg jedinjenja (salicilna kiselina) kompanije Bayer Corporation iz Njemačke rezultirala je proizvodnjom acetilsalicilne kiseline ili aspirina, prvim nesteroidnim antiinflamatornim agensom. Južnoamerički domoroci su koristili čaj dobijen kuhanjem kore kininovca (Cinchonae cortex) za liječenje vrućice i groznice.

Dalje studije u Evropi dovele su do izolacije kinina i kinidina, koji su kasnije korišteni za liječenje malarije i srčanih aritmija.

Prateći "vodeće komponente" iz narodne medicine, krajem 19. i početkom 20. stoljeća hemičari su počeli da traže nove lijekove iz biljnih izvora i da ih ispituju za mnoge vrste farmakoloških aktivnosti. Ovaj pristup otkrivanja lijekova se često naziva "pregledom ili skriningom prirodnih proizvoda".

Prije sredine sedamdesetih godina, ovo je bio jedan od glavnih pristupa za dobijanje novih hemijskih entiteta kao "vodećih komponenti" za nove lijekove. Nažalost, ovaj pristup je prestao biti od koristi i zamijenjen je racionalnim pristupima dizajniranju lijekova tokom tog perioda. Povećana svijest o krhkosti ekosistema, posebno kišnih šuma, podstakla je ponovno oživljavanje pregleda prirodnih proizvoda prije nego izumru. Kao rezultat toga, proizvedeno je novo polje farmakologije pod nazivom "etnofarmakologija", čiji je zadatak identifikacija potencijalnih izvora prirodnih proizvoda sa ljekovitim svojstvima zasnovanim na izvornom znanju.

Jedinjenja izolovana iz prirodnih izvora su obično ispitivana u jednom ili više bioloških ispitivanja za bolesti koje biljni materijal navodno liječi. Zanimljivo je da liječenje različitih bolesti može zahtijevati različite metode pripremanja (npr. kuhanje, žvakanje ili direktna primjena na rane) ili upotrebu različitih dijelova iste biljke (npr. korijenje, stablo, listovi, cvijeće ili biljni sokovi). Kao što se ispostavilo, svaki način primjene ili dio biljke koji se koristi može proizvesti jedno ili više različitih hemijskih jedinjenja koja su neophodna za postizanje željenog ishoda.

4.3. Otkrivanje lijekova putem slučajnog skrininga sintetičkih organskih jedinjenja

Pristup slučajnog skrininga sintetičkih organskih jedinjenja u otkrivanju novih hemijskih entiteta za određenu biološku aktivnost započeo je u 1930-im, nakon otkrivanja klase antibakterijskih sulfonamida. Sva jedinjenja koja su dostupna istraživaču (prirodni proizvodi, sintetičke molekule), bez obzira na strukturu, testirane su farmakološkim testovima koji su bili dostupni u to vrijeme. Ovaj pristup slučajnog skrininga primijenjen je i tokom šezdesetih i sedamdesetih godina u pokušaju da se pronađu agensi koji su efikasni protiv raka. Neke grupe nisu ograničile svoje analize da identifikuju određenu vrstu biološke aktivnosti, već su testirali jedinjenja u širokom spektru. Ovaj pristup skrininga velikih razmjera (large-scale screening) vodećih ljekovitih komponenti označava se kao visokopropusni skrining, koji podrazumijeva istovremena biološka ispitivanja hiljada jedinjenja u stotinama do više hiljada bioloških testiranja.

Ovi tipovi bioloških ispitivanja postali su mogući sa pojavom računarsko - kontrolisanih robotskih sistema za ispitivanja i pojave tehnika kombinatorne hemije za sintezu velikog broja jedinjenja u malim (miligramskim) količinama. Ova vrsta slučajnog skrininga je poslužila kao osnov za namjenski ciljani ispitivanja i racionalne tehnike dizajna lijekova.

4.4. Otkrivanje lijekova namjenski ciljanim skriningima i racionalni dizajn lijekova

Racionalni dizajn lijekova je više usmjereni pristup koji koristi veće znanje (strukturne informacije) o receptorima za lijekove (metama) ili jednom od svojih prirodnih liganda kao osnove za dizajniranje, identifikiranje ili stvaranje "vođećih" komponenti lijekova. Testiranje se obično vrši sa jednim ili dva modela (npr. specifični receptorski sistemi ili enzimi) na osnovu terapeutskog cilja. Komponenta dizajna lijekova često podrazumijeva molekularno modeliranje i korištenje odnosa između kvantitativne strukture i aktivnosti (QSAR) kako bi se bolje definisale fizičko-hemijske osobine i farmakoforične grupe koje su neophodne za biološku aktivnost.

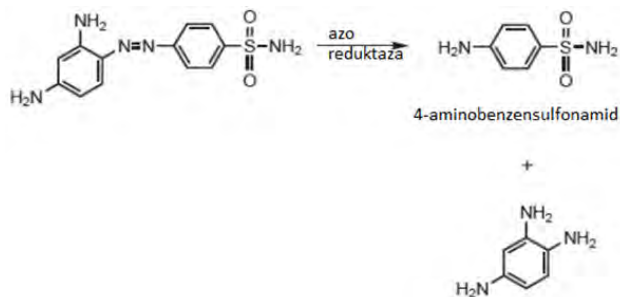
Razvoj QSAR-a oslanja se na sposobnost ispitivanja višestrukih odnosa između fizičkih osobina i bioloških aktivnosti. U klasičnom QSAR (npr. analiza tipa Hansch), jednačina definira biološku aktivnost kao linearnu slobodnu energetska vezu između fizičko-hemijskih i / ili strukturnih osobina. To omogućava procjenu prirode sila interakcije između lijeka i njegove biološke mete, kao i sposobnost predviđanja aktivnosti u molekulima. Ovi pristupi su bolji za razvoj "vođećeg" jedinjenja u kandidata za lijek nego za "otkrivanje vođećeg" jedinjenja.

4.5. Otkrivanje lijekova putem studije metabolizma lijekova

Novi lijekovi su također "otkriveni" i istraživanjem metabolizma molekula lijekova koji su već klinički kandidati za lijek ili se već nalaze na tržištu. U ovom postupku, metaboliti poznatih lijekova se izoluju i analizira se njihova biološka aktivnost pomoću istih meta ili širih sistema skrininga meta. Širi sistemi skrininga su korisniji ako je metabolit koji se procenjuje hemijska struktura koja se radikalno mijenja od roditeljskog molekula kroz neuobičajenu metaboličku reorganizacijsku reakciju. U većini slučajeva, metabolit se drastično ne razlikuje od roditeljskog molekula i stoga se očekuje da će pokazati slične farmakološke efekte. Prednost ovakve procjene kandidata za lijekove jeste to što metabolit može imati bolje farmakokinetičke osobine, kao što je duže trajanje djelovanja, bolja oralna apsorpcija ili manja toksičnost sa manje neželjenih efekata (npr. terfenadin i njegov antihistaminski hidrosilovani metabolit, feksofenadin).

Kako se ispostavilo, na ovaj način su otkriveni sulfonamidni antibakterijski agensi. Pronađeno je da azo boja Prontosil ima samo antibakterijska dejstva in vivo. Uskoro je otkriveno da je ovo jedinjenje zahtijevalo metaboličku aktivaciju putem redukcije diazo grupe za proizvodnju aktivnog metabolita 4-aminobenzen sulfonamida (slika 4.).

Sulfonamid imitira fizičko-hemijske osobine para-aminobenzojeve kiseline (PABA), ključne komponente mikrobnog metabolizma, tako da nije iznenađenje zašto sulfonamid djeluje kao kompetitivni inhibitor enzima za koji je PABA supstrat.



Slika 4. Metabolička konverzija prontosila u 4-aminobenzenesulfonamid

4.6. Otkrivanje lijekova iz posmatranja neželjenih efekata

Nakon otkrivanja neželjenih efekata u pacijentu ili životinjskom modelu, može doći do daljeg razvoja nove terapijske upotrebe određenog hemijskog entiteta. Otkrivanje novih vođećih jedinjenja pomoću profilisanja neželjenih efekata postojećih agenasa razmotreno je u nastavku.

Jedan od interesantnijih scenarija razvoja lijeka jeste razvoj antipsihotika fenotiazina. Molekule sa ovom vrstom biološke aktivnosti mogu se pratiti još od razvoja prvih antagonista histaminskih H1 receptora razvijenih u 1930-im.

1937. godine Bovet i Staub prvi su prepoznali da bi trebalo biti moguće antagonizirati efekte histamina i time tretirati alergijske reakcije. Oni su testirali jedinjenja za koja je poznato da djeluju na autonomni nervni sistem i, konačno, otkrili su da benzodiodoksani (slika 5.) značajno antagonizuju efekte histamina.

Tokom pokušaja poboljšanja antihistaminergičke aktivnosti benzodiodoksana, otkriveno je da su fenol-supstituirani etanol-amini također pokazali značajnu antihistaminergičnu aktivnost.9

Dalji razvoj ove klase generisao je dvije različite klase antihistaminika, klasu difenhidramina predstavljenog difenhidraminom (slika 5.) i klasom etilendiamina, predstavljenim tripelennaminom (slika 5.)

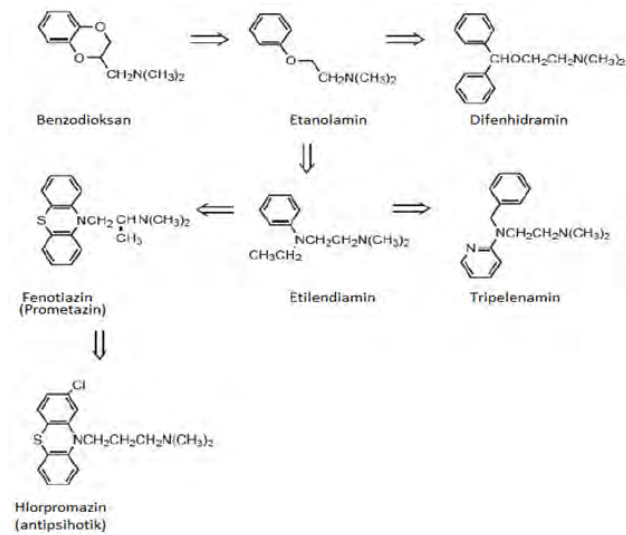
Uvođenje aromatičnih prstenova etilendiamina u krutu i planarnu tricikličnu strukturu fenotiazina proizvelo je molekule (npr. Promediazin) sa dobrim antihistaminergičkim dejstvom i relativno jakim sedativnim svojstvima.

U početku, ova jedinjenja su bila namijenjena da se koriste kao antihistaminici, ali njihova jaka sedativna svojstva dovela su do njihove upotrebe kao potencijalnih agenasa za anesteziju. (Laborit H, 1952)

Dalji razvoj povećanja sedativnosti fenotiazina dovodi do razvoja hlörpromazina 1950. godine. (Charpentier P, 1952)

Pronađeno je da hlörpromazin ima tendenciju da izaziva spavanje, ali za razliku od antihistaminskih fenotiazina,

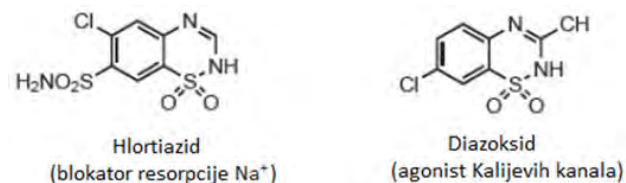
takođe je proizvodio nezainteresiranost kod pacijenata prema njihovoj okolini (trankilizirajući efekat). Kod pacijenata sa psihijatrijskim poremećajima zabilježen je ameliorativni (poboljšani) efekat na psihozu i otklanjanje anksioznosti i uznemirenosti. Ova zapažanja sugeriraju da hlörpromazin ima potencijal za liječenje psihijatrijskih poremećaja. Stoga, ono što je započeo kao pokušaj poboljšanja antihistaminergičke aktivnosti na kraju je rezultiralo sasvim novom klasom hemijskih entiteta korisnih za liječenje nepovezanih poremećaja. (Delay J, 1941)



Slika 5. Razvoj fenotiazinskih vrsta antipsihotičkih lijekova

Još jedan primjer kako se novi hemijski entiteti mogu izvući iz biološki nepovezanih molekula ilustriran je razvojem diazoksida, agonista kalijevog kanala (slika 6.).

Ovaj molekul razvijen je kao rezultat zapažanja da tiazidni diuretici, kao što je hlörtiazid, ne samo da ispoljavaju diuretsku aktivnost, zbog inhibicije apsorpcije natrijuma u distalnim tubulima, već ispoljavaju i direktan efekat na bubrežnu vaskulaturu. Strukturna modifikacija za poboljšanje ovog direktnog efekta dovela je do razvoja diazoksida i srodnih agonista kalijevog kanala koji se koriste za liječenje hipertenzije.



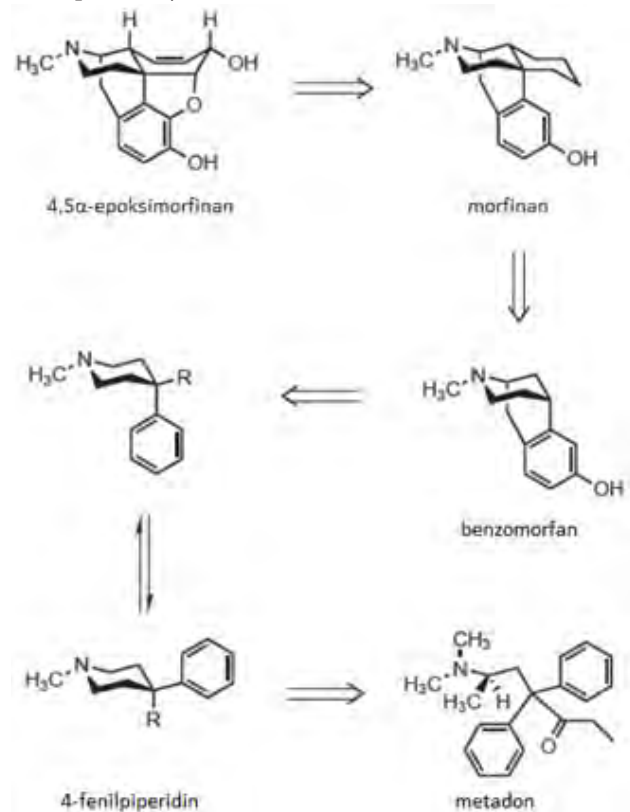
Slika 6. Strukturna sličnost između hlörtiazida (diuretik) i diazoksida (antihipertenziv)

4.7. Usavršavanje strukture vodeće komponente

4.7.1. Određivanje farmakofora

Jednom kada je otkriveno "početno" jedinjenje za određenu terapijsku upotrebu, sljedeći korak je identifikacija farmakoforičnih grupa.

Farmakofor molekule lijeka je onaj dio molekula koji sadrži esencijalnu funkcionalnu grupu koja se direktno veže za aktivno mjesto biološke mete radi postizanja željene biološke aktivnosti. S obzirom na to da interakcije lijek-meta mogu biti veoma specifične (mogu se predstaviti kao odnos ključ (lijek) i brava (receptor, meta), farmakofor može predstavljati veoma mali dio molekula.



Slika 7. Morfinski farmakofor i njegov odnos prema analgetičkim derivatima

U mnogim slučajevima, veoma strukturno složeni molekuli se mogu "prevesti" u jednostavnije strukture sa zadržavanjem farmakoforičnih grupa i uz održavanje željenog biološkog djelovanja.

Primjer ovoga je opioidni analgetik, morfin, tetraciklično jedinjenje sa pet hiralnih centara. Uproštavanje strukture morfina je smanjilo i broj neželjenih efekata, a smanjenje broja hiralnih centara je znatno pojednostavilo sintezu derivata morfina.

Slika 7. pokazuje kako je struktura morfina pojednostavljena u potrazi za molekulima sa manje neželjenih efekata, kao što su depresija disajnih puteva i izazivanje zavisnosti. U okviru svake klase su analozi koji su manje jaki, jednaki ili mnogo jači od morfina.

Farmakofora morfina se sastoji od tercijarnog alkilamina koji je najmanje četiri atoma udaljen od aromatičnog prstena.

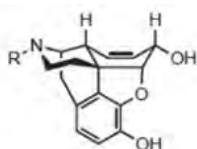
4.7.2. Promjene u alkilnim lancima: dužina lanca, grananje i prstenovi

Povećanje ili smanjenje dužine alkilnog lanca, grananje i promjene veličine prstena mogu imati veliki uticaj na jačinu i farmakološku aktivnost molekula.

Promjena dužine alkilnog lanca za jednu CH₂ grupu ili granu, mijenja lipofilni karakter molekula te stoga i njegove osobine apsorbacije, distribucije i izlučivanja. Ako je alkilni lanac direktno uključen u interakciju sa biološkom metom, onda ovakve promjene mogu uticati i na kvalitet tih interakcija.

Molekuli čija je konformacija fleksibilna mogu postati manje fleksibilni ako se grananje uvodi na ključnu poziciju alkilnog lanca ili ako je alkilni lanac inkorporiran u ekvivalentni prsten. Promjene u konformaciji mogu promijeniti prostorni odnos između farmakoforičnih (funkcionalnih) grupa u molekulu i na taj način uticati na interakcije sa biološkom metom. Male strukturne promjene su važne prilikom projektovanja strukturnih analoga.

Kako povećanje dužine lanca ugljovodnika ima značajne efekte ne samo na jačinu, već i na djelovanje lijeka (agonist protiv antagonista) može se uočiti na primjeru niza N-alkil morfin analoga (slika 7.).



R	Farmakološka aktivnost
—CH ₃	analgetik (morfin)
—CH ₂ CH ₃	opioidna agonistička aktivnost opada
—CH ₂ CH ₂ CH ₃	opioidna antagonistička aktivnost raste
—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	neaktivan i kao opioidni agonist i antagonist
—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	opioidna antagonistička aktivnost raste
—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	
—CH ₂ CH ₂ —	14x jača aktivnost od morfina

Slika 8. Uticaj produženja alkilnog lanca na aktivnost morfina

U ovom nizu, produženje lanca (homologacija) R=CH₃ (morfin) u R=CH₂CH₂CH₃ (N-propilnormorfin) dovodi do izrazitog smanjenja agonističke aktivnosti i povećanja antagonističke. Kada je lanac dalje produžen sa jednom metilenskom grupom R=CH₂CH₂CH₂CH₃ (N-butilnormorfin), dobijeni analog je potpuno oslobođen agonističke ili antagonističke aktivnosti (tj. jedinjenje je neaktivno).

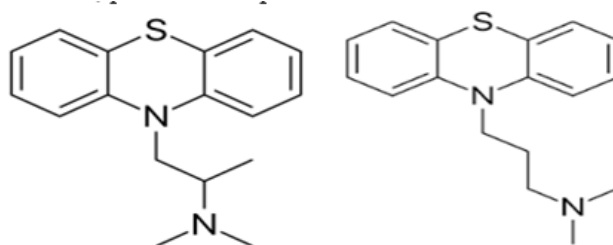
Dodatno povećanje dužine lanca (R=CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃ i R=CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃) dovodi do nastanka jedinjenja sa povećanom agonističkom aktivnosti. Kada je R BETA-feniletil, jedinjenje je potpuni agonist, sa jačinom koja je približno 14 puta veća od jačine morfina. (McCawley EL, 1941, Clark RL 1953)

Grananje alkilnih lanaca takođe može proizvesti drastične promjene u jačini i farmakološkoj aktivnosti. Ako je mehanizam dejstva blisko povezan sa lipofilnosti molekula, tada grananje lanca ugljikovodika dovodi do nastanka manje lipofilnog jedinjenja i značajne promjene u biološkoj aktivnosti. Ovo smanjenje lipofilnosti je rezultat

toga što alkilni lanac postaje kompaktniji i uzrokuje manje poremećaja u vodikovim vezama u molekuli vode.

Ako je ugljovodonični lanac direktno uključen u interakcije sa svojom biološkom metom, onda grananje može izazvati velike promjene u farmakološkoj aktivnosti.

Razmotrit ćemo fenotiazine, prometazin i promazin.



Slika 9. Prometazin i promazin

Primarna farmakološka aktivnost prometazina je antihistaminsko dejstvo, dok je promazin antipsihotik. Jedina razlika između dva molekula je bočni alkilaminski lanac. Prometazin sadrži izopropilamin kao bočni lanac, dok promazin sadrži n-propilamin. U ovom slučaju jednostavna modifikacija jednog atoma ugljenika iz razgranatog do linearnog ugljovodnika radikalno mijenja farmakološku aktivnost.

Položajni izomeri supstituenata aromatičnog prstena takođe mogu imati različite farmakološke osobine. Supstituenti na aromatičnim prstenovima mogu promijeniti distribuciju elektrona kroz cijeli prsten, što, s druge strane, može uticati na to kako prsten reaguje sa svojom biološkom metom. Supstituenti aromatičnog prstena takođe mogu uticati na konformaciju fleksibilnog dijela molekula, naročito ako se supstituenti nalaze u orto položaju u odnosu na isti ugljenik vezan za fleksibilni bočni lanac. Prstenasti supstituenti utiču na konformacije susjednih supstituenata putem steričkih interakcija i mogu značajno promijeniti interakcije sa biološkom metom.

5. PEPTIDNI I PROTEINSKI LIJEKOVI

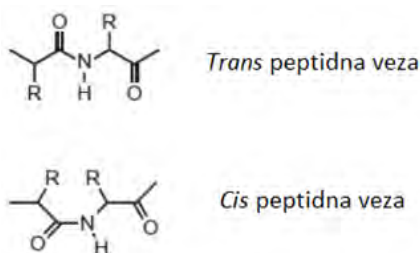
Nisu svi lijekovi mali molekuli kao što je do sada opisano. Neki veoma važni terapijski agensi su peptidi u prirodi (npr., inzulin, kalcitonin) i zbog njihovih fizičkih i hemijskih svojstava, uglavnom se ne mogu primijeniti oralno i moraju se davati parenteralno. Peptidi i proteini su veoma slični po tome što su sastavljeni od jedinica ili ostataka aminokiselina povezanih amidnim vezama, takođe poznatim kao peptidne veze. Ne postoji tačan broj aminokiselinskih ostataka na osnovu kojeg bi se mogli razlikovati peptidi od proteina. Međutim, termin peptid se generalno odnosi na molekule koje sadrže 15 do 50 aminokiselina. Molekule sastavljene od više od 50 ostataka generalno se nazivaju proteinima.

Postoji 20 prirodnih aminokiselina koje služe kao gradivni materijal za peptidne i proteinske lijekove. Svaka aminokiselina sadrži bazični amin vezan za α-ugljenik kisele karboksilne kiseline. Na α-ugljeniku svake aminokiseline nalazi se jedinstveni bočni lanac. Bočni lanci aminokiselina značajno doprinose fizičkim i hemijskim

svojstvima peptida koji se formira iz jedinstvene sekvence aminokiselina.

Kao što je ranije pomenuto, aminokiselinski ostaci su vezani amidnim (peptidnim) vezama. Svaka karboksilna kiselina formira amidnu vezu sa amino grupom sljedeće aminokiseline u nizu. Kao i kod drugih amidnih veza, konjugacija između samostalnog para elektrona na atomu azota i susjedne karbonilne grupe rezultira time da amidna veza dijelom ima karakter dvostruke veze zbog rezonantne strukture.

Ova osobina ima dvije glavne posljedice: 1) amidna veza je koplarna; i 2) postoji ograničena rotacija oko C-N veze. Zbog ove ograničene rotacije, moguće su dvije konformacije, cis i trans.



Slika 10. Cis i trans peptidna veza

Trans konformacija posjeduje nižu energiju zbog manje steričkih interakcija (slično onoj sa dvostrukom vezom ugljenik-ugljenik) i ona je favorizovana. Kada je prolin jedan od aminokiselinskih ostataka, cis-konformacija može biti favorizovana zbog toga što je aminska grupa dio piroldinskog prstena.

Iz tog razloga, prisustvo prolina u peptidima i proteinima je povezano sa savijanjem u ukupnoj konformaciji peptidnog lanca.

5.1. Fizičke i hemijske osobine peptida

Budući da su α -amin i α -karboksilna kiselina svake aminokiseline uključeni u peptidnu kičmu (osim na svakom kraju lanca), bazičnost i kiselost ovih funkcionalnih grupa ne doprinosi ukupnim fizičkim hemijskim osobinama molekula. Funkcionalne grupe koje se nalaze na bočnim lancima aminokiselina su ono što je ključno za fizičko-hemijske osobine peptida ili proteina i predstavljaju važne tačke interakcije sa odgovarajućim biološkim ciljem. Funkcionalne grupe koje se nalaze unutar aminokiselinskih bočnih lanaca po svojoj prirodi mogu biti bazične (npr. amin, guanidin, imidazol), kisele (npr. karboksilna kiselina, fenol, tiol), neutralni (npr. tioetar, amid) ili ugljovodnične (npr. alkil, aromatični prstenovi).

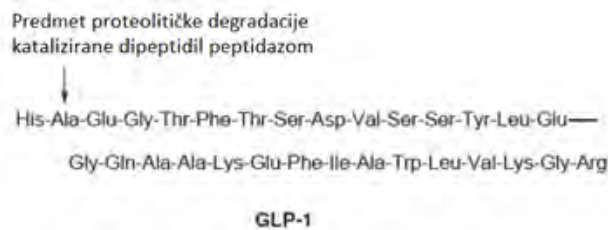
Sve funkcionalne grupe pronađene u lancima bočnih aminokiselina ranije su razmatrane kao komponente lijekova koji se sastoje od malih molekula. Primarne razlike u fizičko-hemijskim osobinama između peptida i malih molekula su njihove veličine (molekulska težina [MW]) i, kao rezultat toga, veliki broj različitih bočnih lanaca (tj., funkcionalnih grupa) prisutnih u datoj strukturi.

Kao što se može očekivati, tipovi i broj funkcionalnih grupa prisutnih u bočnim lancima diktiraju koliko se manje ili više polarni peptid upoređuje sa lijekom građenim od

malih molekula. Vjerovatno je da lijekovi zasnovani na peptidima neće imati optimalne logP vrednosti za pasivnu apsorpciju preko membrana i, s obzirom na njihovu veliku molekulsku masu (MW), neće lako prolaziti membrane.

5.2. Metabolizam/degradacija peptidnih i proteinskih lijekova

Peptidi i proteini se opsežno metaboliziraju pomoću enzima u gastrointestinalnom traktu, krvi, intersticijalnoj tekućini, vaskularnom sloju i ćelijskim membranama, što rezultira vrlo slabom oralnom apsorpcijom i kratkim poluživotom tih molekula. Primarni put metabolizma peptida i proteina uključuje hidrolizu peptidnih veza koje povezuju aminokiseline i nazivaju se peptidaze. Neke od ovih peptidaza pokazuju specifičnost za određene sekvence aminokiselina ili za amino ili karboksilni kraj peptida (egzopeptidaza). Na primjer, karboksi peptidaze odcjepljuju jedan C-terminalni ostatak, dipeptidil karboksipeptidaze otcjepljuju dipeptide sa C kraja, amino peptidaze odcjepljuju jedan N-terminalni ostatak, a amidaze (endopeptidaze) cijepaju unutrašnje peptidne veze. Postoje i podklase peptidaza koje pokazuju specifičnost za određene aminokiselinske sekvence unutar peptida ili na njegovom kraju. Otkriveno je da neke peptidaze (npr., dipeptidil peptidaza IV) kataliziraju degradaciju prirodnih peptida (npr., GLP-1)



Slika 11. Degradacija GLP-1 (glukagonu sličan peptid) pomoću dipeptidil peptidaza IV

6. ZAKLJUČAK

Medicinska hemija se bavi otkrićem novih hemijskih entiteta i sistemskim proučavanjem SAR-ova tih spojeva kako bi se omogućila što bolja kontrola stanja bolesti. Takve studije daju osnovu za razvoj boljih i terapijski sigurnijih medicinskih agenasa iz vodećih komponenti prirodnog porijekla, slučajnim odabirom, sistemskim skriningom ili fokusiranim racionalnim dizajnom.

Ciljevi pri dizajniranju lijekova uključuju povećanje potencijala i trajanja djelovanja nedavno otkrivenih spojeva i smanjenje štetnih nuspojava. Za farmaceuta je važno razumjeti kako fizičko-hemijske osobine utiču na farmakokinetičke osobine lijeka. Takvo znanje koristi farmaceutu, ne samo da bolje razumije kliničke osobine ovih spojeva, nego i da predvidi osobine novih lijekova. Razumijevanje hemijskih osobina molekule omogućava farmaceutu da predvidi probleme pri formulaciji lijeka, kao i potencijalne nepovoljne interakcije s drugim lijekovima kao rezultat metabolizma i vezivanja za proteine.

Razvoj QSAR-a oslanja se na sposobnost ispitivanja višestrukih odnosa između fizičkih osobina i bioloških

aktivnosti. U klasičnom QSAR, jednačina definira biološku aktivnost kao linearnu slobodnu energetska vezu između fizičko-hemijskih i/ili strukturnih osobina. To omogućava procjenu prirode sila interakcije između lijeka i njegove biološke mete, kao i sposobnost predviđanja aktivnosti u molekulima. Ovi pristupi su bolji za razvoj "vodećeg" jedinjenja u kandidata za lijek nego za "otkrivanje vodećeg" jedinjenja.

Novi lijekovi su takođe "otkriveni" i istraživanjem metabolizma molekula lijekova koji su već klinički kandidati za lijek ili se već nalaze na tržištu. U ovom postupku, metaboliti poznatih lijekova se izoluju i analizira se njihova biološka aktivnost pomoću istih meta ili širih sistema skrininga meta. Širi sistemi skrininga su korisniji ako je metabolit koji se procenjuje hemijska struktura koja se radikalno mijenja od roditeljskog molekula kroz neuobičajenu metaboličku reorganizacijsku reakciju. U većini slučajeva, metabolit se drastično ne razlikuje od roditeljskog molekula i stoga se očekuje da će pokazati slične farmakološke efekte. Prednost ovakve procjene kandidata za lijekove jeste to što metabolit može imati bolje farmakokinetičke osobine, kao što je duže trajanje djelovanja, bolja oralna apsorpcija ili manja toksičnost sa manje neželjenih efekata.

Nakon otkrivanja neželjenih efekata u pacijentu ili životinjskom modelu, može doći do daljeg razvoja nove terapijske upotrebe određenog hemijskog entiteta. Otkrivanje novih vodećih jedinjenja pomoću profilisanja neželjenih efekata postojećih agenasa razmotreno je u nastavku. Jednom kada je otkriveno "početno" jedinjenje za određenu terapijsku upotrebu, sljedeći korak je identifikacija farmakoforičnih grupa.

Farmakofor molekule lijeka je onaj dio molekula koji sadrži esencijalnu funkcionalnu grupu koja se direktno veže za aktivno mjesto biološke mete radi postizanja željene biološke aktivnosti. S obzirom na to da interakcije lijek-meta mogu biti veoma specifične (mogu se predstaviti kao odnos ključ (lijek) i brava (receptor, meta), farmakofor može predstavljati veoma mali dio molekula.

U mnogim slučajevima, veoma strukturno složeni molekuli se mogu "prevesti" u jednostavnije strukture sa zadržavanjem farmakoforičnih grupa i uz održavanje željenog biološkog djelovanja.

Tehnike koje se koriste za izučavanje odnosa strukture i aktivnosti nekog jedinjenja uključuju nekoliko disciplina, od organske hemije, farmaceutske hemije, kompjuterske hemije. Da bi se poboljšali farmakološki efekti neke molekule, svim navedenim metodama potrebno je modilirati funkcionalne grupe, čije će promjene u strukturi dovesti do pozitivnih utjecaja na aktivnost molekula.

7. LITERATURA

1. Albert A. The long search for valid structure-action relationships in drugs. *J Med Chem* 1982;25:1-5.
2. Aliens EJ. A general introduction to the field of drug discovery. In: Aliens EJ, ed. *Drug Design*. New York: Academic Press, 1971:689-696.
3. Bovet D, Staub A. Action protectice des ethers phenoliques au cours de l'intoxication histaminique. *C R Soc Biol (Paris)* 1937;124:547-549.
4. Charpentier P, Gaillot P, Jacob R, et al. Recherches sur les dimethylaminopro- pyl N-phenothiazines. *C R Acad Sci (Paris)* 1952;325:59-60.
5. Clark RL, Pessolano AA, Weijlard J, et al. ^substituted epoxymorphinans. *J Am Chem Soc* 1953;75:4964-4967.
6. Crum-Brown A, Fraser TR. On the connection between chemical constitution and physiological action. Part 1: on the physiological action of the ammonium bases derived from Strychia, Brucia, Thebia, Codeia, Morphia, and Nicotia. *Trans R Soc Edinburgh* 1869;25:257-274.
7. Delay J, Deniker P, Hurl JM. Utilisation en thirapeutique psychiatrique d'une phenothiazine d'action centrale elective. *Ann Med Psychol (Paris)* 1952;110:112-117.
8. Ehrlich P. On immunity with special reference to cell life. In: Himmelweit F, ed. *Collected Papers of Paul Ehrlich*. London: Pergamon, 1957:178-195.
9. Ing HR. The curariform action of onium salts. *Physiol Rev* 1936;16:527-544.
10. Kemp JD, Pitzer KS. Hindered rotation of the methyl groups in ethane. *J Chem Phys* 1936;4:749.
11. Laborit H, Huguenard P, Alluaume R. Un nouveau stabilisateur vegetatif, le 4560 RP. *Presse Med* 1952;60:206-208.
12. Loewi O, Navrati E. Uber humorale ubertragbarkeit der herznervenwirkung XI mitteilug. uber den mechanismus der vaguswirkung von physostigmin und ergotamine. *Plugers Arch Ges Physiol Menshen Tiere* 1926;214:689-696.
13. McCawley EL, Hart ER, Marsh DF. The preparation of .V-allylnormorphine. *J Am Chem Soc* 1941;63:314.
14. Woods DD. The relation of aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulfanilamide. *Br J Exp Pathol* 1940;21:74-90.

MODULING OF OXIDATION STATIONS OF FUNCTIONAL GROUPS IN THE DRUG DESIGN

Amer Sarajlić¹, Miralem Smajić¹, Amra Džambić¹

¹ Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Univerzitetska br. 8, 75000 Tuzla

SUMMARY

Structure-activity relationship (SAR) represents the relationship between the 2D or 3D chemical structure of the molecule and its biological activity. SAR analysis allows the determination of chemical groups responsible for causing targeted biological effects in the body. It enables rational modifications of the effect or potency of bioactive compounds by changes in the chemical structure. Based on knowledge of this part of chemistry, there has been a discovery and advancement in the design of drugs.

Medical chemistry explores how the chemical structure affects biological activity. It also includes research on already existing market drugs, their biological properties and their quantitative relationship between structure and activity (QSARs). Models of Quantitative Structure and Activity Relationships (QSAR) are mathematical models that can be used to predict the physico-chemical and biological properties of compounds and the properties of compounds that relate to their destiny in the organism based on their chemical structure knowledge.

It is necessary to understand not only the mechanism through which the drug implements its effect, but also how the molecular and physicochemical properties of the molecules affect the pharmacokinetics (ADME and tox) and pharmacodynamics (what the drug does for the organism). It is important to emphasize that stereochemistry has an increasingly important role in the design of drugs. The physicochemical properties of the drug molecule depend not only on the composition of the functional groups present in the molecule, but also on the spatial arrangement of these groups. Over the past two decades, technological advances in experimental methods, such as NMR and X-ray crystallography, have enabled the structure-based drug design (SBDD) to take a vital position in medical chemistry. Thanks to the rapid increase in the availability of 3D structures of protein targets and rapid advances in computer chemistry, SBDD has become an integral strategy for the production and optimization of leading components.

Key words: drug design, functional groups, pharmacophore.

ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U NASTANKU DIJABETIČKE NEUROPATIJE I TERAPIJSKI POTENCIJAL ALFA LIPOINSKE KISELINE

Elvedina Trumić

PZU Apoteke Ibn Sina, 76120 Brčko, Bosna i Hercegovina

SAŽETAK

Dijabetes je hronični metabolički poremećaj, koji svakodnevno pogađa sve više ljudi širom svijeta, a karakteriše ga hiperglikemija, odnosno povećana koncentracija glukoze u krvi. Dijabetes je takva vrsta oboljenja koja sa sobom nosi rizik od brojnih komplikacija, jedna od komplikacija dijabetesa je i dijabetička neuropatija. Dijabetička neuropatija podrazumijeva oštećenje perifernog nervnog sistema kao posljedice šećerne bolesti. To je najčešća i istovremeno najkasnije prepoznata dugoročna komplikacija dijabetesa, koja se javlja kod pacijenata sa oba tipa dijabetesa. Dijagnoza distalne simetrične polineuropatije se uglavnom postavlja kod pacijenata sa slabom kontrolom koncentracije glukoze u krvi, a vjerovatnoća za pojavu ove hronične komplikacije dijabetesa se povećava sa starošću i dugogodišnjim trajanjem dijabetesa. Istraživanja su pokazala da oksidativni stres ima veliki uticaj na pojavu dijabetičke neuropatije. Oksidativni stres je biohemijski fenomen koji nastaje zbog prekomjerne produkcije ili akumulacije slobodnih radikala kisika. Kod pacijenata koji boluju od dijabetesa slaba kontrola koncentracije glukoze u krvi dovodi do pojave hronične hiperglikemije, a oksidacija povećane koncentracije glukoze izvan ćelija stimuliše produkciju slobodnih radikala kisika i povećava oksidativni stres. Antioksidansi su jako značajni u borbi protiv oksidativnog stresa. Alfa lipoinna kiselina je jedan od antioksidanasa za koji se pokazalo da usporava razvoj i smanjuje bolne simptome dijabetičke neuropatije uzrokovane oksidativnim stresom. Eksperimenti su pokazali da alfa lipoinna kiselina može imati i ima značajan terapijski potencijal u kliničkoj praksi.

Ključne riječi: dijabetes, dijabetička neuropatija, oksidativni stres, antioksidansi, alfa lipoinna kiselina.

Autor za korespondenciju: elve_dina91@hotmail.com

1. UVOD

1.1. Dijabetes melitus

Dijabetes je hronični metabolički poremećaj, koji svakodnevno pogađa sve više ljudi širom svijeta, a karakteriše ga hiperglikemija, odnosno povećana koncentracija glukoze u krvi. Glukoza predstavlja izvor energije za ćelije u ljudskom organizmu, ali pod uslovom da u organizmu postoji dovoljna koncentracija hormona, inzulina, koji je neophodan da ćelija primi glukozu i da je iskoristi u energetske svrhe. Kada se radi o dijabetesu problem predstavlja insuficijencija u proizvodnji ili aktivnosti inzulina, ili kombinacija oba poremećaja istovremeno, tako da u tom slučaju dolazi do pojave intracelularne

hipoglikemije i ekstracelularne hiperglikemije (Ullah i sar., 2016).

Njemački patolog i biolog Paul Langerhans otkrio je da ćelije gušterače proizvode inzulini. Ove ćelije izgledaju kao maleni otoci i zbog toga se nazivaju Langerhansovim otočićima. Hormon je dobio ime od latinske riječi insula što u prijevodu također znači otok. Unutar Langerhansovih otočića možemo pronaći dvije vrste ćelije, a to su alfa ćelije i beta ćelije. Beta ćelije su uglavnom odgovorne za lučenje inzulina u našim tijelima. Inzulini je proteinski hormon, izgrađen je u obliku dva lanca A i B međusobno povezana sa dva disulfidna mosta. Lanac A se sastoji od 21 aminokiselina, a lanac B od 30 aminokiselina. Molekularna težina inzulina iznosi 6 000. Gušterača dnevno proizvodi oko 80 – 100 jedinica inzulina.

Tipovi dijabetes melitusa su:

Dijabetes tip 1 – inzulín-ovisni tip šećerne bolesti nastaje kada gušterača ne proizvodi dovoljnu količinu inzulina i u tom slučaju je doživotno potrebno u organizam unositi inzulín. Češće se javlja kod djece i u pubertetu, ali može se pojaviti i kod odraslih.

Dijabetes tip 2 – inzulín-neovisan tip šećerne bolesti se javlja kad gušterača nije sposobna stvarati količinu inzulina da udovolji potrebama organizma ili se proizvedeni inzulín ne koristi učinkovito. Ovakvo stanje može se kontrolirati pravilnom prehranom, tabletama i redovnom vježbom. Javlja se prvenstveno kod odraslih.

Gestacijski dijabetes je naziv za hiperglikemiju otkrivenu kod trudnice koja do tada nije bolovala od šećerne bolesti, a hiperglikemija prestaje nakon trudnoće (Ullah i sar., 2016).

1.2. Dijabetička neuropatija

Dijabetes je takva vrsta oboljenja koje sa sobom nosi rizik od brojnih komplikacija. Dijabetička neuropatija podrazumijeva oštećenje perifernog nervnog sistema kao posljedice šećerne bolesti. To je najčešća i istovremeno najkasnije prepoznata dugoročna komplikacija dijabetesa, koja se javlja kod pacijenata sa oba tipa dijabetesa. Ustanovljeno je da je dijabetička neuropatija prisutna kod oko 10% pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze, te da se nakon 25 godina trajanja dijabetesa neki oblik dijabetičke neuropatije javlja kod oko 50% bolesnika. Kod pojedinačnog pacijenta različiti dijelovi nervnog sistema mogu biti pogođeni, ali najčešća hronična komplikacija je distalna simetrična polineuropatija. Dijagnoza distalne simetrične polineuropatije se uglavnom postavlja kod pacijenata sa slabom kontrolom koncentracije glukoze u krvi, a vjerovatnoća za pojavu ove hronične komplikacije dijabetesa se povećava sa starošću i dugogodišnjim trajanjem dijabetesa. Dijabetička neuropatija ima negativan uticaj na preživljavanje i kvalitet života pacijenata koji boluju od dijabetesa, jer može dovesti do pojave dijabetičkog stopala, amputacije dijelova donjih ekstremiteta i brojnih drugih problema (Kasznicki i sar., 2012).

Simptomi dijabetičke neuropatije su neugodne senzacije poput hladnoće, obmrlosti, utrnuća, mravinjanja, žarenja, bockanja, grčeva, probadajućih, sjevajućih ili palećih bolova. Intenzitet smetnji je najveći noću i to posebno u mirovanju. Simptomi se u početku javljaju na distalnim predjelima udova i imaju tendenciju ascendentnog širenja (Barada i Vučković Rebrina, 2009).

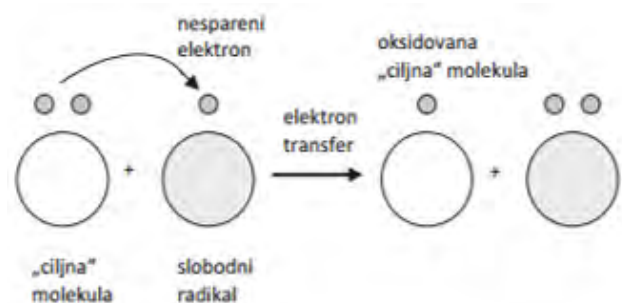
Rana dijagnoza i adekvatan tretman su od presudnog značaja u slučaju distalne simetrične polineuropatije, jer bi se u tom slučajno signifikantno smanjile posljedice ove ozbiljne komplikacije dijabetesa.

1.3. Oksidativni stres

Slobodni radikal je atom ili grupa atoma sa najmanje jednim nesparenim elektronom. Slobodni radikali su medijatori brojnih patologija (diabetes mellitus,

autoimunih, neurodegenerativnih, koronarnih, malignih, plućnih, inflamatornih i mnogih drugih bolesti) i dio su kompleksnog patofiziološkog mehanizma oštećenja, a u pojedinim bolestima njihovo učešće je potencirano. Jednom pokrenut lanac reakcija slobodnih radikala ima osobinu prostornog i vremenskog širenja uz pojačavanje efekta. Ova propagacija se ogleda u nastanku sekundarnih slobodnih radikala koji nastavljaju da šire kaskadu lančanih reakcija (Đukić i sar., 2008).

Zbog težnje da spare nesparen(e) elektron(e) u posljednjoj orbitali, slobodni radikali se ponašaju kao snažni elektrofil, odnosno jaki oksidacioni agensi.



Slika 1. Mehanizam reakcije slobodnih radikala (Đukić i sar., 2008).

U reakciji sa supstratom (biomolekulom ili nekim drugim jedinjenjem), odnosno donorom elektrona, slobodni radikali se redukuju (dobijaju elektron) i gube karakter slobodnog radikala, a supstrat se oksidira (gubi elektron) i postaje slobodni radikal druge generacije tzv. sekundarni slobodni radikal i otpočinje lanac radikalskih reakcija. (Đukić i sar., 2008).

Prekomjerna produkcija ili akumulacija slobodnih radikala kisika može dovesti do biohemijskog fenomena, poznatog pod nazivom oksidativni stres. Termin oksidativni stres je 1985. godine prvi definisao Helmut Sies kao atipično stanje koje nastaje zbog neravnoteže između štetnih radikala kisika i antioksidativne odbrane, a kao rezultat ima oksidativno oštećenje (Jilmenz-Del-Rio i sar., 2012.).

Oksidativni stres se može predstaviti i kao pomak ravnoteže u ćelijskim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Drugim riječima oksidativni stres se može definisati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidativnog sistema (Čakarić, 2009).

Oksidativni stres može nastati zbog smetnji u produkciji slobodnih radikala kisika, njihovoj eliminaciji ili može biti posljedica poremećaja na oba nivoa. U nekim slučajevima mutacija gena može biti odgovorna za neravnotežu u metabolizmu slobodnih radikala kisika (Lushchak i Gospodaryov, 2012). Slobodni radikali kisika nastaju kako u normalnim, tako i u abnormalnim procesima kod ljudi. Prekomjerna proizvodnja slobodnih radikala će dovesti do oksidacije DNA, lipida, proteina i šećera, što će za posledicu imati disfunkciju tih molekula unutar ćelije, te na kraju ćelijsku smrt. (Đukić i sar., 2008).

Oksidativni stres ne samo da ima ulogu u nastanku raznih bolesti, nego utiče i na progresiju bolesti. Danas



Slika 2. Prikaz ravnoteže pro- i anti-oksidativnog sistema (Čakarić, 2009).

se u literaturi može pronaći veza između oksidativnog stresa i skoro svih dobro poznatih bolesti. Najznačajnije od njih su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, dijabetes, karcinomi, bolesti koje uzimaju milione života svake godine. Jako je bitno odrediti da li je oksidativni stres odgovoran za nastanak bolesti, ili je oksidativni stres nastao kao odgovor na bolest, odnosno da li je nastao tokom bolesti (Lushchak i Gospodaryov, 2012).

1.4. Oksidativni stres i dijabetička neuropatija

Kisik je nophodan za život svake ćelije u organizmu, ali u određenim okolnostima taj isti kisik može biti odgovoran za ćelijsku smrt. Postoje tri glavna uzroka koja su uključena u patološke promjene vezane za dijabetičku neuropatiju, to su: inflamacija, disfunkcija mitohondrija i oksidativni stres (Roman-Pintos i sar., 2016).

U slučaju dijabetesa glavni izvor oksidativnog stresa su mitohondrije, a obzirom da su mitohondrije metabolički centar ćelije prve će biti oštećene. Razlog zbog kojeg disfunkcija mitohondrija vrši utjecaj na razvoj dijabetesa je taj što može biti okidač za dva štetna procesa. Prvi proces je produkcija destruktivnih slobodnih radikala kisika, a drugi je redukcija energetske resursa. Glavni izvor reaktivnih oblika kisika u mitohondrijama je oksidativna fosforilacija. Pošto u mitohondrijama nastaju slobodni radikali postoji jasna veza između poremećaja mitohondrija i oksidativnog stresa. Mitohondrija je jedinstvena organela, jako značajna za niz ćelijskih funkcija, uključujući sintezu ATP-a, homeostazu kalcija, ćelijsko preživljavanje i apoptozu. Mitohondrije predstavljaju centar za produkciju slobodnih radikala kisika, odnosno mitohondrije su glavni izvor oksidativnog stresa. Mitohondrije su izvor 90% slobodnih radikala nastalih u ćeliji, jer neizbježan gubitak elektrona tokom transfera elektrona, uprkos efikasnom odbrambenom, antioksidativnom sistemu vodi do konstantne produkcije superoksid anjona. Disfunkcionalne mitohondrije ne samo da proizvode više slobodnih radikala, nego su i manje efikasne u sintezi ATP-a. Najčešći problemi vezani za funkciju mitohondrija su defekt elektron transportnog

lanca, koji najviše pridonosi produkciji slobodnih radikala, te nedostatak nekoliko enzima, ključnih za metabolizam kisika, uključujući α -ketoglutarat dehidrogenaza kompleks i piruvat dehidrogenaza kompleks, koji su uključeni u TCA ciklus, te nedostatak citohrom oksidaze, posljednjeg enzima u respiratornom lancu, odgovornog za redukciju molekularnog kisika. Navedene funkcionalne nepravilnosti mitohondrija favorizuju produkciju slobodnih radikala kisika (Roman-Pintos i sar., 2016).

Kod pacijenata koji boluju od dijabetesa slaba kontrola koncentracije glukoze u krvi dovodi do pojave hronične hiperglikemije, a oksidacija povećane koncentracije glukoze izvan ćelija stimuliše produkciju slobodnih radikala kisika i povećava oksidativni stres (Kasznicki i sar., 2012). Određena količina slobodnih radikala kisika je potrebna za normalno odvijanje metaboličkih procesa, ali prekomjerna ili nekontrolisana produkcija je opasna (Kumar Tiwari i sar., 2013).

Neki od načina koji dovode do hiperglikemijom inducirano oksidativnog stresa su:

- ◆ Autooksidacija glukoze
- ◆ Aktivacija mehanizma heksozamina
- ◆ Aktivacija diacilglicerola i protein kinaze C
- ◆ Aktivacija poliol mehanizma (Babatunde Oyenihi i sar., 2014).

Pod autooksidacijom se podrazumijeva mehanizam u kome glukoza može biti toksična zbog glikacije, odnosno neenzimatskog vezivanja glukoze za proteine što za rezultat ima nastanak AGE produkata (eng. Advanced Glycation End product). Povećana koncentracija AGE produkata je zabilježena u perifernim nervima kod pacijenata sa dijagnozom dijabetesa i pokazalo se da utiče na napredovanje komplikacija dijabetesa, uključujući i napredovanje dijabetičke neuropatije (Roman-Pintos i sar., 2016).

Povećana koncentracija glukoze može dovesti do akumulacije fruktoza-6-fosfata, koji se dalje iskorištava putem heksozamin mehanizma. Pod uticajem enzima fruktoza-6-fosfat prelazi u glukozamin-6-fosfat, za koji je poznato da utiče na povećanje koncentracije hidrogen

peroksida i na taj način povećava oksidativni stres u ćeliji (Babatunde Oyenih i sar., 2014).

Hiperglikemija također može uticati na povećanje koncentracije diacilglicerola. Povećana koncentracija diacilglicerola aktivira protein kinazu C, ali i neke njene izomere, čija aktivacija može djelimično objasniti mikrovaskularne komplikacije dijabetesa (Roman-Pintos i sar., 2016).

Većina glukoze koja uđe u ćeliju se metaboliše putem glikolize da bi dala piruvat, dok se samo oko 3% pretvara u sorbitol putem poliol mehanizma. Međutim, kada je koncentracija glukoze povećana dolazi do povećanja aktivnosti poliol mehanizma na oko 30%. Katalitička aktivnost aldoza reduktaze i sorbitol dehidrogenaze pretvara višak glukoze u sorbitol i fruktozu. Obzirom da sorbitol ne može proći ćelijsku membranu nakuplja se u ćeliji uzrokujući hiperosmolarnost i gubitak mioinozitola i adenina, što posljedično dovodi do strukturalnog propadanja nerava (Babatunde Oyenih i sar., 2014).

Mehanizmi uključeni u pojavu oksidativnog stresa kod pacijenata sa oba tipa dijabetesa utiču na disfunkciju nerava zbog toga što slobodni radikali kisika dovode do lipidne peroksidacije, oksidacije proteina, oštećenja DNA i smanjuju ćelijsku antioksidativnu aktivnost, što znači da kod dijabetičara uzrok oksidativnog stresa ne mora biti samo prekomjerna produkcija slobodnih radikala kisika, nego to može biti i značajno smanjena efikasnost antioksidativne odbrane organizma ili kombinacija oba preduslova (Kasznicki i sar., 2012).

2. MATERIJAL I METODE

Rad ima okvir retrospektivne i deskriptivne studije. Navedena tema je obrađena korištenjem informacija iz stručnih i naučnih članaka pronađenih na biomedicinskim bazama podataka, kao što su: PubMed, Hinari i Hindawi.

3. DISKUSIJA I REZULTATI

Antioksidansi mogu svoj efekat ispoljiti na više načina, oni mogu uticati na smanjenje koncentracije slobodnih radikala tako što će spriječiti njihovu prekomjernu produkciju ili ih inaktivirati, povećati antioksidativnu odbranu ili se njihov efekat može ispoljiti kao kombinacija prethodno navedena dva načina. Postoji više vrsta antioksidanasa:

- enzimski (superoksid dizmutaza, katalaza, glutacion peroksidaza)
- ne-enzimski (vitamini A,C i E, glutacion, karotenoidi, flavonoidi, koenzim Q, alfa lipoinjska kiselina) (Sifuentes-Franco i sar., 2017).

Alfa lipoinjska kiselina je jedan od antioksidanasa za koji se pokazalo da usporava razvoj i smanjuje bolne simptome dijabetičke neuropatije uzrokovane oksidativnim stresom (Sifuentes-Franco i sar., 2017). Eksperimenti su pokazali da alfa lipoinjska kiselina može imati i ima jako značajan terapijski potencijal u kliničkoj praksi. Alfa lipoinjska kiselina svoj antioksidativni potencijal u organizmu ispoljava na više načina, i to: uključena je u regeneraciju vitamina C i E, oksidaciju glutaciona, pored toga je i kofaktor za brojne mitohondrijalne enzime, smanjuje lipidnu peroksidaciju,

manjuje oksidativni stres uzrokovan hiperglikemijom tako što inhibira heksozamin i poliol mehanizam i smanjuje stvaranje AGE produkata (Babatunde Oyenih i sar., 2014). Da bi jedan antioksidans bio terapijski idealan on mora da ispunjava više uslova: da se dobro apsorbuje, da se u ćelijama i tkivima metaboliše u terapijski koristan oblik, da ima širok antioksidativni potencijal uključujući i interakciju sa drugim antioksidansima i nisku toksičnost. Alfa lipoinjska kiselina je prirodni antioksidans koji je u stanju da odgovori na sve ove zahtjeve i zbog toga se pokazala kao jako efikasna u slučaju brojnih patoloških stanja uzrokovanih oksidativnim stresom (Singh i Jialal, 2008).

Alfa lipoinjska kiselina se može biosintetizirati u biljkama, ljudskom i životinjskom organizmu, gdje se metaboliše u dihidrolipoinjsku kiselinu, s tim da obje imaju antioksidativni potencijal. U ljudskom organizmu se sintetiše prvenstveno u jetri, a u orgaizam se može unijeti i putem hrane. Visoke koncentracije alfa lipoinjske kiseline su pronađene u životinjskim tkivima sa izraženom metaboličkom aktivnošću, kao što su jetra, bubregi i srce, dok su špinat, brokuli, paradajz i grašak biljke bogate alfa lipoinjskom kiselinom. Alfa lipoinjska kiselina u svojoj strukturi ima asimetrični atom ugljika te se zbog toga može javiti u obliku dva enantiomera. Iako se na početku istraživanja alfa lipoinjske kiseline pokazalo da R-enantiomer ima veći potencijal i da on prvenstveno stimuliše preuzimanje glukoze, kasnija istraživanja su pokazala i značaj S-enantiomera u smislu povećanog afiniteta za oksidaciju glutaciona. Samo R-enantiomer se sintetiše u organizmu i on je vezan za protein. Suplementi alfa lipoinjske kiseline sadrže samo R-enantiomer ili 50/50 kombinaciju R i S enantiomera. Za razliku od alfa lipoinjske kiseline koja je u hrani vezana za protein, alfa lipoinjska kiselina je slobodna u suplementima. To je bitno jer kada se govori o terapijskoj upotrebi alfa lipoinjske kiseline postoji naučni i medicinski interes o upotrebi slobodne alfa lipoinjske kiseline u terapijske svrhe. Koncentracije alfa lipoinjske kiseline koje se u organizam mogu unijeti hranom su jako male. U suplementima se koncentracije alfa lipoinjske kiseline kreću od 200 do 600mg i pokazalo se da su te koncentracije oko 1000 puta veće od koncentracija alfa lipoinjske kiseline koje se u organizam mogu unijeti hranom. Generalna je preporuka da se alfa lipoinjska kiselina uzima na prazan stomak, jedan sat prije ili dva sata poslije jela (Babatunde Oyenih i sar., 2014, Singh i Jialal, 2008).

Da bi se ispitaio efekat alfa lipoinjske kiseline na poboljšanje simptoma dijabetičke neuropatije rađene su brojne studije. Prva serija studija koja je rađena da se ispita da li postoji pozitivan uticaj alfa lipoinjske kiseline na dijabetičku neuropatiju je nazvana ALADIN (eng. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy). Urađene su tri takve studije ALADIN I, ALADIN II i ALADIN III.

1995. godine 328 pacijenata sa dijabetesom tipa 2 je bilo uključeno u ALADIN I studiju. Svi pacijenti koji su bili uključeni u istraživanje imali su dijabetičku neuropatiju i podijeljeni su u jednu od četiri grupe ovisno o tome jesu li intravenski dobijali 100, 600 ili 1200 mg alfa lipoinjske kiseline, ili su bili u grupi koja je dobijala placebo. Nakon 19 dana tretmana rezultati su u poređenju sa grupom koja

STRUČNI RADOVI

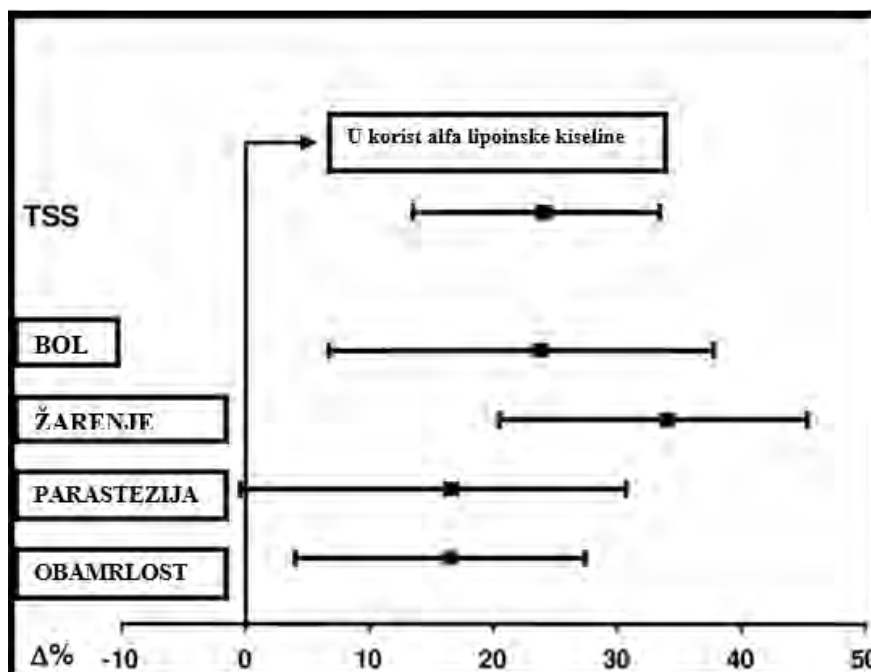
je dobijala placebo bili pozitivni. Kod pacijenata koji su primali veće doze od 600mg i 1200mg došlo je do smanjenja bola, obamrlosti i osjećaja mravinjanja, a doza od 600mg/dan je pokazala i dobar sigurnosni profil (Roman-Pintos i sar., 2016, Singh i Jialal, 2008).

Nakon ALADIN I, kratkoročne studije koja je pokazala terapijski potencijal alfa lipoiinske kiseline u većim dozama od 600 i 1200mg/dan, urađena je ALADIN II studija koja je ispitivala terapijski potencijal alfa lipoiinske kiseline kroz duži eksperiment u trajanju od 2 godine. Rezultati studije su objavljeni 1999. godine. U istraživanje su bili uključeni pacijenti sa oba tipa dijabetesa, koji su bili podijeljeni u tri grupe. Jedna grupa je bila placebo, druga grupa koja je brojala 27 ispitanika je primala 600mg/dan i treća grupa koju je činilo 18 ispitanika je primala 1200mg/dan alfa lipoiinske kiseline. Razlika je bila u tome što su pacijenti alfa lipoiinsku kiselinu prvih pet dana primali intravenski, a zatim oralno dvije godine. Iako je u ovu studiju bio uključen mali broj ispitanika krajnji rezultat je bio pozitivan i pokazao je značajan napredak u perifernoj nervnoj provodljivosti (Roman-Pintos i sar., 2016, Singh i Jialal, 2008).

Pozitivni rezultati ALADIN II studije su bili podsticaj za ALADIN III studiju, koja je osmišljena sa ciljem da se utvrdi može li kratkoročna intravenska primjena alfa lipoiinske kiseline praćena dužom oralnom suplementacijom poboljšati neuropatiju povezanu sa dijabetesom. U ALADIN III studiju je bilo uključeno 509 pacijenata sa dijabetesom tipa 2 koji su tri sedmice intravenski dobijali 600mg/dan alfa lipoiinske kiseline i zatim oralno 1800mg/dan podijeljeno u tri doze još 6 mjeseci. U istraživanje su bile uključene i dvije placebo grupe. Rezultati su pokazali napredak u smislu smanjenja boli, ali nisu bili statistički značajni (Roman-Pintos i sar., 2016, Singh i Jialal, 2008).

Pored prethodno spomenutih ALADIN studija rađena su i SYDNEY ispitivanja (eng. Symptomatic Diabetic Neuropathy) koja su pokazala poboljšanje simptoma dijabetičke neuropatije, kao posljedice upotrebe alfa lipoiinske kiseline. U SYDNEY I studiju su bili uključeni pacijenti sa dijabetičkom neuropatijom koji su intravenski primali 600mg/dan alfa lipoiinske kiseline ili placebo 5 dana sedmično u trajanju od 14 sedmica. Zaključak istraživanja je bio da intravenski primjenjena alfa lipoiinska kiselina značajno utiče na poboljšanje simptoma dijabetičke neuropatije kao što su bol i obamrlost i da usporava propadanje nervnih završetaka (Singh i Jialal, 2008).

SYDNEY II studija je bila multicentrična studija koja je obuhvatila 181 pacijenta iz Rusije i Izraela sa simptomima dijabetičke neuropatije, starosne dobi od 18 do 74 godine. Pacijenti su bili podijeljeni u četiri grupe, jedna grupa je primala placebo a ostale tri grupe, 600mg/dan, 1200mg/dan ili 1800mg/dan alfa lipoiinske kiseline. Pacijenti su alfa lipoiinsku kiselinu uzimali oralno. Ispitivanje je trajalo šest uzastopnih sedmica, s tim da su prve sedmice ispitanici u sve četiri grupe primali placebo. Period od pet sedmica oralne primjene alfa lipoiinske kiseline je izabran zbog činjenice da je intravenska primjena pokazala efekat nakon tri sedmice i pretpostavke da je za postizanje efekta oralnom primjenom potreban duži period. Istraživanje je pratilo najčešće simptome dijabetičke neuropatije bol, obamrlost i parasteziju, te snagu mišića i reflekse. Ovo istraživanje se pokazalo kao uspješno, jer je došlo do poboljšanja simptoma dijabetičke neuropatije. Obzirom da je do poboljšanja simptoma došlo u sve tri grupe i da se pokazalo da primjena većih doza može dovesti do pojave gastrointestinalnih neželjenih efekata, doza od 600mg/dan se smatra najadekvatnijom u smislu efikasnosti i sigurnosti (Ziegler i sar., 2006).



Dijagram 1. Relativna razlika između TSS i pojedinačno praćenih simptoma. Dijagram pokazuje poboljšanje simptoma u korist alfa lipoiinske kiseline (Ziegler i sar. 2014).

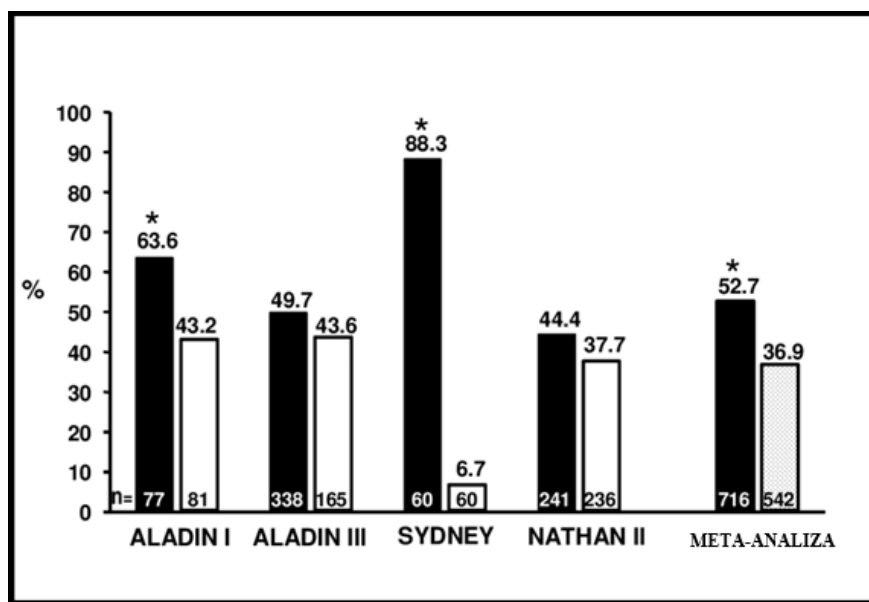
Nakon SYDNEY studija sprovedena je i NATHAN studija (eng. Neurological Assessment of Thiocctic Acid in Diabetic Neuropathy). To je najduže ispitivanje uticaja alfa lipoinske kiseline na poboljšanje simptoma dijabetičke neuropatije, koje je trajalo četiri godine i u koje je bilo uključeno 460 ispitanika, od kojih je 233 uzimalo oralno 600mg/dan alfa lipoinske kiseline i 227 placebo. NATHAN studija je pokazala da duža oralna administracija alfa lipoinske kiseline ima pozitivan efekat na poboljšanje simptoma dijabetičke neuropatije i da može uticati na njeno sporije napredovanje. (Papanas i Maltezos, 2012.)

Da bi se ustanovila efikasnost i sigurnost terapijske primjene 600mg/dan alfa lipoinske kiseline rađene su i meta analize. Jednu od takvih analiza su radili Ziegler i saradnici pretraživanjem VIATRIS baze podataka u Njemačkoj.

promjene svakog posmatranog simptoma (Ziegler i sar. 2014).

Pored praćenja promjene ranije pomenutih simptoma dijabetičke neuropatije u tri studije (ALADIN III, SYDNEY i NATHAN) je ispitivan i NIS (eng. Neuropathy Impairment Score), odnosno analizirana je slabost određene grupe mišića i refleksni odgovor tih mišića na vanjske podražaje kao što su pritisak, vibracije ili ubod (Ziegler i sar. 2014).

Rezultati su pokazali da intravenski tretman sa 600mg alfa lipoinske kiseline na dan značajno smanjuje glavne simptome dijabetičke neuropatije. Statistički signifikantna razlika između pacijenata koji su primali alfa lipoinisku kiselinu i placebo je uočena nakon druge sedmice tretmana i rasla je sve do kraja ispitivanja. Što se tiče promjena u refleksnim aktivnostima mišića uočena su poboljšanja u



Dijagram 2. Razlika u TSS na kraju ispitivanja između grupa koje su primale alfa lipoinisku kiselinu i placebo u sva četiri ispitivanja pojedinačno i zbirno u meta analizi (Ziegler i sar. 2014).

Njihova meta analiza je obuhvatila četiri studije ALADIN I, ALADIN III, SYDNEY I i NATHAN. ALADIN I i ALADIN III su bile multicentrične studije, koje su u svom istraživanju obuhvatile ispitanike iz više centara u Njemačkoj. SYDNEY I studija je monocentrična studija koja je obuhvatila ispitanike iz jedne bolnice u Moskvi, dok je NATHAN multicentrična studija u koju su bili uključeni pacijenti iz 33 centra za dijabetes iz Amerike, Kanade i Europe (Ziegler i sar. 2014).

U sva četiri ispitivanja je bilo uključeno 1258 pacijenata, 716 je primalo alfa lipoinisku kiselinu, a 542 pacijenta su bila u placebo grupi. Ispitanici su tri uzastopne sedmice u obliku intravenske infuzije primali 600mg alfa lipoinske kiseline ili 250mL izotonične otopine NaCl, ako su bili u grupi koja je primala placebo (Ziegler i sar. 2014).

Osnovni dio ispitivanja se bavio praćenjem promjene svih posmatranih simptoma TSS (eng. Total Symptom Score). Posmatrani simptomi su bili: bol, osjećaj žarenja, parastezija i obamrlost. Simptomi su upoređivani u odnosu na to kakvi su bili prvog dana i kakvi su bili sljedeće tri sedmice pojedinačno. Pored toga praćene su i pojedinačne

smislu boljeg reagovanja na vanjske podražaje, kao što su osjećaj bola nakon uboda i osjećaj pritiska na dodir (Ziegler i sar. 2014).

Kada su poredeni rezultati između svake studije pojedinačno kao najbolja se pokazala SYDNEY studija, jer je efekat alfa lipoinske kiseline na smanjenje simptoma dijabetičke neuropatije bio najznačajniji, dok su rezultati ALADIN III studije bili najslabiji, jer nisu pokazali statistički signifikantnu razliku u pogledu poboljšanja simptoma između pacijenata koji su primali placebo i onih koji su dobijali alfa lipoinisku kiselinu. Pretpostavlja se da je SYDNEY studija imala najbolje rezultate jer je to bila monocentrična studija, dok su u ALADIN III studiju bili uključeni ispitanici iz najviše različitih centara. Pored toga SYDNEY studija je imala i najbolju pripremu za ispitivanje, kao i uvodni placebo tretman za sve ispitanike da bi se smanjio ekstremni odgovor na placebo, dok u ALADIN III studiji to nije bio slučaj i ispitanici iz te studije su imali najveći odgovor na placebo (Ziegler i sar. 2014).

Navedena ispitivanja su ohrabrujuća, jer su pokazala da kratkoročna intravenska primjena alfa lipoinske kiseline,

sama ili praćena dužom oralnom administracijom alfa lipoiinske kiseline mođe dovesti do sporijeg napredovanja simptoma dijabetićeke neuropatije, koja je jako opasna komplikacija dijabetesa jer mođe dovesti do pojave dijabetićeke stopala kod pacijenata. Pokazalo se da je tretman duži od tri sedmice imao statistićeke siginifikantan efekat u smislu poboljšanja simptoma i da je napredak postignut upotrebom alfa lipoiinske kiseline klinićeke znaćajan (Ziegler i sar. 2014).

4. ZAKLJUĆCI

Uticać hiperglikemijom potaknutog oksidativnog stresa na razvoj dijabetićeke neuropatije, koja je jedna od najozbiljnijih komplikacija dijabetesa, kao i upotreba antioksidanasa, prvenstveno alfa lipoiinske kiseline u cilju sporijeg napredovanja dijabetićeke neuropatije su bile teme brojnih istraživanja koja su dovela do mnogih zakljućaka. Neki od tih zakljućaka su:

Dijabetes je hronićeke metabolićeke poremećaj koji prate brojne komplikacije.

Jedna od jako ozbiljnih komplikacija dijabetesa je dijabetićeke neuropatija.

Istraživanja su pokazala da oksidativni stres ima ulogu u nastanku i progresiji brojnih bolesti.

Dijabetes je jedna od bolesti na ćiji nastanak i razvoj komplikacija ima uticajać prekomjerna produkcija slobodnih radikala i slaba antioksidativna zašćita, odnosno oksidativni stres.

Antioksidansi su jako korisni u borbi protiv oksidativnog stresa.

Jedan od antioksidanasa za koji se pokazalo da usporava razvoj i smanjuje bolne simptome dijabetićeke neuropatije uzrokovane oksidativnim stresom ja alfa lipoiinska kiselina.

Za tretman dijabetićeke neuropatije preporućena doza alfa lipoiinske kiseline se kreće od 300 do 600 mg/dan.

Odobrena je intravenska i oralna primjena alfa lipoiinske kiseline.

Doza od 600mg/dan alfa lipoiinske kiseline se pokazala kao najsigurnija i preporućena doza, jer se kod upotrebe većih doza mogu javiti abdominalni bol, povraćanje i mućnina.

Tretman alfa lipoiinskom kiselinom (600mg/dan) u trajanju od tri sedmice i dućeke mođe biti koristan za pacijente sa dijabetićeke neuropatijom, jer dovodi do poboljšanja simptoma dijabetićeke neuropatije.

5. LITERATURA

Babatunde Oyenih A, Olabode Ayeleso A, Mukwevho E, Masola B. (2014). Antioxidant Strategies in the

Management of Diabetic Neuropathy. BioMed Research International. Vol. 2014.

Barada A, Vućkovićeke Rebrina S. (2009). Neurološćeke komplikacije u šećernoj bolesti. Medix. 80/81. 158-163.

Ćakarićeke D. (2009). Primjena ciklićeke voltametrije u odredivanju antioksidativne aktivnosti biološćkih uzoraka. Završni rad. Zagreb: Sveućilište u Zagrebu.

Ćukićeke MM, Bošćkovićeke B, Ćurćić Jovanovićeke M, Dikićeke PM, Jelenkovićeke A, Ćukićeke-Ćosićeke D, Jovanovićeke DM, Maksimovićeke Z, Matovićeke V, Miljkovićeke B, Miljkovićeke S, Ninkovićeke M, Savićeke S, Stevanovićeke I, Tasićeke Lj, Šobajićeke S. (2008). Reaktivne hemijske vrste i oksidativni stres: Oksidativni stres - Slobodni radikali, Prooksidansi, Antioksidansi. Beograd: Mono i Manjana

Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. (2012). The Bad, the Good and the Ugly about Oxidative stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Kasznicki J et al. (2012). Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. Molecular Biology Reports. 39(9): 8669–8678.

Kumar Tiwari B, Bhooshan Pandey K, Abidi AB, Rizvi SI. (2013). Markers of Oxidative Stres during Diabetes Mellitus. Journal of Biomarkers. Vol. 2013.

Lushchak V, Gospodaryov VD. (2012). Oxidative stress and Disease. Rijeka: InTech.

Papanas N, Maltezos E. (2012). α -Lipoic Acid, Diabetic Neuropathy, and Nathan's Prophecy. Sage Journals. Volume: 63 issue: 2, 81-83

Roman-Pintos LM et al. (2016). Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. Journal od Diabetes Research. Vol. 2016.

Sifuentes-Franco S, Pacheco-Moises FP, Rodriguez-Carrizalez AD, Miranda-Diaz AG. 2017. The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. Journal of Diabetes Research. Vol. 2017.

Singh U, Jialal I. (2008). Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. Nutrition Reviews Journal. 66(11):646-657.

Ullah A, Khan A, Khan I. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. Saudi Pharmaceutical Journal. 24, 547-553.

Ziegler D et al. (2006). Oral Treatment with α -Lipoic Acid Improves Symptomatic Diabetic Polyneuropathy. Diabetes Care 29:2365-2370.

Ziegler D, Nowak H, Low P.A. (2004). Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant α -lipoic acid: A meta analysis.

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN THE PATHOGENESIS OF DIABETIC NEUROPATHY AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF ALPHA-LIPOIC ACID

Elvedina Trumić

PZU Apoteke Ibn Sina, 76120 Brčko, Bosnia i Hercegovina

ABSTRACT

Diabetes is a chronic metabolic disorder with a rapidly increasing prevalence around the world and it is characterized with hyperglycemia. Diabetes is that kind of disease which carries a risk of numerous complications. One of those complications is diabetic neuropathy. Diabetic neuropathy is diabetic complication which appears because of damage of peripheral nerve system, as a consequence of diabetes. That is the most common and at the same time the latest recognized long-term complication of diabetes, in both types of diabetes. Distal symmetric polyneuropathy is characteristic for patients with poor glycemic control and its prevalence increases with age and duration of diabetes. Researches have shown that oxidative stress has great impact on diabetic neuropathy. Oxidative stress is biochemical phenomenon which appears because of increased production or accumulation of free radicals. In diabetic patients poor glycemic control leads to chronic hyperglycemia. High glucose level can stimulate free radical production and increase oxidative stress. Antioxidants are very important in the fight against oxidative stress. Alpha lipoic acid is the antioxidant which reduces improvement and painful symptoms of diabetic neuropathy caused by oxidative stress. Experiments have shown that alpha lipoic acid has meaningful potential in clinical practice.

Keywords: diabetes, diabetic neuropathy, oxidative stress, antioxidants, alpha lipoic acid

Author for correspondence: elve_dina91@hotmail.com

ANTIOKSIDATIVNE OSOBINE PROPOLISA

Azra Avdić^{1*}, Marizela Šabanović², Midhat Jašić², Sergije Marković³

¹ PZU Apoteka „Adonis“, Lukavac

² Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli

³ Medicinski fakultet, Univerzitet u Tuzli

*Autor za korespondenciju: avdic.azra87@gmail.com

SAŽETAK

Uvod: Propolis ima snažan antioksidativni kapacitet zbog svog polifenolnog sastava. Geografski i botanički različiti uzorci propolisa imaju i drugačiji hemijski sastav, što direktno utiče na njihovo djelovanje kao antioksidans.

Cilj i zadatak: Cilj rada je predstavljanje antioksidativnih svojstava propolisa, njegovih hemijskih komponenata i načina njihovog antioksidativnog djelovanja.

Metodologija: Istraživanje se bazira na prikupljanju i analizi postojećih stručnih i naučnih informacija i sistematizaciji dostupnih podataka.

Rezultati: Antioksidativno djelovanje propolis ispoljava na različite načine. Flavonoidi iz propolisa mogu djelovati kao „hvatači“ slobodnih radikala i tako ih inaktivirati. Vrše inhibiciju određenih enzima i na taj način inhibiraju produkciju reaktivnih oblika kiseonika. Također, heliraju prooksidativne jone metala, te pojačavaju djelovanje drugih antioksidanasa. Određeni flavonoidi, prisutni u propolisu, smanjuju ekspresiju mutiranog p53 proteina na gotovo nemjerljivu razinu u stanicama različitih oblika karcinoma.

Osim flavonoidnih komponenata, značajnu antioksidativnu ulogu u propolisu imaju vitamini, naročito C i E, te Zn, nađeni u svim vrstama propolisa.

Zaključak: iako propolis ima veliki antioksidativni potencijal, na tržištu ne postoje preparati standardizovanog kvalitativnog i kvantitativnog sastava koji bi se u ovu svrhu koristili.

Ključne riječi: flavonoidi, antioksidansi, propolis

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PROPOLIS

Azra Avdić^{1*}, Marizela Šabanović², Midhat Jašić², Sergije Marković³

1 PZU Pharmacies „Adonis“ Lukavac
2 Technological faculty University of Tuzla
3 Faculty of Medicine University of Tuzla

*Corresponding author: avdic.azra87@gmail.com

SUMMARY

Introduction: Propolis has a strong antioxidant capacity due to its polyphenolic composition. Geographically and botanically different propolis samples have a different chemical composition, which directly affects their antioxidant effect. Aim: The aim of the paper is to present the antioxidant properties of propolis, its chemical components and their antioxidant properties.

Methodology: Research is based on the collecting and analysis of existing professional and scientific information and systematization of available data.

Results: Propolis exhibits its antioxidant action in different ways. Propolis flavonoids can act as "catchers" of free radicals and thus inactivate them. They inhibit certain enzymes and thus inhibit the production of reactive oxygen species. They also chelate prooxidative ions of metals, and enhance the action of other antioxidants. Certain flavonoids present in propolis reduce the expression of mutated p53 protein at an almost undetected level in cells of various forms of cancer. Except flavonoid components, a significant antioxidant role in propolis play vitamins, in particular C and E, as well as Zn, found in all types of propolis.

Conclusion: Although propolis has a high antioxidant potential, there are no standardized qualitative and quantitative preparations on the market that would be used for this purpose.

Key words: flavonoids, antioxidants, propolis

OTKRIVANJE LIJEKOVA U OKSIDOREDUKCIJSKIM I KOVALENTNIM PROCESIMA INHIBICIJE ENZIMA

Zerina Krličević¹, Miralem Smajić¹, Amra Džambić¹

¹ Farmaceutski Fakultet, Univerzitet u Tuzli, Univerzitetska br. 8, 75000 Tuzla

SAŽETAK

Enzimi predstavljaju katalitičke proteine koji djeluju na više raznovrsnih procesa u organizmu. Na temelju svojstava i mehanizama djelovanja enzima, zasnovana su suštinska značenja dizajna i otkrivanja lijekova putem enzimске inhibicije. Enzimski inhibitori mogu djelovati na više načina, a u organizmu može doći do reverzibilne i ireverzibilne inhibicije enzima. Pri reverzibilnoj inhibiciji aktivnost enzima se u potpunosti vraća u prvobitno stanje kada se ukloni inhibitor, dok pri ireverzibilnoj inhibiciji enzim ostaje inaktivan i nakon uklanjanja inhibitora. Ovim radom je napravljen pregled osnovnih načina djelovanja enzima, obrađeni su mehanizmi reverzibilne i ireverzibilne inhibicije, te na koji način su ovi mehanizmi poslužili u otkrivanju lijekova.

Reverzibilna inhibicija može biti kompetitivna i nekompetitivna, a u nekim situacijama i akompetitivna i mješovita. Svi ovi tipovi, izuzev kompetitivnog tipa, često mogu biti i ireverzibilni. Kompetitivni inhibitor je sličan supstratu i veže se za aktivno mjesto enzima, tako da se supstrat ne može vezati na isto aktivno mjesto. Kod nekompetitivne inhibicije supstrat i inhibitor se vezuju istovremeno za različita mjesta na enzimu i pri tome formiraju E-S-I kompleks koji se ne raspada, pa smanjenje brzine reakcije odnosno inhibicija nastaje zbog smanjenja količine enzima. Najvažnija razlika između kompetitivne i nekompetitivne inhibicije je ta što se kompetitivna inhibicija može prevladati dovoljno visokom koncentracijom supstrata, dok se nekompetitivna inhibicija ne može na taj način eliminirati.

Cijeli koncept enzimске inhibicije poslužio je kao platforma za otkrivanje lijekova koji se temelje na enzimskoj inhibiciji pri čemu su neki od njih slučajna otkrića za koja se pokazalo da djeluju na temelju ovog mehanizma, a mnogi su nastali upravo na osnovu poznavanja enzimске inhibicije i dali vrlo potentne medicinske agense ili vodeće supstance koje su poslužile za razvoj novih medicinskih agenasa.

Ključne riječi: enzim, inhibicija, otkrivanje lijekova.

Zerina Krličević

Tel: +387 35 320 990

e-mail: krlicevic.zerina@hotmail.com

1. UVOD

Koncept korištenja malih molekula koje specifično ciljaju jedan ili više enzimskih sistema u tijelu nije novost u otkrivanju lijekova. Od davnina je poznato da su komponente ekstrahirane iz prirodnih produkata korištene kao medicinski agensi. Daljim istraživanjima se ustanovilo da one ispoljavaju svoj efekat ciljanim djelovanjem na određene enzimске sisteme (Albert A,1985). U 20. stoljeću pojavljuje se novi koncept nazvan „magic bullet“ koji

karakterize selektivna toksičnost. Predstavio ga je Ehrlich kao racionalni pristup u hemoterapiji i kao koncept koji slijedi racionalni dizajn i otkriće enzimskih inhibitora (Albert 1985). 1935. godine dolazi do otkrića antibakterijske aktivnosti azo boje prontosil od strane Domagka (Domagk G,1935). Pojašnjenje mehanizma djelovanja je uslijedilo 1940. godine od strane Woodsa o metaboličkoj redukciji tog spoja u sulfanilamid, antimetabolit p-aminobenzojeve kiseline, te je konačno otvorilo vrata racionalnom dizajnu enzimskih inhibitora (Woods DD,1985;Albert A,1940)To je naročito postalo značajno u terapiji raka tokom ranog

perioda racionalnog dizajna lijekova (Albert A,1985). Kako je mehanizam enzima postao razumljiviji, strategija dizajniranja inhibitora je postajala sve sofisticiranija, što je rezultiralo razvojem jačih i selektivnijih inhibitora. Međutim, mora se naglasiti da je u procesu dizajniranja lijekova, dizajniranje potentnog inhibitora enzima samo prvi korak u dugom i mukotrpnom procesu razvoja lijeka. Drugi faktori, uključujući farmakokinetički profil inhibitora, toksičnost, nuspojave i studije na životinjama i pretkliničke studije, moraju biti zadovoljavajuće prije nego inhibitor uopšte uđe u kliničke studije kao kandidat za novi lijek. Iako postoji velika količina podataka o enzimskim inhibitorima, samo nekoliko izabranih nalaze se kao lijekovi na tržištu.

2. PREGLED ENZIMA KAO KATALITIČKIH RECEPTORA

Enzimi su specijalizirani proteini koji funkcionišu kao katalizatori koji povećavaju brzinu biokemijske reakcije. Interakcijom sa supstratom (molekule reaktanta na koje enzim djeluje), enzimi kataliziraju hemijsku reakciju koja je uključena u sintezu mnogih ćelijskih produkata. Enzimi su klasificirani na osnovu tipa reakcije koju kataliziraju. Postoji 6 glavnih klasa (familija) enzima, numerisanih od 1 do 6, koje su određene od strane Enzimске komisije (EC) pri Međunarodnoj uniji biokemije i molekularne biologije. To su sljedeće klase:

1. oksidoreduktaze (npr., dehidrogenaze),
2. transferaze (grupa enzima za transfer; npr., kinaze),
3. hidrolaze (hidrolitičke reakcije, npr., esteraze),
4. liaze (stvaranje ili uklanjanje dvostruke veze),
5. izomeraze (npr., mutarotacija glukoze od strane mutaze),
6. ligaze (spajanje dva supstrata uz utrošak energije, takođe uključuje i sintetaze).

Mnogi enzimi zahtijevaju kofaktore, koji im omogućavaju da vrše katalizu. Ove male molekule (uključujući jone) su u uskoj vezi sa enzimima i neophodni su za funkcionisanje enzima. Kao makromolekularni proteini, enzimi imaju svoju glavnu funkciju da vežu supstrate. U samom procesu transformacije ovih supstrata u produkte (kataliziranje hemijske reakcije), enzimi koriste sve potrebne alate kako bi držali ove supstrate veoma čvrsto za aktivno mjesto u toku reakcije. S obzirom da sve hemijske reakcije zahtijevaju pucanje kovalente veze i stvaranje druge, supstrat mora proći kroz prelazno stanje ili „aktivirani kompleks“, koji predstavlja nestabilno stanje, jer su veze polarizirane i dolazi do stvaranja parcijalnog naboja (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2004).

Teoriju enzimom aktiviranog kompleksa predložio je Pauling. Zaključio je da je aktivno mjesto enzima komplemetarno strukturi aktiviranog kompleksa tako da je veza enzima i aktiviranog kompleksa izuzetno čvrsta. Sposobnost da se takvi kompleksi stabiliziraju i reducira energija aktivacije reakcije, a samim tim i povećava brzina reakcije, zavisi od mnogo faktora, kovalentnih i nekovalentnih. (Pauling L,1948; Garcia-Viloca M, Gao J, Karplus M, et al,2004). Nekovalentni faktori uključuju efekte entropije, kao što je neposredna blizina i orijentacija;

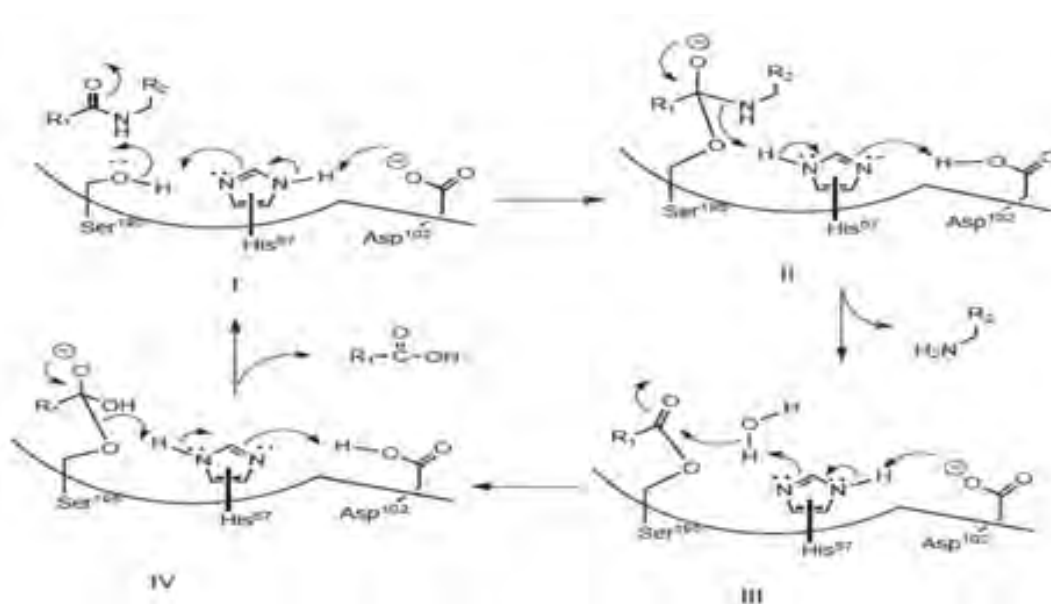
ograničeno kretanje, gdje enzimi imaju sposobnost da približe reagujuće molekule i postave ih u pogodan položaj za formiranje veza; desolvatacijski efekti gdje dolazi do uklanjanja molekula otapala (vode) sa reaktanta; elektrostatičku stabilizaciju prelaznog stanja kako bi se stabilizirao parcijalni naboj koji je nastao u aktiviranom kompleksu; induciranje učinaka u kojima fleksibilnost enzima može smjestiti supstrat, intermedijer i/ili produkt; naprezanje i distorzijske efekte koji povećavaju reaktivnost komponenti; i mnoge druge pomoćne efekte.

Pored toga, kovalentni efekti igraju važnu ulogu u katalitičkoj ulozi enzima. Kovalentni efekti nagovještavaju da se formirala veza pomoću enzima (ili njegovih kofaktora) i da je supstrat transformisan. Ovi kovalentni efekti uključuju osnovnu kiselo-baznu katalizu u kojima grupe bočnih lanaca aminokiselina u cjelini učestvuju u biohemijskoj reakciji tako što doniraju proton (kiseline) ili primaju proton (baze), kao i nukleofilnu i elektrofilnu katalizu, gdje se formira veza sa grupama bočnih lanaca aminokiselina (ili kofaktorom) i supstrata. Treba napomenuti da „kovalentna kataliza“ tradicionalno podrazumijeva prijenos grupe sa jednog supstrata na drugi što je olakšan proces zahvaljujući enzim-grupa intermedijeru (npr., enzim saharaza fosforilaza prenosi glukozni dio saharaže na fosfat dajući produkte glukoza-1-fosfat i fruktozu pomoću enzim-glukozil intermedijera). Grupe bočnih lanaca mnogih aminokiselina (tj., kisele i bazne aminokiseline, npr., aspartat, glutamat, histidin, lizin, arginin, tirozin i cistein) kao i nukleofilne grupe aminokiselina, kao što je cistein, dozvoljavaju takve kovalentne efekte. Posljednje analize povećanja brzine enzima govore da nekovalentni efekti dozvoljavaju povećanje 11 puta više nego nekatalizirane reakcije dok za enzime koji imaju povećanje veće od 11 puta u odnosu na nekatalizirane reakcije, kovalentna kataliza u prelaznom stanju se ubraja u posebne slučajeve povećanja brzine enzima (Baker BR,1967).

Nekovalentni efekti kao što su neposredna blizina i orijentacija mogu biti objašnjeni na osnovu toga da enzimi imaju sposobnost da utiču na red reakcije pomoću principa „efektivne koncentracije“ – na primjer, promijeniti reakciju drugog reda u reakciju prvog reda približavajući reagujuće molekule kako bi se smanjio gubitak entropije (ograničavanje kretanja molekula) za reagujuće supstance.

Kao što je prethodno spomenuto, enzimi koriste kovalentne hemizme kako bi uticali na katalizu. Naime, postoji postulat da kovalentna hemija igra dosta važniju ulogu u enzimskoj katalizi, što se ranije nije razmatralo (Baker BR,1967). Nukleofilna kataliza pomoću hidrolitičkih enzima, kao što je serin proteaza ili esteraza, su klasični primjeri kovalentnih efekata u enzimskoj katalizi. U takvim sistemima, na primjer, kao što je slučaj kod serinske proteaze himotripsina, koja hidrolizira peptidne veze koje sadrže aromatske aminokiseline (npr., fenilalanin i tirozin), kovalentni efekti se pojavljuju na razini kiselina, baza i nukleofilne kovalentne katalize. Slika 1. ilustrira mehanizam prihvaćen za takve enzime.

Treba napomenuti da sve serin proteaze sadrže „katalitičku trijadu“ (set od tri aminokiseline u aktivnom mjestu koje djeluju skupa i koje su direktno uključene u katalizu), označene kao Ser-195, His-57 i Asp-102 (broj predstavlja poziciju u primarnoj strukturi proteina) koje su



Slika 1. Kisela, bazna i nukleofilno kovalentna kataliza himotripsinom

prisutne u aktivnom mjestu ovih proteaza. Kataliza djeluje tako što pravi hidroksilnu grupu Ser više nukleofilnom za napad na karbonylni centar peptidne veze. Treba se prisjetiti da, uopšteno, hidroksilne grupe imaju pKa vrijednosti veće od 14, te da kao takve nisu kisele i nisu sposobne da joniziraju pri fiziološkom pH.

Međutim, zbog katalitičkih trijada, proton Ser-OH grupe je prenešen na Asp-dio preko His grupe u „sistemu punjenja releja“ tako da je Ser-OH transformisana u visoko nukleofilni alkoksidni jon. To je postignuto zahvaljući Asp grupi koja se ponaša kao baza koja preuzima proton od His, koji, također, može odvojiti proton od Ser-OH grupe (vidjeti I na slici 1.). Tako se His ponaša kao tautomerni katalizator u ovom enzimu (tj., ponaša se i kao kiselina i kao baza), te u suštini prenosi proton sa Ser na Asp. Ser (kao alkoksid) je sada dosta moćniji nukleofil i može napasti peptidil karbonylnu grupu kako bi se stvorio „tetrahedralni oksid-anion intermedijer“ (vidjeti II na slici 1.), koji propada kako bi se oslobodio novi amino terminus peptida i acilirao Ser-enzim (vidjeti III na slici 1.). Sljedeći dio reakcije uključuje molekulu vode (koja je postala više nukleofilna istim mehanizmom; vidjeti III na slici 1.) koja ide na to da hidrolizira, kroz tetrahedralni intermedijer (vidjeti IV na slici 1.), Ser-acil vezu kako bi se oslobodio novi karboksilni terminus peptida (R_1-COOH) i oslobodio enzim, koji može biti iskorišten za neki drugi proces katalize. Poznavanje mehanizama i interakcija, kovalentnih i nekovalentnih, koji dopuštaju enzimima da vrše tako efikasnu katalizu, omogućava uvid u dizajniranje molekula koje mogu postići selektivnu inhibiciju enzima. Takva saznanja otvaraju put dizajniranju i otkrivanju novih lijekova.

2.1. Primjeri reverzibilnih enzimskih inhibitora

Dizajniranje enzimskih inhibitora uključuje slučajni skrining sintetičkih hemijskih agenasa, prirodnih produkata i kombinatorne biblioteke praćene molekularnom optimizacijom ili SARs takozvane „vodeće“ strukture

kao i biosteričkih analoga supstrata tog enzima. Lijekovi (npr., finasterid) su bili razvijeni za jednu indikaciju, ali posmatrajući neželjene efekte, dovele su i do drugih upotreba.

Racionalni pristup dizajniranju enzimskih inhibitora je olakšan ako je enzimska reakcija okarakterisana u smislu kinetičkog mehanizma. Takva karakterizacija uključuje poznavanje kinetičkih parametara (konstanta brzine i konstanta disocijacije) pojedinačnih koraka u cjelokupnom putu reakcije, kao i karakterizaciju (bilo kakvih) intermedijera uključenih u pojedinačne korake. Primjeri takvih „racionalnih inhibitora“ uključuju reverzibilne i ireverzibilne enzimske inhibitore.

2.1.1. Antimetaboliti

Antimetaboliti su agensi koji interferiraju sa funkcionisanjem esencijalnih metabolita i najčešće su dizajnirani kao strukturni analozi prirodnih metabolita.

Kao što je opisano i ranije, mehanizam djelovanja sulfanilamida je kompetitivna inhibicija p-aminobenzojeve kiseline. Međutim, u slučaju sulfanilamida, mehanizam je otkriven nakon što je uočena bakterijska inhibicija.

Čest je slučaj da se za neki lijek otkrije da ima određene terapijske efekte, a kasnije se zaključi da je zapravo taj efekat uzrokovan enzimskom inhibicijom. Drugi klasični primjeri inhibitora koji djeluju kao antimetaboliti uključuje brojne nukleozidne analoge koji su korišteni kao antiviralni i antitumorski agensi. Ovi agensi imaju strukturne sličnosti sa prirodnim nukleozidima, koji su u svojoj trifosfatnoj formi supstrati za polimeraze nukleinskih kiselina koje su uključene u sintezu nukleinskih kiselina. Polimeraze nukleinskih kiselina kataliziraju kondenzaciju slobodnog 3'-hidroksi kraja nukleinske kiseline sa dolaznim 5'-trifosfatnim derivatom nukleozida (deoksinukleotid trifosfat [dNTP]), dajući 3',5'-fosfodietersku vezu. Stoga, da bi se nukleozidni analozi natjecali sa prirodnim supstratom u sintezi nukleinskih kiselina, moraju biti

intracelularno pretvoreni u svoj mono-, di-, i na kraju, trifosfatni derivat prije nego ispolje svoje inhibitoryno djelovanje na sintezu nukleinskih kiselina. Neke strategije dizajniranja lijekova podrazumijevaju ugrađivanje „maskirane“ fosfatne grupe na nukleozide tako da nakon njegove apsorpcije on ulazi u sistemsku cirkulaciju kao monofosfat (Kraft GA, Katzenellenbogen JA, 1981).

Većina ovih analoga su dizajnirani tako da im nedostaje 3'-hidroksi grupa i oni su dideoksi derivati prirodnog supstrata. Tako, ovi analozi osiguravaju da kada se jednom inkorporiraju u nukleinske kiseline, dalje produžavanje nukleinske kiseline bude spriječeno zbog nedostatka 3'-hidroksi grupe.

3. IREVERZIBILNA INHIBICIJA ENZIMA

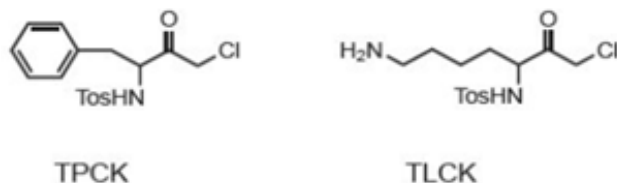
Kao što je prethodno opisano, ireverzibilna inhibicija enzima je definirana kao „vremenski ovisna inaktivacija enzima“, što implicira da je enzim trajno modificiran, jer ne može više vršiti svoju katalitičku funkciju. Ova modifikacija je rezultat formiranja kovalentne veze između inhibitora i aminokiselinske grupe proteina (enzima). Štaviše, kovalentna veza je izuzetno stabilna i ni u kojem slučaju hidroliza neće dovesti enzim u prvobitno stanje i u njegovu početnu strukturu.

U većini slučajeva ireverzibilne inhibicije, novi enzim bi se generisao kroz gensku transkripciju i translaciju kako bi se stvorio novi enzim koji vrši normalnu katalitičku funkciju. U suštini, postoje dva tipa ireverzibilnih enzimskih inhibitora, molekule slične supstratu (afinitetni biljezi) ili ireverzibilni inhibitori koji ciljaju aktivno mjesto i ireverzibilni enzimski inhibitori koji se temelje na mehanizmu djelovanja.

3.1. Afinitetni biljezi i ireverzibilni inhibitori koji ciljaju aktivno mjesto

Afinitetni biljezi su oni hemijski spojevi koji sami po sebi mogu ciljati bilo koju nukleofilnu grupu u enzimu, posebno one koji se nalaze u i oko katalitičkog centra proteina. Ovi agensi slični su supstratu tako da se mogu vezati na aktivno mjesto enzima. U većini slučajeva, ovi agensi također sadrže elektrofilnu grupu, koja uključuje grupe kao što su halo-metil ketoni ($X-CH_2C=O$, gdje je $X=$ halid), sulfonil fluoridi (SO_2F), nitrogen mustardi [$ClCH_2CH_2)_2NH$], diazoketoni ($COCHN_2$), i druge takve reaktivne grupe, koje mogu „obilježiti“, ili alkilirati nukleofilnu aminokiselinsku grupu u enzimu.

Imaju tendenciju da budu neselektivni u svom djelovanju i imaju malu terapijsku vrijednost, a upravo zbog toga jer su neselektivni su samim tim i toksični. Uglavnom

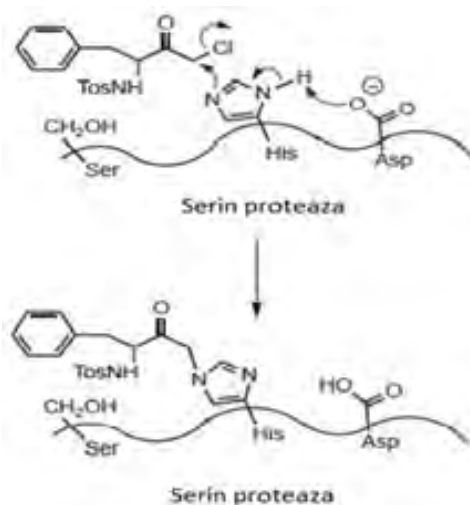


Slika 2. TPCK (tosil-fenilalanil-hlorometil-keton i TLCK (tosil-lizil-hlorometil-keton)

su korišteni kao biohemijski alati za ispitivanje aktivnih mjesta enzima kako bi se diferencirao tip aminokiselinskih grupa u i oko katalitičkog centra enzima. Klasičan primjer afinitetnog biljega je TPCK (tosil-fenilalanil-hlorometil-keton), ireverzibilni inhibitor serin proteaze himotripsina.

Uzimajući u obzir da TPCK slični aminokiselini fenilalanin, može se vezati na aktivno mjesto himotripsina, čija je selektivnost usmjerena ka takvim hidrofobnim aminokiselinskim grupama (Phe i Tyr). U procesu normalne peptidne hidrolize, reaktivni hlorometilketon označava nukleofilnu histidinsku grupu kao dio katalitičke trijade (Ser-His-Asp) u aktivnom mjestu proteaze (Slika 2). Još jedan slično dizajniran afinitetni biljeg jeste TLCK (tosil-lizil-hlorometil-keton), čija je specifičnost usmjerena ka tripsin proteazi. Tripsin cijepa peptidne veze na mjestu gdje se nalaze bazne aminokiseline, lizin i arginin. Utvrđeno je da je TLCK specifični inhibitor za tripsin ali nema aktivnost za himotripsin. S druge strane, TPCK, iako izuzetno specifičan za himotripsin, nije pokazao aktivnost za tripsin.

Zbog svojstvene reaktivnosti i neselektivnosti ovih afinitetnih biljega i njihove ograničene upotrebe u terapiji, Baker proširio je ovaj koncept u svrhu dizajniranja inhibitora koji bi imali veću selektivnosti i specifičnost i tako postali potencijalni kandidati za lijekove (Charnas RL, Knowles JR, 1981)



Slika 3. Mehanizam afinitetnih obilježavanja (afinitetni biljezi) serin proteaze sa TPCK (tosil-fenilalanil-hlorometil-keton)

On je dizajnirao nekoliko analoga, nazvanih ireverzibilni inhibitori usmjereni ka aktivnom mjestu, koji ciljaju timidilat sintazu, ključni enzim koji učestvuje u de novo metabolizmu timidilata. Ovi analozi sadrže supstrat-vezujući region povezan sa reaktivnom grupom, kao što je halometil keton, pomoću lanca čija se dužina može mijenjati. Supstratni dio analoga osigurava i afinitet i brzo vezanje na aktivno mjesto enzima. Kada se supstrat sveže, područja u i oko vjezujućeg mjesta i na površini enzima mogu biti ispitana/obilježena nukleofilnim aminokiselinskim grupama.

Manipulirajući dužinom veze može se kreirati idealan inhibitor tako da svaka pogodno locirana, dovoljno

nukleofilna aminokiselinska grupa na površini enzima potencijalno može biti alkilirana halometilketonom (Slika 4.). Jednom alkilirana dolazi do formiranja veze između aktivnog mjesta i označenih aminokiselinskih grupa i na taj način je spriječena daljnja kataliza tim enzimom.

3.2. Primjeri ireverzibilnih enzimskih inhibitora

Tokom posljednje tri decenije, pored racionalnog dizajniranja hiljada molekula koje su sintetizirane i testirane kao ireverzibilni inhibitori koji se temelje na mehanizmu djelovanja, također se došlo do saznanja da sama priroda poznaje ovaj mehanizam enzimske inhibicije i da je pružila nekoliko izuzetnih ireverzibilnih enzimskih inhibitora koji se temelje na mehanizmu djelovanja. U nastavku se nalazi nekoliko izabranih primjera kako bi se demonstrirao način djelovanja ovih inhibitora.

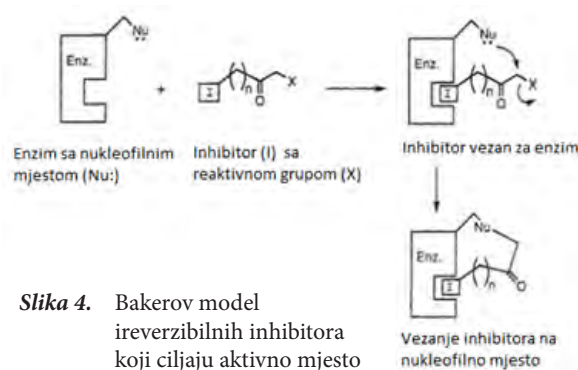
Halo enol laktoni

Halo enol laktoni su primjer ireverzibilnih inhibitora za serin proteazu. Ovi analozi su razvijeni od strane Katzenellenboga i saradnika (Kraft GA, Katzenellenbogen JA, 1981). U uobičajenoj katalitičkoj obradi Ser-CH₂-OH grupe, analozi proizvode reaktivni halo-metil keton, koji nakon toga alkalizira obližnju nukleofilnu grupu na enzimu (Slika 5). Drugi inhibitori za serin proteaze su dizajnirani od strane nekoliko istraživača.

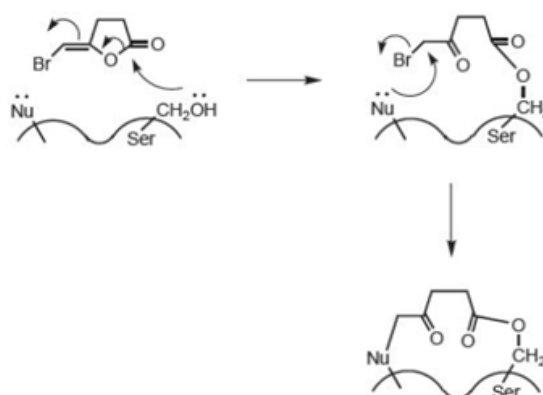
Klavulanska kiselina

Klavulanska kiselina je moćan inhibitor bakterijske β-laktamaze. Ovaj enzim je serin proteaza i može hidrolizirati β-laktame, kao što su penicilinski antibiotici. To je glavni enzim odgovoran za rezistenciju bakterija na penicilin (Charnas RL, Knowles JR, 1981).

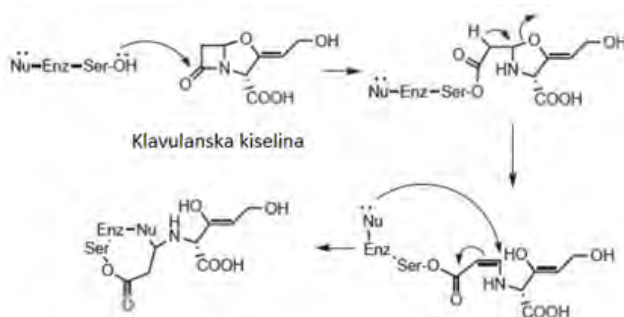
Klavulanska kiselina je β-laktam, kada se daje u kombinaciji sa penicilinom, biva preuzeta od strane β-laktamaze i hidrolizirana. Međutim, tokom hidrolize, klavulanska kiselina prolazi cijepanje, što vodi ka stvaranju „Mihael akceptora“, koji onda alkilira nukleofilnu grupu na β-laktamazi, uzrokujući, ireverzibilnu inhibiciju kao što je prikazano na slici 6. Takva kombinacija inhibitora β-laktamaze i penicilina rezultira klinički korisnim sredstvima, npr., klavulanska kiselina plus amoksisilin.



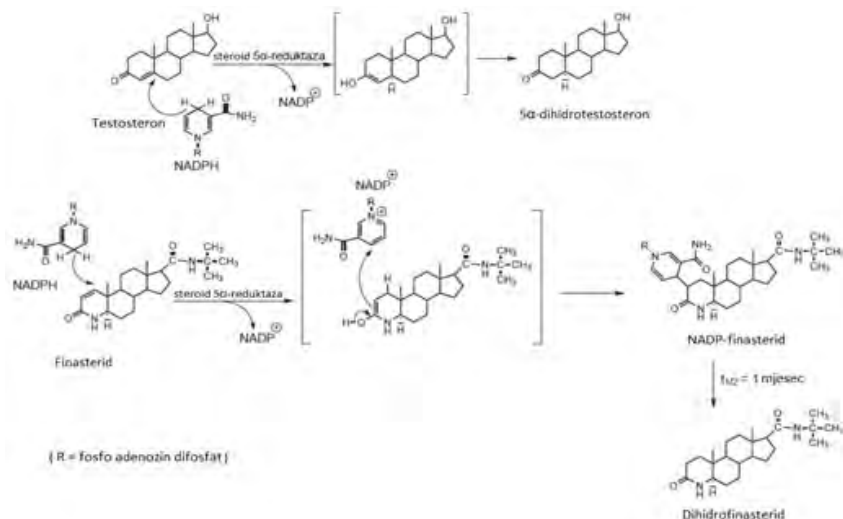
Slika 4. Bakerov model ireverzibilnih inhibitora koji ciljaju aktivno mjesto



Slika 5. Inhibicija serin proteaze bazirana na mehanizmu pomoći Katzenellenbogenovog halo enol laktona



Slika 6. Inhibicija β-laktamaze bazirana na mehanizmu pomoću klavulanske kiseline



Slika 7. Mehanizam redukcije steroidne reduktaze na finasteridu i testosteronu i struktura hipotetskog NADPH dihidrofinasterid adukta³⁷

Finasterid

Finasterid je klinički korisno sredstvo u tretmanu hiperplazije prostate i muške ćelavosti. To je moćan inhibitor koji cilja steroid-5 α -reduktazu, enzim odgovoran za redukciju testosterona u moćniji dihidrotestosteron (Slika 7.).

Inhibitorno djelovanje finasterida pripisuje se i njegovoj sličnosti strukturi testosterona, što omogućava da se lijek veže za enzim i reducira u dihidrofinasterid umjesto testosterona, kao i njegova sposobnost da djeluje kao inhibitor temeljen na mehanizmu, pri čemu kofaktor NADPH nije dostupan, jer dolazi do stvaranja kovalentnog NADP-dihidrofinasterid adukta kao što je prikazano na slici 7. Ovaj adukt veoma sporo otpušta dihidrofinasterid sa poluzivotom koji iznosi 1 mjesec (Terrett NK, Bell AS, Brown P. et al,1996).

4. NOVOOTKRIVENI INHIBITORI KLINIČKI VAŽNIH ENZIMA

4.1. Ciklički nukleotidni inhibitori fosfodiesteraze

Fosfodiesteraze (PDE) pripadaju velikoj familiji enzima koji hidroliziraju fosfatne esterske veze, povezujući dvije hidroksilne grupe sa fosfornom kiselinom. U prirodi postoji mnogo biomolekula koje sadrže takve fosfodiesterne veze uključujući glicerol fosfate (fosfolipide), šećerne fosfate, inozitol fosfate, nukleinske kiseline i nukleotide uključujući ciklične nukleotide.

Fosfodiesteraze hidroliziraju 3'-5' fosfodiesterne veze svog primarnog supstrata, cAMP ili cGMP, odnosno dolazi do stvaranja AMP-a (5'-adenozin monofosfata) i GMP-a (5'-gvanozin monofosfata).

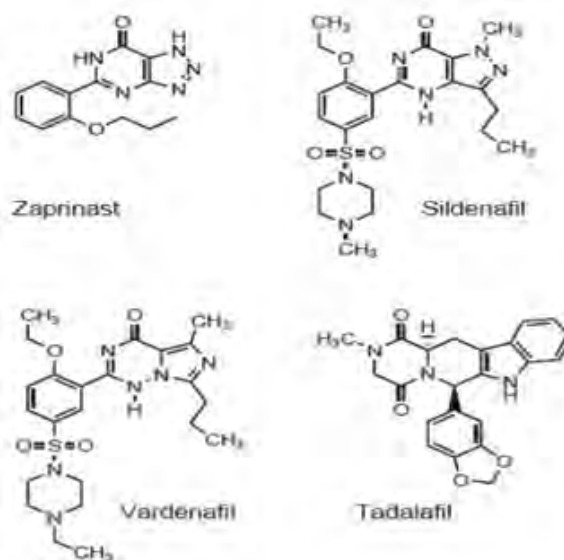
Fosfodiesteraze mogu vezati ciklični nukleotid sa selektivnošću ovisno o određenom izoenzimu. cAMP i cGMP se formiraju iz svojih prekursora nukleotid trifosfata, odnosno adenzin trifosfata (ATP) i gvanozin trifosfata (GTP). Postoji mnogo izoformi fosfodiesteraza prisutnih u ćelijama, što daje veliku raznolikost u specifičnosti supstrata i ćelijskoj regulaciji. Ova raznolikost nadalje igra važnu ulogu za svaku od ovih fosfodiesteraza u različitim mjestima u ćeliji i u fiziološkim i patološkim stanjima. Trenutno se fosfodiesteraze svrstavaju u 11 različitih porodica na osnovu genskih produkata (homologija aminokiselina) i procjenjuje se da obuhvataju više od 100 različitih mRNA iz 21 različitog gena zahvaljujući promjenljivoj spajanju i polaznom mjestu transkripcije. Ispitavanja strukture fosfodiesteraza pokazala su da sve fosfodiesteraze sadrže „katalitičku domenu“ sa konsenzusnom sekvencom koja označava mjesto vezivanja metalnog jona (fosforilazna sekvencija koja sadrži sekvencu prepoznavanja signala za sve fosforilaze) od dva His i dva Asp koji vežu Zn²⁺/Mg²⁺; „izmjenjivač glutamina“ („glutamin switch“), koji predstavlja specifičnost supstrata (cAMP ili cGMP) gdje se nepromjenljiva aminokiselinska grupa glutamina može rotirati oko vodikove veze sa cAMP ili cGMP ili je ograničena vezom sa cAMP i cGMP i kao takva omogućava vezivanje na drugi nukleotid; i „regulatornu domenu“ baziranu na specifičnoj PDE porodici (npr., Ca²⁺-kalmodulin vezujuće mjesto za fosforilazu 1) kao i alosteričko mjesto vezivanja za cGMP (Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al,2002;

Noble MEM, Endicott JA, Johnson LN,2004).

Kristalografska istraživanja sa X-zrakama, inhibitora vezanih za enzim, pokazala su da postoji nekoliko načina vezanja kako bi se postigla inhibicija, a arhitektura aktivnog mjesta često je jedinstvena za različite PDE. Inhibitor se može vezati za enzim vodikovom vezom sa aminokiselinskim grupama koje čine aktivno mjesto za vezivanje cAMP/cGMP, sa grupama koje povezuju kanal koji vodi ka aktivnom mjestu, kao i pomoću vodikovih veza sa vodom u grupe koje se vežu na aktivno mjesto metalnih jona. Štaviše, zbog reda razlike u veličini u ćelijskim koncentracijama cikličkih nukleotida (u poređenju sa svojim prekursorima, nukleotidnim fosfatnim molekulama, <1 do μ M za cAMP/cGMP vs. mM koncentracija za ATP/GTP), ove fosforilaze su postale važne mete u dizajniranju lijekova. (S obzirom da se kompetitivna inhibicija za prirodne supstrate čija je koncentracija 1 μ M postiže mnogo lakše nego ako je supstrat u koncentraciji od 1mM). Poznavanje strukture različitih načina vezivanja za inhibitore sa fosforilazama dovelo je do brzog razvoja selektivnih PDE inhibitora kako bi se omogućile specifične interakcije duž regulacijskih puteva koji uključuju takve PDE. Dok su inhibitori PDE poznati već neko vrijeme (npr., kofein i teofilin koji se upotrebljavaju kao terapijska sredstva već decenijama kao neselektivni inhibitori PDE), razvoj lijekova koji selektivno inhibiraju određenu PDE je novije otkriće. Štaviše, selektivni inhibitori PDE također bi imali bolji profil sigurnosti, budući da bi se očekivalo smanjenje količine stranih / štetnih učinaka. Na primjer, za teofilin, neselektivni PDE inhibitor, se zna da ima uzak terapijski indeks zbog svoje interakcije sa više PDE.

4.2. PDE5 selektivni inhibitori

Podsticaj za razvoj PDE inhibitora nastao je iz znanja da se vazodilatacija (za liječenje visokog krvnog tlaka) može postići stimulacijom atrijskog natriuretskog peptida (ANP), endogenog peptida koji omogućava bubrežno



Slika 8. PDE5 inhibitori

izlučivanje natrija / vode. Nadalje je, takođe, poznato da je ANP stimulirao sintezu cGMP kroz aktivaciju gvanil ciklaze. Tako, inhibicija hidrolize cGMP-a bila je logična meta za razvoj PDE inhibitora kao vazodilatatora. S obzirom da ANP vrši ulogu u bubregu, ideja je bila da se cilja na specifičnu fosforilazu u bubregu. Vodeća komponenta za razvoj ovih PDE inhibitora bio je derivat ksantina, zaprinast (Slika 8.), prethodno korišten kako bi se demonstrirala slaba PDE inhibicija.

Analiza heterocikličnog prstena zaprinasta i poređenje sa purinskim heterociklom cGMP-a dovela je do razvoja brojnih derivata koji pokazuju PDE5 inhibitornu aktivnost, uključujući onog koji sadrži pirazolopirimidinon, što je konačno rezultiralo razvojem moćnog PDE5 inhibitora – sildenafil (Sawyers C.1999).

Tokom kliničkih ispitivanja sildenafil kao antihipertenziva i vazodilatatora, otkriveno je da ima (korisnu) nuspojavu u vezi s erektilnom disfunkcijom. Ovaj farmakološki učinak je prepoznat, procijenjen i komercijaliziran u novu liniju terapijskih agenasa za liječenje erektilne disfunkcije. Inhibicija cGMP hidrolize pomoću PDE5 u corpus cavernosum u penisu rezultira povišenim razinama cGMP, što dovodi do povećane relaksacije glatkih mišića i povećanog protoka krvi i održavanja erekcije. Trenutno, selektivni inhibitori PDE5 uključuju lijekove sildenafil (Viagra), vardenafil (Levitra) i tadalafil (Cialis) (Slika 8.).

Oni su posljednjih godina bili neki od najatraktivnijih tržišnih i komercijalno uspješnih lijekova za liječenje erektilne disfunkcije u muškaraca, a nedavno su odobreni i za liječenje plućne hipertenzije. Ovi lijekovi imaju visoku selektivnost da inhibiraju PDE5 u odnosu na druge klase PDE. PDE5 je PDE koji specifično hidrolizira cGMP na GMP pri niskim nivoima supstrata i također ima vezno mjesto visokog afiniteta za cGMP na svojoj regulatornoj domeni. Za PDE5, koji je izvorno izoliran iz trombocita, je kasnije ustanovljeno da je regulator u kontrakciji vaskularnih glatkih mišića prisutnih u plućima i mozgu. Svi lijekovi su reverzibilni inhibitori PDE5 gdje se vežu na aktivno mjesto PDE5, prilikom čega se heterociklični nukleus inhibitora se veže na mjesto koje je rezervisano za prsten gvanozina (cGMP-a).

4.3. Inhibitori protein kinaze

Protein kinaze pripadaju porodici transferfosforilirajućih enzima koji prenose fosfatnu grupu sa ATP-a na aminokiselinsku grupu proteina. Procjenjuje se da postoji preko 500 kinaza kodiranih ljudskim genomom, a kada je ova reakcija udružena sa fosfatazom (tj. reverzibilnom fosforilacijom proteina), nudi ćelijama precizan regulatorni mehanizam i na taj način kontroliše njihovu diferencijaciju, sazrijevanje, proliferaciju, apoptozu i druge ćelijske funkcije. Supstratne aminokiselinske grupe na proteinima koji su fosforilirani uveliko pripadaju aminokiselinama koje nose hidroksilne grupe, kao što su serin, treonin i tirozin.

Zbog toga se ove kinaze nazivaju ili serin / treonin kinaze ili tirozin kinaze. Budući da su ovi proteini uključeni u regulacijske funkcije ćelije, postaje očito da mutacije ili aberacije ekspresije tih proteina mogu dovesti

do poremećaja regulacije ćelijskih funkcija, što dovodi do tumora i karcinoma. Doista, istraživanje je pokazalo da od 518 kinaznih gena prisutnih u ljudskom genomu, 244 mapiraju bolesti lokusa i raka (Aurora A, Scholar EM,2005). Štaviše, usmjeravanje ovih enzima pomoću inhibitora bio bi način selektivnog ciljanja raka bez štetnih nuspojava koje se vide kod konvencionalnih lijekova protiv karcinoma kao što su alkilirajuća sredstva ili antibakterijski antibiotici. Istraživanja kinaznih inhibitora tokom zadnje decenije pružila su objašnjenje za razvoj ciljane terapije protiv raka gdje su takve kinaze koje se očituju u određenim vrstama raka specifično usmjerene na inhibiciju, što rezultira dramatičnim smanjenjem stanica raka i duže vrijeme preživljavanja za pacijenta (Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, et al, 2000).

Primjeri takvih ciljnih antitumorskih lijekova uključili su prvenstveno razvoj inhibitora tirozin kinaze (TKI), od kojih su mnogi odobreni od strane Američke agencije za hranu i lijekove, međutim, u novije vrijeme, takođe se razvijaju inhibitori serin / treonin kinaza i nalaze se u kliničkim ispitivanjima.

4.3.1. Inhibitori tirozin kinaze

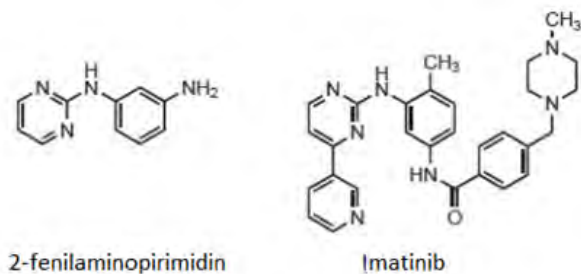
Tirozin kinaze su grupa enzima odgovornih za signalnu transdukciju i unutarćelijsku signalnu funkciju, od kojih su mnoge uključene u u ćelijsku diferencijaciju i signalizaciju. Mogu se podijeliti na dva glavna tipa u zavisnosti od toga gdje djeluju u ćeliji: receptori tirozin kinaze, membranski proteini koji imaju vanćelijsku ligand vezujuću domenu i unutarćelijsku kationsku (kinaznu) domenu uključenu u transdukciju ekstracelularnih signala iz membrane u citoplazmu ili ne-receptorske tirozin kinaze uključene u citosolne signalne procese.

Razvijeni su inhibitori obje ove kinaze i pokazali su izvrsnu i selektivnu aktivnost u karcinomima koji se manifestiraju aberantnom ekspresijom tih enzima. Razvoj TKI-a za selektivno liječenje hronične mijelogene leukemije (CML) bio je podsticaj koji je doveo do velikog broja trenutno dostupnih inhibitora tirozin kinaze. CML u većine pacijenata je rezultat recipročne translokacije hromosoma 9 i 22, što rezultira fuzijom abl (Abelson leukemija virus) gena hromosoma 9 u gen bcr (eng. *break point cluster*) hromosoma 22, što dovodi do stvaranja bcr-abl fuzijskog gena (Philadelphia hromosom). Iako abl gen normalno proizvodi ne-receptorsku tirozin-kinazu čija aktivnost je visoko regulirana, fuzijski gen bcr-abl proizvodi tirozin-kinazu koja je konstitutivno aktivna i čija je aktivnost potrebna za transformaciju ćelija da postanu maligne (Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, et al,2002).

Poznavanje ove izravne korelacije između ekspresije abnormalnog fuzijskog proteina i CML-a omogućilo je razvoj specifičnih inhibitora za ovaj enzim i druge takve disregulirane kinaze koje su prekomjerno ekspimirane u mnogim vrstama karcinoma. Korištenjem programa za prosijavanje s visokim protokom radi razvijanja inhibitora receptorskih tirozinskih kinaza kao mogućeg tretmana za takve rakove, 2-fenilaminopirimidin (PAP) postaje vodeći spoj.

Daljnja SAR optimizacija i dorada ovog spoja doveli su do imatiniba (Gleevec) (Slika 9.), prvog ciljanog lijeka za

liječenje CML (Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, et al, 2002; Spitaler M, Cantrell DA, 2004).



Slika 9. Strukture 2-fenilaminopirimidina i imatiniba

Treba imati na umu da SAR za imatinib uključuje dodavanje piridina, metila i benzamida kako bi se pojačala jačina osnovne PAP jezgre. Piperazinska funkcionalnost pomogla je povećati topivost u vodi, dajući bolje osobine. Imatinib je također pokazao inhibiciju u mnogim drugim vrstama karcinoma s prekomjerno eksprimiranim kinazama, kao što su gastrointestinalni stromalni tumori (koji prekomjerno eksprimiraju c-kit), mijelo-displastične bolesti povezane s receptorom faktora rasta iz trombocita i Philadelphia hromosome-pozitivnom adultnom limfoblastičnom leukemijom (Spitaler M, Cantrell DA, 2004).

Rendgenske kristalografske studije sa imatinibom, koji je kokristaliziran sa tirozin kinazom eksprimiranom zbog abl, pokazale su da se imatinib veže na ATP vezno mjesto enzima u njegovoj neaktivnoj konformaciji, a ovo vezivanje spriječilo je da kinaza postigne produktivnu veznu konformaciju sa ATP-om (Vader G, Lens SMA, 2008; Katayama H, Sen S, 2010)

Ove kinaze imaju "aktivacijsku petlju", koja sadrži tirozinsku fenolnu skupinu (Tyr 393), glavnu fosforiliranu skupinu koja omogućava prebacivanje kinaze iz neaktivnih u aktivne oblike i omogućuje vezanje ATP-a. Istraživanja su pokazala da kod enzima vezanog imatiniba, fenolna skupina Tyr 393 nije fosforilirana i konformacija ove aktivacijske petlje u nefosforiliranom enzimu promijenjena je u onaj sličan supstrat (ATP) vezan za kinazu. Na taj način, izmijenjena geometrija uzrokovana vezanjem imatiniba na aktivno mjesto enzima spriječila je enzim da se veže za svoj pravi supstrat, ATP. Otpornost na imatinib se razvija zbog mutacija u hidrofobnom džepu koji sprečava pristup imatiniba enzimu u isključenom stanju, čime se omogućava kinazi da veže ATP i na taj način dovodi do progresije raka. TKI su također razvijeni kako bi vezali kinazu u svom aktivnom stanju, gdje lijekovi mogu pristupiti hidrofobnim područjima u ATP vezujućem džepu i vezati enzim u svojoj aktivnoj i neaktivnoj konformaciji (inhibitori dvostrukog načina rada koji su snažniji od imatiniba).

Od uvođenja imatiniba, razvijeni su mnogi drugi TKI lijekovi vezani za tirozinske kinaze kao što su receptori epidermalnog faktora rasta, receptori faktora rasta dobivenih iz trombocita i receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta. Svi ovi inhibitori koriste heterocikličnu funkcionalnost (podsjećajući na adenin iz ATP-a) i vežu se na navodno vezujućem mjestu ATP-a (visoko konzervirana nukleotidna vezna regija u katalitičkoj domeni kinaze).

Inhibitori koriste razliku u varijabilnoj regiji enzima koji okružuje ATP vezni džep, što omogućuje specifično vezivanje s različitim skupinama prisutnim na pojedinačnim inhibitorima. Otpornost na ove inhibitore manifestuje se zbog mutacija u varijabilnim regijama enzima kao i zbog aktiviranih pumpi za ćelijski efluks. Primjeri nekih od ovih inhibitora su dasatinib (kod otpornosti imatinibu), sunitinib (inhibitor vaskularnog endotelnog faktora rasta) i gefitinib (inhibitor receptora epidermalnog faktora rasta).

Serin treonin kinaze su porodica enzima koji fosforiliraju hidroksilnu grupu serina i treonina prisutnu u enzimima. Najviše istražena od svih jeste protein kinaza C, intracelularna kinaza koja se aktivira pomoću Ca^{2+} jona ili diacilglicerola, što dovodi do različitih signalnih procesa u ćeliji kroz aktivaciju mitogen-aktivirajuće porodice protein kinaze (Silman I, Sussman JL, 2005). Primjeri drugih serin/treonin kinaza uključuju metu rapamicin kod sisara (mTOR), protein uključen u aktivaciju imunih B i T ćelija, i Aurora kinaze, koje su uključene u regulaciju ćelijskog ciklusa tokom mitoze. Inhibitori mTOR uključuju rapamicin (sirolimus), makrolid izoliran iz mikroba na Uskršnjim ostrvima i koristi se kao imunosupresivni lijek. Inhibitori Aurora kinaze obuhvataju inhibitore Aurora A i Aurora B kinaze, i obje su značajno eksprimirane u ćelijama raka pri čemu dovode do poremećaja regulacije mitoze i hromozomalne destabilizacije (Inestrosa NC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J, 1996)

5. ZAKLJUČAK

Obzirom da je enzimski sistem svih organizama izuzetno složen, enzimska inhibicija ostaje ogromna platforma za razvoj novih lijekova koji mogu biti od izuzetne terapijske koristi. U procesu dizajniranja lijekova, dizajniranje potentnog inhibitora enzima predstavlja prvi korak u dugom procesu razvoja lijeka. Prije nego inhibitor uopšte uđe u kliničke studije kao kandidat za novi lijek moraju biti zadovoljeni brojni faktori, uključujući farmakokinetički profil inhibitora, toksičnost, nuspojave i studije na životinjama i pretkliničke studije.

Dizajniranje lijekova inhibicijom enzima je oblast koje se neprestano razvija. Uvijek će biti potrebno otkrivati selektivnije i moćnije inhibitore u nastojanju da se poveća terapijska korist. Ovaj rad je pokušao dati kratak uvid u ovo fascinantno područje medicinske hemije i različitih vrsta inhibitora enzima koji mogu biti racionalno dizajnirani.

Poznavanje mehanizama i interakcija, kovalentnih i nekovalentnih, koji dopuštaju enzimima da vrše tako efikasnu katalizu, omogućava uvid u dizajniranje molekula koje mogu postići selektivnu inhibiciju enzima. Takva saznanja otvaraju put dizajniranju i otkrivanju novih lijekova. Dizajniranje enzimskih inhibitora uključuje slučajni skrining sintetičkih hemijskih agenasa, prirodnih produkata i kombinatorne biblioteke praćene molekularnom optimizacijom ili SARs takozvane „vođeće“ strukture kao i biosteričkih analoga supstrata tog enzima.

Pristup virtualnog skrininga, u kombinaciji sa modeliranjem farmakofora, molekularnim povezivanjem i konsenzusom, može se koristiti za prepoznavanje i dizajniranje novih inhibitora sa većom selektivnošću.

Potencijalni spojevi iz ove studije mogu se dodatno procijeniti in vitro i in vivo biološkim testovima.

Kombinirajući najbolji model farmakofora, povezivanja i predviđanja aktivnosti funkcijom bodovanja, uspješno se može provoditi virtuelni skrining skupa podataka o spojevima kako bi se identificirali potencijalni inhibitori i ispitale važne interakcije odgovorne za vezanje na enzime.

6. LITERATURA

1. Albert A. *Selective Toxicity—The Physicochemical Basis of Therapy*, 7th Ed. New York: Chapman & Hall, 1985.
2. Domagk G. Ein Beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *Dtsch Med Wochenschr* 1935;61:250-253.
3. Woods DD. Relation of /»-aminobenzoic acid to mechanism of action of sulfa-nilamide. *BrJ Exp Pathol* 1940;21:74-90.
4. Albert A Chapter 9. In: *Selective Toxicity—The Physicochemical Basis of Therapy*, 7th Ed. New York: Chapman & Hall, 1985.
5. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme nomenclature. Available at: <http://wvkw.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Accessed April 4, 2006.
6. Pauling L. The nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature* 1948;161:707-709.
7. Garcia-Viloca M, Gao J, Karplus M, et al. How enzymes work: analysis by modification and computer simulations. *Science* 2004;303:186-195.
8. Zhang X, Houk KN. Why enzymes are proficient catalysts: beyond the Pauling paradigm. *Acc Chem Res* 2005;38:379-385.
9. Walpole CSJ, Wrigglesworth R. Enzyme inhibitors in medicine. *Nat Prod Rep* 1989;63:311-346.
10. Baker BR. *Design of Active Site Directed Irreversible Enzyme Inhibitors*. New York: Wiley, 1967.
11. Kraft GA, Katzenellenbogen JA. Synthesis of halo enol lactones. Mechanism-based inactivators of serine proteases. *J Am Chem Soc* 1981;103:5459-5466.
12. Charnas RL, Knowles JR. Inactivation of RTEM-lactamase from *Escherichia coli* by clavulanic acid and 9-deoxyclavulanic acid. *Biochemistry* 1981;20:3214-3219.
13. Bull HG, Garcia-Calvo M, Andersson S, et al. Mechanism-based inhibition of human steroid 5 α -reductase by finasteride: enzyme-catalyzed formation of NADP-dihydrofinasteride, a potent bisubstrate analog inhibitor. *J Am Chem Soc* 1996;118:2359-2365.
14. Bender AT, BeavoJA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006;58:488-520.
15. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 2006;109:366-398.
16. Terrett NK, Bell AS, Brown P. et al. Sildenafil (Viagra), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. *Bioorg Med Chem Lett* 1996;6:1819-1824.
17. Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. The protein complement of the human genome. *Science* 2002;298:1912-1934.
18. Noble MEM, Endicott JA, Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 2004;303:1800-1805.
19. Sawyers C. Chronic myeloid leukemia. *N Eng J Med* 1999;340:1330-1340.
20. Aurora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:971-979.
21. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, et al. Structural mechanism for STI- 571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. *Science* 2000;289:1938-1942.
22. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, et al. Crystal structures of the kinases domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Can Res* 2002;62:4236-4243.
23. Spitaler M, Cantrell DA. Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* 2004;5:785-790.
24. Vader G, Lens SMA. The Aurora family in cell division and cancer. *Biochem Biophys Acta* 2008;1786:60-72
25. Katayama H, Sen S. Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochem Biophys Acta* 2010;1799:829-839.
26. Silman I, Sussman JL: Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2005, 5:293-302.
27. Inestrosa NC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J: Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-p-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 1996, 16:881-891

DRUG DISCOVERY IN OXYDO-REDUCTING AND COVALENT PROCESSES OF ENZYME INHIBITION

Zerina Krličević¹, Miralem Smajić¹, Amra Džambić¹

¹ Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Univerzitetska br. 8, 75000 Tuzla

Tel: +387 35 320 990

e-mail: krlicevic.zerina@hotmail.com

SUMMARY

Enzymes represent catalytic proteins that act on a variety of processes in the body. Based on the enzymes properties and mechanism of action, the essential meanings of design and drug discovery by enzymatic inhibition are based. Enzyme inhibitors can act in many ways, and both reversible and irreversible enzyme inhibition can occur in the body. For reversible inhibition, the enzyme activity is completely reversed to the original state when the inhibitor is removed, while the irreversible enzyme inhibition remains inactive even after removal of the inhibitor. This work provides an overview of basic enzyme activity, mechanisms for reversible and irreversible inhibition, and how these mechanisms were used to detect drugs.

Reversible inhibition can be competitive and uncompetitive, and in some situations a competitive and mixed. All of these types, except for a competitive type, can often be irreversible. The competitive inhibitor is similar to the substrate and binds to the active site of the enzyme so that the substrate can not bind to the same active site. In the case of non-competitive inhibition, the substrate and the inhibitor are linked simultaneously to different sites on the enzyme and thereby form a non-decomposing E-S-I complex, thereby reducing the rate of reaction or inhibition due to a decrease in the amount of the enzyme. The most important difference between competitive and noncompetitive inhibition is that competitive inhibition can be overcome with sufficiently high substrate concentration, while non-competitive inhibition can not be eliminated in this way.

The whole concept of enzymatic inhibition served as a platform for drug-based detection based on enzyme inhibition, some of which are random discoveries that have been shown to work on the basis of this mechanism, and many of them are formed on the basis of knowledge of the enzyme inhibition and gave very potent medical agents or leading agents that have been used for the development of new medical agents.

Key words: enzym, inhibition, drug discovery.

Zerina Krličević

Tel: +387 35 320 990

e-mail: krlicevic.zerina@hotmail.com

RAZVOJ LIJEKOVA IZ PRIRODNIH IZVORA U TRETMANU BOLESTI NASTALIH KAO POSLJEDICA OKSIDATIVNOG STRESA

Mensura Hodžić¹, Miralem Smajić¹, Amra Džambić¹

¹ Farmaceutski Fakultet, Univerzitet u Tuzli, Univerzitetska br. 8, 75000 Tuzla

SAŽETAK

Početak drugog desetljeća 21. vijeka čini se pravim vremenom za ponovljene napore na otkriću novih sekundarnih metabolitnih prototipa, biološki aktivnih spojeva životinja, gljiva, mikroorganizama i biljaka zemaljskog i pomorskog porijekla. Iako su mnoge farmaceutske kuće smanjile svoje ulaganje u istraživanje prirodnih proizvoda, u korist skeniranja knjižnica sintetičkih spojeva i kombinatorne hemije, to se podudarilo s razočaravajućim brojem lijekova jedinstvenog hemijskog sastava (SCE) koji se uvode posljednjih godina. Srećom, mnoge male "biotehnoške" kompanije aktivno su preuzele izazov savremenog otkrića lijekova prirodnih proizvoda iz organizama. Činjenica je da postoji veliki broj lijekova izvedenih iz prirodnih spojeva, a koriste se za liječenje mnogih uobičajenih ljudskih bolesti (npr. raka, kardiovaskularnih bolesti, neuroloških stanja). Međutim, postoji obilje mogućnosti za puno veću upotrebu spojeva izvedenih iz prirodnih proizvoda u liječenju ili profilaksi velikog broja teških oboljenja kao što su HIV / AIDS, tuberkuloza, hepatitis C, te tropske bolesti (npr. limfna filarijaza, leishmanijaza, shistosomijaza). Potraga za takvim sredstvima trebala bi potaknuti dostupnost opsežnih biblioteka taksonomski provjerenih sirovina ekstrakta zemaljskog i morskog porijekla, kao i čistih sekundarnih metabolita iz mikroorganizama, biljaka i životinja. Osim toga, to će biti olakšano nedavno razvijenim tehnikama kao što su biokataliza, kombinatorna biosinteza, kombinatorna i računalna hemija, metabolički inženjering i kultura tkiva.

Ne treba misliti da se nakon približno 200 godina istraživanja, izgledi novih lijekova prirodnog porijekla približavaju iscrpljenosti; još uvijek postoji velik opseg uspjeha u ovakvoj vrsti nastojanja, što je prikazano ovom radu.

Ključne riječi: razvoj lijekova, prirodni lijekovi, antineoplastici.

Autor za korespondenciju: Mensura Hodžić

Tel: +387 603038835

e-mail: mensura-hodzic@outlook.com

1. UVOD

Prije oko 500 godina podaci o ljekovitim biljkama su počeli da se dokumentuju u herbarijima. S druge strane, laboratorijska istraživanja lijekova iz prirodnih izvora počela su prije oko 200 godina, sa prečišćavanjem morfina iz opijuma. Ovo odgovara početku organske hemije kao naučne discipline. Dodatni lijekovi izolovani iz biljnih izvora uključuju atropin, kofein, kokain, nikotin, kinin i strihnin u 19. vijeku, a zatim digoksin, reserpin, paklitaksel, vinkristin i hemijski prekursori steroidnih hormona u 20. vijeku.

Čak i kad uđemo u deceniju 21. vijeka, oko 3/4 svjetske populacije oslanjat će se na primarnu zdravstvenu zaštitu iz sistema tradicionalne medicine, uključujući i upotrebu ljekovitih biljaka. U proteklih nekoliko godina pojavila su se dublja istraživanja hemijskih i bioloških aspekata biljaka koje se koriste u tradicionalnoj medicini zemalja kao što su, narodna republika Kina, Indija, Indonezija i Japan, pored ljekovitih biljaka koje su korištene u Latinskoj Americi i Africi. Zbog toga su napravljena brojna druga istraživanja koja se tiču otkrivanja sastava samog prirodnog proizvoda (Heinrich M,2004; Ewan WC,2009; Dewick PM,2009; Samuelsson G,2009).

Do sredine 20. vijeka, terapijski alkaloidi su prečišćeni i derivatizovani iz ergot gljiva, kao uterotnički i simpatolitički agensi. Zatim su izolovani penicilini zajedno sa drugim efikasnim i snažnim antibakterijskim supstancama iz kopnenih mikroba, a kasnije su ti antibiotici pokazali svoj učinak kod liječenja zaraznih bolesti. Otkriveni su kopneni mikroorganizmi koji su omogućili proizvodnju velikog broja jedinjenja koji se trenutno koriste kao lijekovi za širok opseg ljudskih bolesti, a oni uključuju antifungalne agense, agense za smanjenje holesterola „statini“, imunosupresivna sredstva i nekoliko antikancerogenih agenasa (Demain AL, 20019; Pearce C, 2010). Trenutno i dalje postoji veliko interesovanje za otkrivanje i razvoj lijekova iz morskih biljaka i životinja. U poređenju sa sintetskim jedinjenjima, prirodni proizvodi imaju tendenciju da imaju više protoniranih amina i slobodnih hidroksi funkcionalnih grupa te više pojedinačnih veza i veći broj kondenzovanih prstenova koji imaju više hiralnih centara. Prirodni proizvodi se također razlikuju od sintetskih proizvoda u pogledu steričke složenosti, kao i broju atoma halogena, azota, kiseonika i sumpora. Smatra se da prirodni proizvodi i sintetska jedinjenja pripadaju različitim hemijskim oblastima, te prema tome svaki od njih ima tendenciju da doprinese ukupnoj hemijskoj raznovrsnosti koja je potrebna u programu otkrivanja novih lijekova (Feher M, 2003).

2. PRIRODNI PROIZVODI I OTKRIVANJE LIJEKOVA

2.1. Priprema početnih ekstrakata i preliminarni biološki skrining

Različite laboratorije imaju tendenciju da koriste različite procedure ekstrakcije iz organizama koje istražuju. Uobičajeno je da se ekstrakcija kopnenih biljaka vrši prvo sa polarnim rastvaračima (kao što je metanol ili etanol), zatim se vrši uklanjanje lipida nekim nepolarnim rastvaračem (poput heksana ili petroletera), a potom se ostatak podijeli između semipolarnog organskog rastvarača (kao što je hloroform ili dihlormetan) i polarnog vodenog rastvarača (Kusari S, 2009). Morski vodeni organizmi se obično ekstrahuju u svježem metanolu ili smjesi metanol:dihlormetan (Hallock YF, 2003). Posebnu pažnju prilikom ekstrakcije biljaka treba obratiti na uklanjanje jedinjenja poznatih kao „biljni tanini“ ili „biljni polifenoli“ jer ova jedinjenja mogu dovesti do precipitacije proteina i na taj način ometati aktivnost same supstance. Predloženo je nekoliko metoda za uklanjanje biljnih polifenola, kao što je prelaz preko polivinilpirolidona (PVP) i poliamida, na kojem se zadržavaju. Alternativno, djelimično uklanjanje ove supstance može se izvršiti promjenom finalnog semipolarnog organskog sloja sa vodenim rastvorom natrij hlorida NaCl (Kinghorn AD, 2009).

Treba obratiti pažnju na uobičajene zasićene i nezasićene masne kiseline, koje mogu biti prisutne u ekstraktima prirodnih proizvoda jer to može ometati ispitivanje. Masne kiseline i ostali lipidni ekstrakti koriste fazu pregradne suspenzije te na taj način ometaju ispitivanje (Balunas MJ, 2006). Otkrivanje lijekova iz prirodnih organizama je proces koji je „biološki vođen“ tj. procjena biološke

aktivnost je u samom centru procesa otkrivanja droga i sirovih ekstrakata pripremljenih iz prirodnih izvora.

Skrining sa visokim protokom (HTS) je postala široko korištena metoda za otkrivanje novih aktivnih supstanci. U ovom procesu veliki broj sirovih ekstrakata iz prirodnih organizama može se istovremeno vrednovati u ćelijskom ili nećelijskom formatu, obično koristeći više pločica mikrotitara (Prker CH, 2010). Biološkim ispitivanjima procjenjuje se stepen biološke važnosti, a odvija se tako da se u odabranu ćelijsku liniju može uključiti genetski promjenjiv organizam (Jacob MR, 2005) ili inkorporirati reporterski gen (New DC, 2003). Aktivnost ekstrakta prirodnih proizvoda i njihovih prečišćenih sastojaka može se ispitati in vitro testovima na osnovu kojih se procjenjuje npr efekat na aktivnost enzima (Nakao Y, 2007) ili vezivanje za receptor (Mora FD, 2006). Iako su u literaturi opisani brojni homogeni i separacijski testovi koji omogućavaju istraživanje prirodnih proizvoda (Walters WP, 2003), maksimalna efikasnost i brzina se postiže korištenjem HTS uz pomoć minijaturizacije.

2.2. Metode za identifikaciju, prečišćavanje i strukturnu analizu

Najčešće metode za identifikaciju i prečišćavanje jedinjenja su hromatografske tehnike koje su zasnovane na apsorpciji jedinjenja na odgovarajućem sorbensu/rastvaraču (kao što su silikagel, aluminij i druge specijalizovane čvrste faze), kao i metode koje uključuju razdjelnu hromatografiju (uključujući i kontra-strujnu hromatografiju) (Sticher O, 2008). Nedavna poboljšanja hromatografskih metoda su postignuta napredovanjem tehnologije izrade kolona, automatizacije postupka tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) kao i razvojem hromatografske tehnike koje su kompatibilne sa HTS metodologijom (Koehn FE, 2008). Rutinska strukturna analiza izolovanih jedinjenja izvodi se kombinacijom spektroskopskih procedura (posebno ¹H i ¹³C nuklearna rezonantna magnetna spektroskopije (NMR)) i masene spektroskopije (MS). Postignut je značajan napredak u razvoju kriogenog i kapilarnog NMR koji se koristi za određivanje struktura submiligramskih količina prirodnih produkata (Molinski TF, 2010).

Za razjašnjavanje strukture prirodnih proizvoda od velike koristi je automatska obrada spektroskopskih podataka (Steinbeck C, 2004). Još jedan značajan napredak je postignut korištenjem „dezinfekcije“ analitičkih tehnika za brzo utvrđivanje strukture prirodnih proizvoda bez potrebe za posebnim korakom izolacije, kao što su tečna hromatografija (LC)-NMR i LC-NMR-MS. Uključivanje online kretanja za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE) je korisno za identifikaciju molekula prirodnih proizvoda u sirovim ekstraktima, upotrebom LC-NMR, zajedno sa MS i kružnom dihiroizmom spektroskopijom. Dereplikacija je proces utvrđivanja da li je posmatrani biološki efekat ekstrakta ili uzorka posljedica poznate supstance.

Ovaj program se primjenjuje prilikom otkrivanja lijekova iz prirodnih proizvoda sa ciljem da se izbjegne reizolacija jedinjenja prethodno određene strukture. Ovaj korak je od suštinskog značaja za prioritiziranje resursa koji su dostupni u istraživačkom programu, tako da je skupa faza

razdvajanja usmjerena prema biološkom testiranju agenasa koji predstavljaju nove hemotipove (Spogoe K, 2008; Dinan L, 2005). Ovo je naročito potrebno tokom studija koje traju godinama kao npr. studije o infektivnim agensima iz aktinomiceta, bakterija, te se primjenjuje rutinski na ekstrakte iz morskih bezkičmenjaka i viših biljaka. Metode za dereplikaciju moraju biti brze, osjetljive i ponovljive, a analitičke metode koje se koriste uglavnom sadrže masenu spektrometrijsku komponentu (Dinan L, 2005). Na primjer, eluent (otpadni materijal) iz separacije HPLC-a ili ekstrakta prirodnog proizvoda može se podijeliti na dva dijela tako da glavni dio izlazi na mikrotitarsku ploču, a zatim se procjenjuje na bunarima u *in vitro* biosistema. Frakcije iz manjeg dijela eluenta kolonama odlaze do masenog spektrometra i tamo se može odrediti molekulska težina jedinjenja koja su prisutna u aktivnim frakcijama. Ove informacije se mogu unositi u odgovarajuću bazu podataka o prirodnim proizvodima, a potom se može izvršiti identifikacija aktivnih jedinjenja u bunarima.

2.3. Kompleksan razvoj

Glavni izazov u cjelokupnom procesu otkrivanja prirodnih produkata je dobiti što veće količine biološki aktivnog spoja za dodatna laboratorijska ispitivanja i potencijalni predklinički razvoj. Jedna od strategija koja se može primjenjivati na aktivni spoj od interesa jeste otkrivanje biljne vrste od koje on potiče. Da bi bili sigurni da će se sakupljeni uzorak sastojati najvećim dijelom od aktivnog spoja od interesa potrebno je izvršiti prikupljanje biljke na istom mjestu, iz istog biljnog dijela (korije, stablo, list) i u isto doba godine. Određeni uspjeh je postignut proizvodnjom metabolita biljaka u kulturi biljnog tkiva (Mi Q Pezzuto JM, 2009). Za dobijanje metabolita iz mikroorganizama može se koristiti uzgoj istih na odgovarajućoj podlozi i fermentacija. Iako se procjena sirovog ekstrakta organizma ne provodi rutinski u životinjskim modelima zbog ograničenja ispitivanog materijala, veoma je vrijedno uporediti *in vitro* testove aktivnih prirodnih proizvoda sa odgovarajućim *in vivo* metodama kako bi se dobila preliminarna indikacija dostojnosti aktivne komponente za predklinički razvoj.

Postoje biotestovi tzv. „sekundarnih diskriminatora“ koji daju procjenu da li je određeni *in vitro* aktivni spoj aktivan i u *in vivo* uslovima, pri čemu se zahtjevaju veoma male količine ispitivanog materijala. Na primjer, ispitivanje *in vivo* šupljih vlakana razvijeno je na američkom Nacionalnom Institutu za istraživanje raka za preliminarnu evaluaciju potencijalnih antikancer agenasa i koristi konfluentne ćelije tumorskog modela od interesa pohranjenje u polivinilidinij fluoridnim vlaknima koja su implantirana u golim miševima (Zhang W, 2008). Također je veoma važno da se čisti biološki aktivni spoj može mehanički vrednovati za njegove učinke na određeni biološki cilj, kao što je određena faza životnog ciklusa patogenog organizma ili ćelije raka. Nepotrebno je reći da čisti prirodni produkti (nove strukture sa *in vitro* i *in vivo* aktivnošću protiv određenog biološkog cilja, relevantnog za ljudsku bolest djelujući kroz prethodno nepoznat mehanizam djelovanja), imaju veliku vrijednost u procesu otkrivanja lijeka.

Jednom kada se dobije bioaktivni prirodni produkt u gramima, on se tretira na isti način kao i sintetski lijek i podvrgava se farmaceutskom razvoju, što dovodi do predkliničkih i kliničkih ispitivanja. To uključuje optimizaciju prirodnog produkta lijekova putem medicinske hemije, kombinovane hemije i računalne hemije, kao i formulaciju farmakokintike kao i studiju o metabolizmu lijekova. Često se prirodni proizvodi dobijaju iz organizma zajedno sa nekoliko strukturnih sličnih dijelova koji se prirodno pojavljuju, čime se provodi preliminarna studija odnosa strukture i funkcije. Ove informacije mogu se dopuniti dobijenom mikrobiološkom biotransformacijom ili proizvodnjom polusintetskih analoga, kako bi se istraživačima omogućilo prikupljanje početnih podataka o farmakološkim mjestima (molekulama) prirodnog proizvoda. Kombinatorna biosinteza je savremeni pristup sa naglaskom na proizvodnju novih prirodnih proizvoda, a oni se mogu koristiti za poticanje novih kandidata za lijekove. Ova metodologija uključuje inženjering biosintetskih genskih klastera mikroorganizmima i primjenjuje se na stvaranje polipeptida, peptida, terpenoida i drugih spojeva. Novi napredak u biohemijskim i proteinskim inženjerskim aspektima ove tehnike doveli su do veće primjenjivosti od prethodno mogućih (Wade DT, 2010).

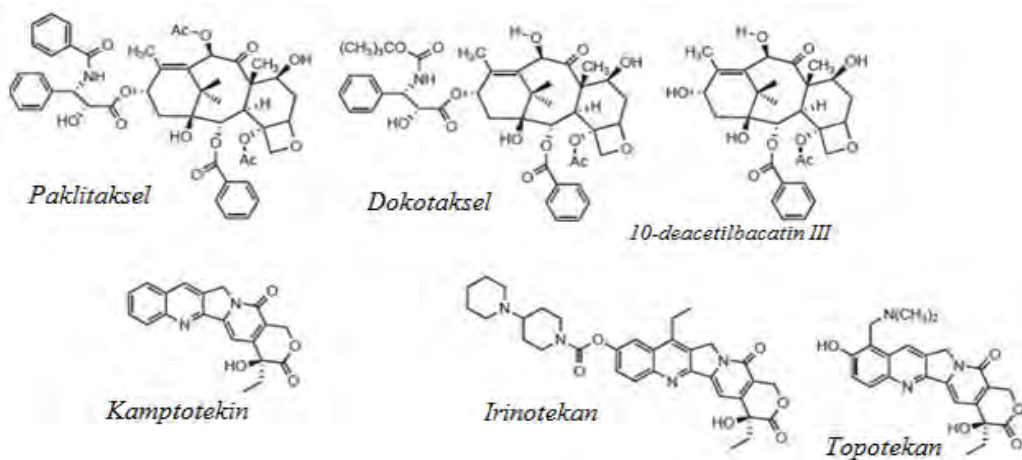
3. PRIMJERI LIJEKOVA DOBIJENIH IZ PRIRODNIH IZVORA

3.1. Antikancerogeni lijekovi

Nekoliko desetljeća, prirodni proizvodi su služili kao korisna skupina strukturno različitih hemoterapijskih sredstava, a mnogi od najvažnijih lijekova za liječenje kancera su biljnog ili mikrobiološkog porijekla. U antitumorske antibiotike spadaju antraciklini (danorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin i valrubicin), bleomicin, daktinomicin (aktinomicin D), mitomicin C i mitoksantron. Postoje četiri glavne vrste biljnih antitumorskih sredstava:

1. Vinca (*Catharanthus*) bisindol alkaloidi (vinblastin, vinkristin i vinorelbin)
2. Polusintetski derivati epipodofilotoksina (etopozid, tenipozid i etopozid fosfat)
3. Taksani (paklitaksel i docetaksel)
4. Analozii kamptotelina (irinotekan i topotekan) (slika 2.) (Oberlies NH, 2004)

Paklitaksel (izvorno nazvan taksel) i kamptotekin su otkriveni u laboratoriji u Sjevernoj Karolini. (Slika 2.) Kao i za druge lijekove prirodnog porijekla, potreban je niz godina od samog otkrivanja supstance do konačnog kliničkog odobrenja njihovog modifikovanog ili nedomodifikovanog hemijskog oblika. Jedan od tih faktora koji je uticao na odlaganje uvođenja paklitaksela na tržište je potreba za velikom nabavkom ovog jedinjenja iz kore drugih biljnih vrsta, jer izvorna biljka ovog jedinjenja, pacifička tisa (*Taxus brevifolia*) je sporo rastuće drvo i prekomjerna izlocaija ovog jedinjenja bi mogla dovesti do uništavanja same biljke. Gotovo deset godina trajalo je istraživanje složene strukture aktivne supstance koja je u toj kori prisutna u tragovima (0,001-0,004%). Zanimanje za tu molekulu poraslo je nakon razjašnjenja njezina jedinstvena, do tada nepoznata



Slika 2. Paliksatel i derivati

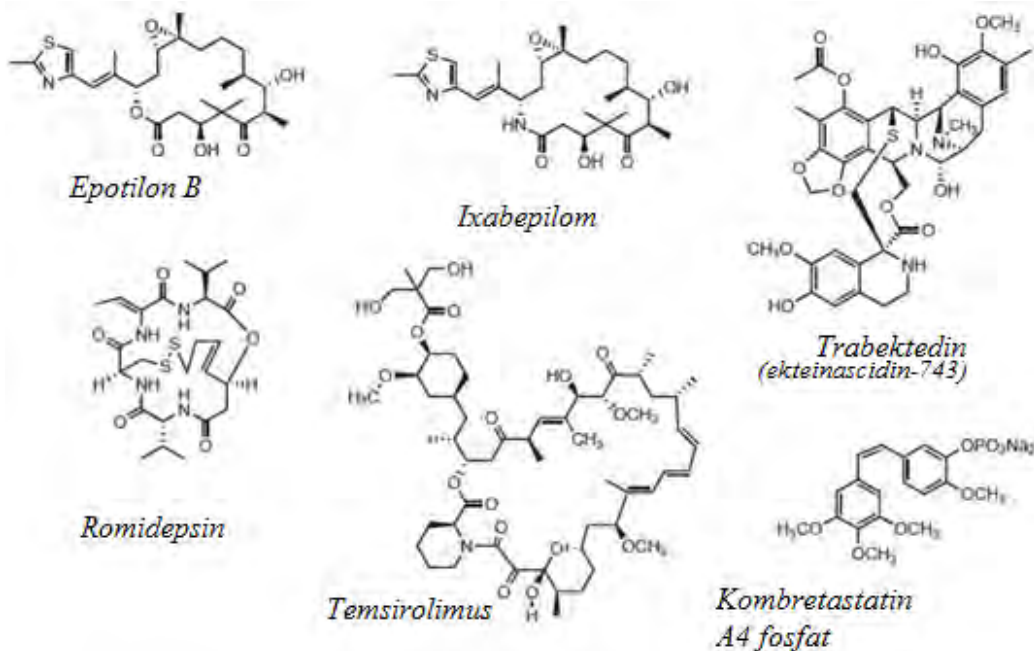
mehanizma citotoksičnog djelovanja. Tako je oživjela dramatična priča o paklitakselu koji bi mogao spasiti živote onkoloških bolesnika širom svijeta kad bi prirodni resursi bili dostupni. Procijenjeno je da bi za liječenje jednog bolesnika trebalo oguliti koru sa šest stogodišnjih stabala te da bi za izolaciju jednog kilograma paklitaksela trebalo uništiti 2000 - 3000 spororastućih stabala. U potrazi za njegovim prirodnim izvorima, nastavljena su intenzivna istraživanja srodnih biljnih vrsta te je napokon pronađen prihvatljiv način polusintetskog dobivanja paklitaksela iz spoja koji se može u dovoljnim količinama izolirati iz igličastih listova ukrasne tise (*Taxus baccata*).

Paklitaxel i njegov polusintetski analog dokotaxel, mogu se proizvesti djelimičnom sintezom. Da bi se to omogućilo, diterpenoidni „građevni blok“, 10-deacetylbaicin III se koristi kao početni materijal. Ovaj početni materijal se može izolovati iz igala ukrasne tise (*Taxus baccata*), obnovljivog botaničkog resursa koji

se može kultivisati u plastenicima (Padmanabha BV, 2006). Veće farmaceutske kompanije proizvode paklitaxel u kulturi biljnog tkiva.

Početni izvor kamptotekina, *Champtotheca accuminata* je rijetkla biljna vrsta koja se nalazi na južnim dijelovima regije Janga u Narodnoj Republici Kini. Danas se kamptotekin ne proizvodi komercijalno samo od kultivisanih stabala *C.accuminata* u cijeloj Kini, već i od korijena *Nothapodytes nimmoniana* (ranije poznata kao *Nothapodytes foetida* i *Mappia foetida*), koja raste u južnim dijelovima indijskog potkontineta. Interesantno je napomenuti da su ova dva antineoplastična sredstva naročito važna, ne samo zbog kliničke efikasnosti njihovih derivata, kao što su hemoterapeutske agensi za kancer, koji imaju značajan udio na tržištu (Stierle A, 1993), već su također značajna kao polazna sintetska jedinjenja.

Zanimljivo je da su endofitne gljive proizvele paklitaxel i kamptotekin, tako da će u budućnosti biti moguće



Slika 3. Potencijalna hemoterpijska sredstva za liječenje raka morskog, bakterijskog, biljnog i gljivičnog porijekla

proizvesti ove spojeve fermentacijom, a ne kultivisanjem ili nekim drugim postojećim metodama (Kusari S, 2009).

Paklitaksel i kamptotekin pokazali su jedinstven mehanizam djelovanja inhibicijom rasta ćelija raka, pri čemu je paklitaksel antimikrotubularni lijek koji potiče spajanje mikrotubula iz dimera tubulina i stabilizira mikrotubule sprječavanjem depolimerizacije, dok kamptotekin inhibira enzim DNK topoizomerazu I (Cragg GM, 2009). I ako je trebalo proći 30 godina od prvih istraživanja do uvođenja paklitaksela na tržište, on je danas jedan od najprodavanijih antitumorskih lijekova u svijetu. Paklitaksel se koristi u liječenju karcinoma jajnika, pluća i dojke te Kaposijeva sarkoma. Nekoliko drugih molekula proronog porijekla ili njihovi derivati su nedavno uvedeni u terapiju (Slika 3.) (Bailly C, 2009).

Ixabepilon, polusintetski derivat epotilona, sad se prodaje u Sjedinjenim državama za liječenje lokalnog i metastaziranog karcinoma dojke (Borzelli RM, 2009; Altmann K-H, 2009).

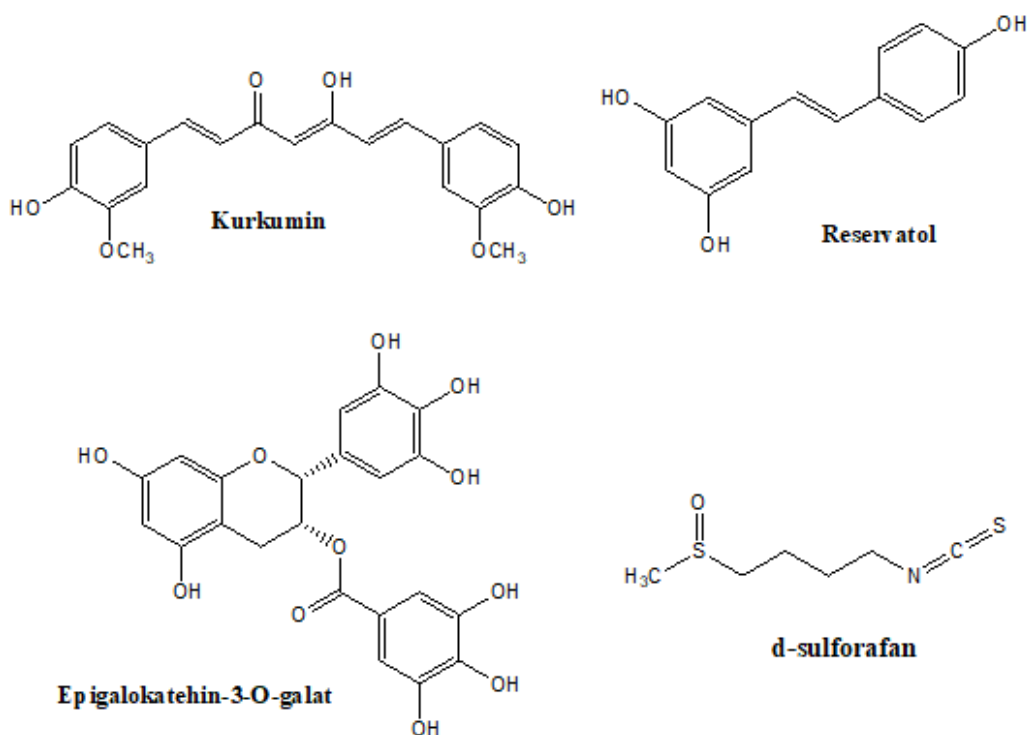
Epotiloni su izvedeni iz mikobakterija *Sorangium cellulosum* i imaju slično djelovanje na tubule kao i paklitaksel.

Trabektedin (ekteinascidin-743 ili ET-743) je izohinoliniski alkaloid dobijen iz morskog plastaša (*Ecteinascidia turbinata*), ali danas se proizvodi

Romidepsin je depsipeptid izolovan iz bakterije tla (*Chromobacterium violaceum*), 1994 godine (Ueda H, 1994). Ovaj spoj je inhibitor histon deacetilaze i odobren je u Sjedinjenim Američkim Državama za liječenje limfoma T-ćelija (Grant C, 2010).

Temsirolimus je polusintetski esterski derivat sirolimusa (rapamicin), pri čemu je sirolimus izoliran iz *Streptococcus hygroscopicus* (Rini B, 2007; Vezina C, 1975). Nedavno je temsirolimus odobren u SAD-u za liječenje naprednog karcinoma bubrežnih ćelija. Mehanizam njegovog djelovanja jeste inhibicija ćelijske proliferacije (Grant C, 2010; Rini B, 2007). Još jedno obećavajuće antikancerogeno sredstvo koje se nalazi u naprednim kliničkim ispitivanjima je kombretastatin A4 fosfat, rastvorljiv u vodi, prolijek iz Južno Afričke biljke *Combretum caffrum*. On se veže na tubulin i ometan protok krvi u tumoru (Pinney KC, 2005).

Hemoterapija raka podrazumjeva upotrebu sintetskih ili prirodnih sredstava sa ciljem inhibicije, odgađanja ili preokretanja procesa karcinogeneze prije pojave invazivne bolesti. Ovaj relativno novi pristup omogućava bolji uvid u mehanizam djelovanja hemoterapijskih sredstava (Siemann DW, 2009). Među prirodnim proizvodima koji su proučavani u tu svrhu došlo je do ponovne zainteresovanosti za učinke fitohemijskih komponenti iz hrane, a neki od tih spojeva djeluju kao blokirajuća



Slika 4. Prirodni hemoterapijski agensi

djelimičnom sintezom iz mikrobnog metabolita, cijanosafracina B porijeklom iz *Pseudomonas fluorescens*. Trabektedin je i alkilirajući agens koji se veže na manji žlijeb DNK i blokira ćelije u G2-M fazi. Koristi se u Evropi za drugu liniju liječenja sarkoma mekih tkiva, nakon neuspjeha ili nepodnošljivosti terapijom antraciklina, te za liječenje cisplatina senzitivnog raka jajnika (Henriquez R, 2005; D'Incalci M, 2010).

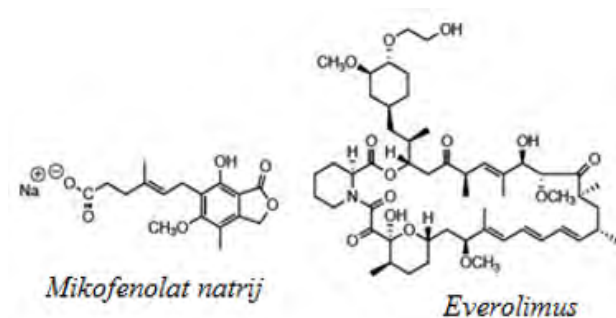
sredstva ili preokreću promociju tumora i vrše progresiju (suzbijanje) (Kelloff GJ, 2004). Nedavno je pronađeno oko 35 spojeva iz hrane biljnog porijekla koji se mogu koristiti za stavljanje hemoterapijskih sredstava kao što su; kurkumin iz kurkume, epikatehinin 3-O-galati iz zelenog čaja, trans-resveratol iz grožđa i nekih vrsta crvenog vina, d-sulforafan iz brokulija (Slika 4.) (Surh Y-J, 2003).

4. IMUNOMODULATORI

Imunomodulator je supstanca (npr. lijek) koji ima efekat na imuni sistem. Postoje dva tipa efekata: imunostimulacija i imunosupresija.

- Imunosupresanti prvenstveno imaju potiskujući efekat.
- Imunostimulanti prvenstveno imaju stimulirajući efekat

Prije nekoliko godina otkriven je ciklosporin (ciklosporin A), ciklični peptid iz gljiva, koji ima snažno imunosupresivno djelovanje prilikom transplantacije organa i tkiva. Još jedan spoj sa istim mehanizmom djelovanja (inhibicija aktivacije T-ćelija) i istom upotrebom je makrolidni takrolimus (FK-506) izolovan iz *Streptomyces tsukubaensis*. Dobijeni su dodatni prirodni imunosupresivni lijekovi, a klinički su dostupni kao mikofenolat natrij i everolimus (Slika 5.). Aktivni princip i mikofenolat natrija i ranije uvedenog oblika mikofenolat mofetila (morfolinoetilni derivat) je mikofenolska kiselina, dobijena iz nekoliko *Penicillium* vrsta. Ovaj spoj je reverzibilni inhibitor inozin monofosfat dehidrogenaze, koja je uključena u sintezu gvanozina (Mehta RG, 2010).



Slika 5. Prirodni imunosupresivi

Everolimus je oralni polusintetski derivat 40-O-(2-hidroksietil) rapamicina (također poznat kao sirolimus) koji je dobijen iz *Streptomyces hygroscopicus*. Everolimus djeluje drugačije od mikofenolat mofetila. On je inhibitor proliferacije koji blokira transdukciju signala posredovanu faktorom rasta i sprječava odbacivanje organa (Curran MP, 2005).

5. ZAKLJUČAK

Historija upotrebe biljaka u liječenju usko je povezana sa historijom i razvojem ljudskog društva. Čovjek je vrlo rano prepoznao ljekovitu moć biljaka i na njihovoj primjeni temeljio tradicionalne načine liječenja, te je tako liječenje supstancama prirodnog porijekla prisutno od davnina, međutim tome se nije pridavao veliki značaj. Prvi lijek prirodnog porijekla bio je morfin i od tada je počelo značajnije istraživanje prirodnih supstanci. Priroda nam nudi veliki izbor supstanci koje imaju potencijalno ljekovito dejstvo. Supstance prirodnog porijekla pokazuju znatnu razliku u odnosu na sintetske lijekove u pogledu rastvorljivosti, bioraspoloživosti, te drugih farmakokintičkih karakteristika. Današnja tehnologija

je omogućila usavršavanje istraživanja supstanci sa potencijalnim ljekovitim dejstvom, pri čemu je olakšana njihova izolacija, prečišćavanje, te formulacija.

Pored svih opisanih najpoznatijih lijekova bez kojih je nezamislivo liječenje pojedinih bolesti i na kojima možemo isključivo zahvaliti biljkama, o značajnoj ulozi prirodnih tvari u istraživanju i razvoju novih lijekova možda najviše govori podatak da je polovina lijekova koji su odobreni u posljednjih trideset godina prirodnog porijekla ili se sintetiziraju po uzoru na prirodni spoj. Jednako kao i tokom historije, naučnici će i u budućnosti zasigurno nastaviti tražiti nove lijekove u prirodi, riznici mnogih još neotkrivenih molekula koje će i dalje mijenjati svijet.

Prirodni lijekovi skriveno su bogatstvo. Mnogi moderni lijekovi utemeljeni su na sastojcima iz prirode. Ne treba posebno napominjati da su prirodni lijekovi zdraviji za organizam i ne štete mu u tolikoj mjeri kao hemijski proizvedeni lijekovi, te zbog toga imaju prednost prilikom liječenja u odnosu na sintetske lijekove.

6. LITERATURA

1. Altmann K-H, Hofle G, Muller R, et al. The epothilones: an outstanding family of anti-tumor agents. In: Kinghorn AD, Falk H, Kobayashi J, eds. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 90. Vienna, Austria: Springer-Verlag, 2009:1-260.
2. Arlt VM, Stiborova M, Schmieser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies a review. *Mutagenesis* 2002;17:265-277.
3. Bailly C. Commentary. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem Pharmacol* 2009;77:1447-1457.
4. Balunas MJ, Su B, Landini S, et al. Interference by naturally occurring fatty acids in a nine-cellular enzyme based aromates bioassay. *J Nat Prod* 2006;69:700-703.
5. Borzelli RM, Vite GD. Case history; discovery of ixabepilone (IXEMPRATM), a first-in-class epothilone analog for treatment of metastatic breast cancer. In: Macor JE, ed. Annual Reports in Medicinal Chemistry. Vol. 44 San Diego, CA: Academic Press/Elsevier, 2009:301-322.
6. Cardellina JH. Challenges and opportunities confronting the botanical dietary supplement industry. *J Nat Prod* 2002;65:1073-1081.
7. Chapman TM, Perry CM. Everolimus. *Drugs* 2004;64:861-872.
8. Chen ST, Dou J, Temple R, et al. New therapies from old medicines. *Nat Biotechnol* 2008;26:1077-1083.
9. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 2009;109:3012-3043.
10. Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ, eds. Anticancer Agents from Natural Products. Boca Raton, FL: Taylor & Francis/CRC Press, 2005.
11. Curran MP, Keating GM. Mycophenolate delayed release: prevention of renal transplant rejection. *Drugs* 2005;65:799-805.
12. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot* 2009;62:5-16.

13. Dewick PM, Medicinal Natural Product, A Biosynthetic Approach, 3rd Ed. New York: John Wiley & Sons, 2009.
14. Dinan L. Dereplication and partial identification of compounds. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI, eds. Methods in Biotechnology, Vol. 20: Natural Products Isolation, 2nd Ed. Totowa, NJ: Human Press Inc., 2005:297-321.
15. D'Incalci M, Galmarini CM. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. Mol Cancer Ther 2010;9:2157-2163.
16. Ewan WC, Trease and Evans Pharmacognosy, 16th Ed. New York: Saunders-Elsevier, 2009.
17. Feher M, Schmidt JM. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. J Chem Inf Comput 2003;43:218-227
18. Grant C, Rahman F, Piekarz R, et al. Romidepsin: a new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors. Expert Rev Anticancer Ther 2010;10:997-1008.
19. Hallock YF, Cragg GM. National Cooperative Drug Discovery Groups (NCDDGs): a successful model for public private partnerships in cancer drug discovery. Pharm Biol 2003;41(Suppl):78-91.
20. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, et al. Fundamentals or Pharmacognosy and Phytotherapy. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, 2004.
21. Henriquez R, Faircloth G, Cuervas C. Ecteinascidin 743 (ET-743; YondelisTM), aplidin, and kahalalide F. In: Cragg GM, Kingstone DGI, Newman DJ, eds. Anticancer Agents from Natural Products. Boca Raton, FL: Taylor & Francis/CRS Press, 2005:215-240.
22. Jacob MR, Walker LA. Natural products and antifungal drug discovery. In: Ernst EJ, Rogers P, eds. Methods in Molecular Medicine, Vol. 118, Antifungal Agents: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2005:83-109.
23. Kelloff GJ, Hawk ET, Sigman CC, eds. Cancer Chemoprevention. Vol. 1, Promising Cancer Chemopreventive Agents Totowa, NJ: Humana Press, 2004.
24. Kinghorn AD, Carcache-Blanco EJ, Chai H-B, et al. Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. Pure Appl Chem 2009;81:1051-1063.
25. Koehn FE. High impact technologies for natural products screening. In: Petersen F, Amstutz R, eds. Progress in Drug Research, Vol. 65; Natural Compounds as Drugs, Vol. 1. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 2008:175-210.
26. Kolewe MF, Gaurav V, Roberts SC. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. Mol Pharmaceutics 2008;5:243-256.
27. Kusari S, Zuhlke S, Spieteller M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. J Nat Prod 2009;72:2-7.
28. Madabushi R, Frank B, Drewelow B, et al. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. Eur J Clin Pharmacol 2006;62:225-233.
29. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, et al. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? Pharm Res 2010;27:950-961.
30. Mi Q, Pezzuto JM, Farnsworth NR, et al. Use of the in vivo hollow fiber assay in natural products anticancer drug discovery. J Nat Prod 2009;72:573-580.
31. Molinski TF. NMR of natural products as the nanomolar scale. Nat Prod Rep 2010;27:321-329.
32. Mora FD, Jones DK, Desai PV, et al. Bioassay for the identification of natural product-based activators of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ): the marine sponge metabolite psammaphin A activates PPAR γ and induces apoptosis in human breast cancer cells. J Nat Prod 2006;69:547-522.
33. Nahrstedt A, Butterweck V. Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's wort. J Nat Prod 2010;73:1015-1021.
34. Nakao Y, Fusetani N. Enzyme inhibitors from marine invertebrates. J Nat Prod 2007;70:689-710.
35. New DC, Miller-Martini DM, Wong YH. Reporter gene assays and their applications to bioassay of natural products. Phytother res 2003;17:439-448.
36. Oberlies NH, Kroll DJ. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. J Nat Prod 2004;67:129-135.
37. Padmanabha BV, Chandrashekar M, Ramesha BT, et al. Patterns of accumulation of captothecin, an anti-cancer alkaloid, in *Nothapodytes nimmoniana* Graham, in the Western Ghats, India: implications for identifying high-yielding sources of the alkaloid. Curr Sci 2006;90:95-100.
38. Pearce C, Eckard P, Gruen-Wollny I, et al. Microorganisms: their role in the discovery and development of medicines. In: Buss AD, Butler MS, eds. Natural Product Chemistry for Drug Discovery. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2010:215-241.
39. Pinney KC, Jelinek C, Edvarsden K, et al. The discovery and development of the combretastatins. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ, eds. Anticancer Agents from Natural Products. Boca Raton, FL: Taylor & Francis/CRC Press, 2005:23-46
40. Prker CH, Ott J, Gabriel D, et al. Advances in biological screening for lead discovery. In: Buss AD, Butler MS, eds. Natural Products Chemistry for Drug Discovery. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2010:245-271.
41. Rini B, Kar S, Kirkpatrick P. Fresh from the pipeline. Temsirolimus. Nat Rev Drug Discov 2007;6:599-600.
42. Robbers JC, Tyler VE. Tyler's Herbs of Choice. The Therapeutic Use of Phytomedicinals. New York: The Haworth Herbal Press, 1999.
43. SACHIFF pl Jr, Srinivasan VS, Giancaspro GI, et al. The development of USP botanical dietary supplement monographs, 1995-2005. J Nat Prod 2006;69:464-472.
44. Samuelsson G, Bohlin L. Drugs and Natural Origin. A Treatise of Pharmacognosy, 6th Rev. Ed. Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press, 2009.
45. Siemann DW, Chaplin DJ, Walicke PA. A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). Expert Opin Investig Drugs 2009;18:189-197.

46. Spogoe K, Staerk D, Zuegler HL, et al. Combinig HPLC-PDA-MS-SFE-NMR with circular dichroism for complete natural product characterization in crude extracts: levorotatory gossypol in *Thespesia danis*. J Nat Prod 2008;71:516-519.
47. Steinbeck C. Recent developments in automated structure elucidation of natural products. Nat Prod Rep 2004;21:521-518.
48. Sticher O. Natural product isolation. Nat Prod Rev 2008;25:517-544.
49. Stierle A, Strobel G, Stierle D, Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science 1993;260:214-217.
50. Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer 2003;3:768-779.
51. Ueda H, Nakajima H, Hori Y, et al. FR901228, a novel antitumor biocyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. J Antibiot 1994;47:301-310.
52. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamicin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. J Antibiot 1975;28:721-726.
53. Wade DT, Collin C, Stott C, et al. Meta-anakysis of the efficacy and safety of Sativex (nabiximols), on spasticity in people with multiple sclerosis. Mult Scler 2010;16:707-714.
54. Walters WP, Namchuk M., Designing screens: how to make your hits a hit. Nat Rev Drug Discov 2003;2:259-266.
55. Zhang W, Tang Y. Combinatorial biosynthesis of natural products. J Med Chem 2008;51:2629-2633.

**DRUG DEVELOPMENT FROM NATURAL ORIGIN IN
THE TREATMENT OF THE DISEASE
CAUSED BY OXYDATION STRESS**

Mensura Hodžić¹, Miralem Smajić¹, Amra Džambić¹

¹ Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Univerzitetska br. 8, 75000 Tuzla

SUMMARY

The beginning of the second decade of the 21st century seems timely for repeated efforts to discover new secondary metabolite prototypes, biologically active compounds of animals, fungi, microorganisms and earth and marine plants. Although many pharmaceutical companies have reduced their investment in natural product research, in favor of scanning library of synthetic compounds and combinatorial chemistry, this has coincided with the disappointing number of unique chemistry (SCE) medicines introduced in recent years. Fortunately, many small "biotechnological" companies have been actively taking on the challenge of a contemporary discovery of natural drug products from organisms. The fact is that there are a large number of drugs derived from natural compounds and are used to treat many common human diseases (eg cancer, cardiovascular diseases, neurological conditions). However, there is an abundance of possibilities for much greater use of compounds derived from natural products in the treatment or prophylaxis of a large number of serious illnesses such as HIV / AIDS, tuberculosis, hepatitis C and tropical diseases (eg lymphatic filariosis, leishmaniasis, shingosomiasis). The search for such resources should encourage the availability of extensive taxa of certified terrestrial and marine extract raw materials, as well as pure secondary metabolites from microorganisms, plants and animals. In addition, this will be facilitated by recently developed techniques such as biocatalysts, combinatorial biosynthesis, combinatorial and computer chemistry, metabolic engineering and tissue culture. It should not be thought that after about 200 years of research, the prospects of new natural medicine approaches exhaustion; there is still a great deal of success in this kind of endeavor, as shown in this paper.

Key words: drug development, natural drugs, antineoplastic drugs.

Corresponding author: Mensura Hodžić

Tel: +387 603038835

e-mail: mensura-hodzic@outlook.com





Komora magistara farmacije
Tuzlanskog kantona



Farmaceutski fakultet
Univerziteta u Tuzli



Tehnološki fakultet
Univerziteta u Tuzli



Udruženje za nutricionizam i
dijetetiku BiH