

Sinteza i ispitivanje uticaja derivata kvercetina i stearinske kiseline na oksidativni stres na modelu laboratorijskog miša (*Mus musculus*)

Sintetisan je acil-derivat kvercetina i stearinske kiseline. Urađen je DPPH test koji je pokazao da sintetisano jedinjenje pokazuje 9 puta jaču antioksidativnu aktivnost od kvercetina koji je korišćen kao polazni molekul za sintezu novog jedinjenja. Za eksperiment je korišćeno trideset muških miševa približne težine 25 grama. Miševi su podeljeni u 6 grupa, od kojih je jedna grupa predstavljala kontrolu. Sintetisano jedinjenje je rastvoreno u smeši rastvarača propilenglikola, polisorbata i vode, dok je 0.5 mL dato svakom mišu intraperitonealno. Kontrolna grupa je tretirana smešom rastvarača. Na ledu su izolovane jetre, slezine, bubrezi i mozgovi miševa. Po jedna grupa je žrtvovana prvo 6 h nakon aplikacije jedinjenja, a zatim na svakih 12 h. DPPH test i test lipidne peroksidacije su pokazali da je sintetisano jedinjenje veoma jak antioksidant, kao i da ispoljava terapeuski efekat u svim ispitivanim organima: jetri, slezini, bubrežima i mozgu. Jedinjenje je zbog svoje lipofilnosti prešlo krvno-moždanu barijeru i ispoljilo svoj najjači efekat upravo na mozgu miša, gde je snizilo oksidativni stres više od tri puta. Ni na ostalim organima njegovo dejstvo nije zanemarljivo. U jetri, slezini i bubrežima snižava oksidativni stres i do dva puta.

Uvod

U organizmu nizom hemijskih reakcija, neophodnih za njegovo funkcionisanje, nastaju slobodni radikali (Sayre *et al.* 1999; Cadens i Davies 2000; Zhou *et al.* 2003). Oni predstavljaju veoma reaktivne molekulske oblike, jer poseduju nesparen elektron u svojoj strukturi. Kiseonični radikali (HOO, HO, ROO...) mogu uzrokovati različita patološka stanja kod aerobnih organizama. U normalnim uslovima, produkcija toksičnih slobodnih radikala je u ravnoteži sa antioksidativnim sistemom odbrane organizma. Disbalans ovog ravnotežnog stanja u organizmu, tj. stanje u kome je ravnoteža između prooksidanata i antioksidanata u ćeliji pomerena na stranu prooksidanata, naziva se oksidativni stres (Sies 1985). Naime, endogena oksidativna oštećenja proteina, lipida i DNK smatraju se važnim

Karla Ilić-Đurđić
(1993), Zrenjanin,
Blagoje Parovića 21,
učenica 3. razreda
Medicinske škole u
Zrenjaninu

MENTORI:

Luka Mihajlović,
Hemijski fakultet,
Beograd

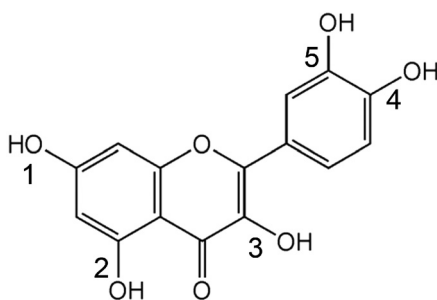
Aleksandar Đurić,
Farmaceutski fakultet
Univerziteta u
Beogradu

etiološkim faktorima u procesu starenja i nastanku hroničnih oboljenja kao što su kancer, arteroskleroza i neka neurodegenerativna oboljenja (Mordente *et al.* 1998). Patologije vezane za ova oboljenja nastaju kada produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta i drugih slobodnih radikala prevaziđu kapacitet antioksidantnih mehanizama u ćelijama i tkivima živih organizama.

Neko jedinjenje se svrstava u grupu antioksidanata ukoliko može da preda jedan svoj elektron slobodnom radikal i tako smanji njegovu reaktivnost, a sam ostane stabilan. Ova jedinjenja zbog delokalizovanih elektrona koje poseduju u svojoj strukturi izgubivši jedan elektron ne postaju reaktivni oblici.

Kvercetin (slika 1) je flavon, odnosno sekundarni biljni metabolit koji se kao i ostali flavoni karakteriše prisustvom fenolnih i piranoznih prstenova. Ovo jedinjenje se nalazi u zelenom čaju (*Camelia sinensis*), crnom vinu, zelenoj salati (*Lactuca sativa*), crnom luku (*Allium cepa*), celeru (*Apium graveolens*) i mnogim drugim biljnim vrstama.

Pokazano je da kvercetin može da vezuje teške metale i da se ponaša kao antioksidant (Cook i Samman 1996). Kao deo ljudske ishrane ima značajnu ulogu u protekciji od degenerativnih oboljenja, različitih tipova kancera i kardiovaskularnih bolesti, gde se sva lekovita svojstva ovog molekula pripisuju njegovoj antioksidativnoj aktivnosti (Hensley *et al.* 2000); Morton *et al.* 2000; Halliwell *et al.* 1992). Antioksidantna aktivnost kvercetina zavisi od rasporeda funkcionalnih grupa u molekulu. Raspored i broj hidroksilnih grupa utiče na mehanizam antioksidativnog dejstva kod različitih polifenola.



Slika 1.
Struktura kvercetina sa numerisanim hidroksilnim grupama

Figure 1.
Structure of quercetin with numerated hydroxyl groups

Sintetisan je acil-derivat kvercetina i stearinske kiseline. Kao što je ranije navedeno, kvercetin je sekundarni biljni metabolit koji u svojoj strukturi sadrži kondenzovani pirokatehinski i piranozni prsten i konjugovani katehinski prsten. Ovaj molekul sadrži pet fenolnih hidroksilnih grupa koje mogu podleći esterifikaciji, međutim kako je esterifikacija vrsta nukleofilne supstitucije, a hidroksilna grupa označena brojem jedan (slika 1) najkiselija hidroksilna grupa u strukturi kvercetina, najverovatnije je da se upravo ta OH grupa esterifikovala. Postoji mogućnost esterifikacije ostalih

OH grupa ali je ona manje verovatna zbog sternih smetnji prouzrokovanih blizinom druge hidroksilne grupe, odnosno blizinom fenonskog kiseonika, što nije slučaj sa OH grupom 1, što dodatno favorizuje esterifikaciju na tom mestu. Takođe postoji mogućnost da je dobijena smeša izomernih derivata (Musialik *et al.* 2009).

Sintetisano jedinjenje je lipofilno, a u *in vitro* ispitivanjima pokazalo se kao 7 puta jači antioskidant od polaznog molekula, kvercetina. Kako se dobijeni acil-derivat sastoji iz dugog nepolarnog acil-lanca i polarnog kvercetinog ostatka, sintetisano jedinjenje se ponaša kao površinski aktivna materija, kao i membranski lipidi, što bi trebalo da uslovi njihovo nago-milavanje u membranama, odnosno njihovo dejstvo na tom mestu, sa fa-vorizovanim sprečavanjem lipidne peroksidacije. Povećanjem lipofilnosti kvercetina omogućava se njegovo dejstvo u mozgu.

Cilj rada je ispitati uticaj acil derivata kvercetina i stearinske kiseline na oksidativni stres u mozgu, jetri, bubrežima i slezini miša (*Mus mus-culus*).

Materijal i metode

Sinteza acil-derivata kvercetina i stearinske kiseline

U balon od 25 cm³ sa okruglim dnom sipano je 0.5 cm³ (6.88 mmol) tionil-hlorida i 2.3 g (oko 9 mmol) palmitinske, odnosno stearinske, od-nosno oleinske kiseline rastvorene u 10 cm³ etil-acetata i uz refluks za-grevano do ključanja u toku 5 h. Kiseline su dodavane u višku ne bi li sav SOCl₂ izreagovao. Nakon toga rashlađenoj reakcionoj smeši dodato je 2.5 g (7.3 mmol) kvercetin-dihidrata i reakciona smeša je ponovo zagre-vana do ključanja uz refluks još 5 h. Tako dobijeni acil-derivati kvercetina su nakon hlađenja filtrirani na bihnerovom levku i isprani tri puta sa po 10 cm³ etil-acetata i osušeni na sobnoj temperaturi.

Ispitivanja rastvorljivosti jedinjenja

Ispitivana je rastvorljivost jedinjenja u vodi, hloroformu, heksanu, metanolu i petrol-etu tako što je u mikroepruvetu sipano po 100 mg sin-tetisanog jedinjenja i 1 cm³ rastvarača. Zatim su mikroeprevete stavljene na vorteks na 3 minuta.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro*

DPPH test. U erlenmajeru zapremine 250 cm³ rastvoren je 1 mg DPPH reagensa u 200 cm³ 80% metanola. U epruvete je sipano po 5 cm³ DPPH reagensa i 100 mm³ metanolnog rastvora koncentracije 50 µg/mL ispitivanog jedinjenja. Potom su epruvete sa rastvorima inkubirane 15 mi-

nuta u mraku. Kao slepa proba korišćen je rastvor DPPH u 80% metanolu. Apsorbanca je merena na 515 nanometara, a kao standard je korišćen kvecetin. Merenja su ponovljena tri puta.

Formiranje grupa miševa i aplikacija sintetisanog jedinjenja

Za eksperiment je korišćeno 30 muških miševa približne težine 25 g. Hrana i voda su davane *ab limitum*.

Kako sintetisano jedinjenje nije rastvorljivo u vodi, rastvaranje željene količine jedinjenja postignuto je dodavanjem korastvarača u sledećem odnosu: 15% propilenglikola, 5% polisorbata 80 i ostatak vode; dodato je sintetisano jedinjenje dok se nije dobio zasićen rastvor koji je centrifugiran 15 minuta na 3000 obrtaja i sterilisan u autoklavu sterilizacijom 2a po propisu IV jugoslovenske farmakopeje. Kao slepa proba korišćena je smeša rastvarača bez dodatka sintetisanog jedinjenja (Oser i Oser 1956; Chou *et al.* 2005).

Miševima je intraperitonealno ubrizgano po 0.5 mL. Miševi su podeljeni u 6 grupa od po 5 miševa od kojih je jedna predstavljala kontrolu. Prvih 5 i kontrolna grupa su žrtvovani dekapitulacijom 6 h nakon tretmana, a preostale grupe su žrtvovane na svakih 12 h. Izolacija organa je vršena na ledu, a korišćeni su mozgovi, jetre, slezine i bubrezi. Svi isti organi iz jedne grupe su spojeni i zajedno homogenizovani u avanu sa tučkom uz dodatak saharoznog medijuma (21.39 g saharoze i 0.0931 g EDTA u 0.2 M fosfatnom puferu, pH 7). Kako su jetre miševa iz jedne grupe težile približno 6 g dodato je 6 mL saharoznog medijuma, bubrežima i mozgovima po 2 mL, a slezinama 1 mL medijuma. Pošto su organi homogenizovani u avanu sa tučkom dodatno je urađeno 20 aspiracija. Homogenati su zatim sipani u mikroeprevete i centrifugirani 15 minuta na 13400 obrtaja u minuti. Supernatant je odliven, a uzorci organa su čuvani u frižideru.

Ispitivanje antioksidativnog dejstva *in vivo*

DPPH test. 3 mg DPPH reagensa rastvoreno je u 600 mL 80% metanolu. Rađeno je sa razblaženjima 1:10 Sipano je 100 μ L uzorka i 5 mL DPPH reagensa. Smeša je ostavljena da se inkubira u mraku 15 minuta. Snimano je na 515 nm. Rađena su tri ponavljanja.

Lipidna peroksidacija. U kivete je sipano 50 μ L lipozoma i 200 μ L uzorka. Rađeno je sa razblaženjima 1 : 4 (uzorak : saharozni medijum). Kao slepa proba korišćeno je 2.2 mL rastvora kalijum hlorida. Kao standard korišćena je smeša lipozoma i po 0.1 mL rastvora vitamina C i morove soli. Smeša je inkubirana 10 minuta na 37 stepeni, zatim je dodato po 1 mL TBA i TCA reagenasa. Zatim je stavljena na 10 minuta na vodeno kupatilo na 100 stepeni, potom centrifugirana 10 minuta na 3000 obrtaja. Snimano je na 540 nm.

Rezultati i diskusija

Rastvorljivost sintetisanog jedinjenja prikazana je u tabeli 1.

Rastvarač	Sintetisano jedinjenje
Voda	ne rastvara se
Hloroform	ne rastvara se
Metanol	rastvara se
Heksan	ne rastvara se
Petrol-etar	ne rastvara se

Na osnovu dobijenih rezultata, odnosno promene rastvorljivosti jedinjenja u odnosu na polazno jedinjenje, kvercetin može se zaključiti da je došlo do sinteze novog jedinjenja.

DPPH test *in vitro*. Antioksidativna aktivnost kvercetina i derivata kvercetina i stearinske kiseline prikazana je u tabeli 2.

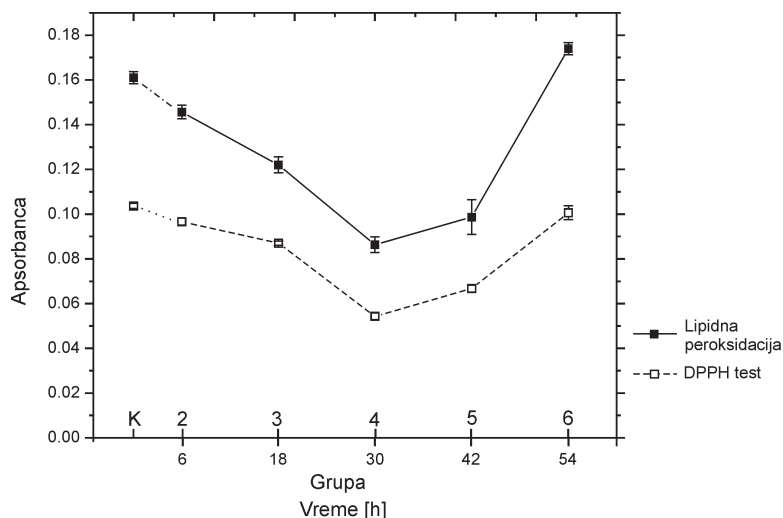
Ispitivano jedinjenje	IC ₅₀ [µg/mL]
Kvercetin	0.13
Derivat kvercetina i stearinske kiseline	0.014

Pretpostavka da će se esterifikacijom neke od hidroksilnih grupa kvercetina dodatno povećati antioksidativno dejstvo, jer kiseonikovi atomi iz karbonilne grupe poseduju elektrone koji ne moraju biti lokalizovani na samo jednom mestu potvrđena je rezultatima prikazanim u tabeli 2, jer je za inhibiciju 50% DPPH radikala derivatu kvercetina i stearinske kiseline potrebna približno 9 puta manja koncentracija nego kvercetin.

DPPH test *in vivo* i lipidna peroksidacija. Rezultati testova za jetru prikazani su na slici 2. Puna linija prikazuje rezultate testa lipidne peroksidacije, a isprekidana rezultate DPPH testa.

Na x-osi svih grafikona sa K je obeležena kontrola, brojem 2 miševi žrtvovani u isto vreme kad i kontrolna grupa, odnosno 6 časova nakon tretmana, brojevima 3-6 tretirani miševi žrtvovani na svakih 12 časova. Na y-osi mogu se očitati vrednosti apsorbancija.

U oba testa može se uočiti razlika već između kontrole i tretmana nakon 6 časova, u narednih 24 h apsorbancia, pa samim tim i oksidativni stres znatno opada, što se jasno može videti na grafičkim prikazima oba testa, da bi 30 časova nakon tretmana jedinjenje dostiglo svoj maksimalan efekat. Na toj vremenskoj tački oksidativni stres je gotovo duplo manji od oksidativnog stresa koji pokazuje kontrolna grupa, što pokazuje da je sin-

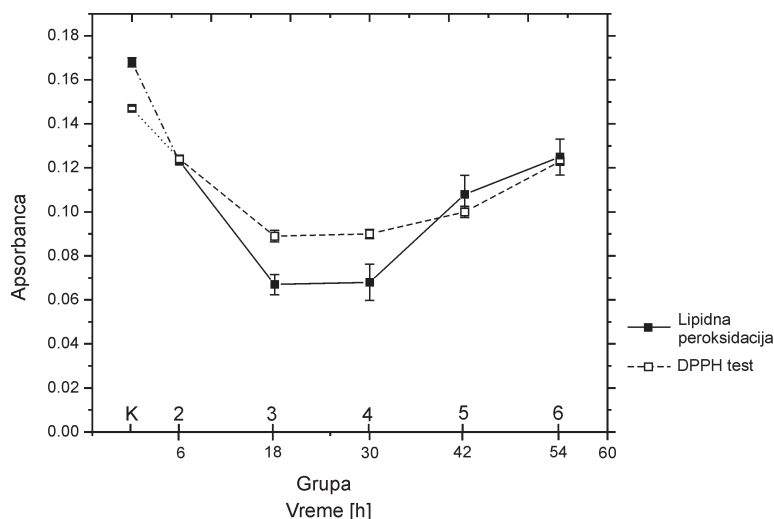


Slika 2.
Lipidna peroksidacija u jetri i DPPH test za jetru

Figure 2
Lipid peroxidation in the liver and DPPH test for the liver of mice

tetisano jedinjenje veoma jak antioksidant. U narednih 24 h oksidativni stres se povećava da bi se 54 h nakon tretmana izjednačio sa oksidativnim stresom koji pokazuje kontrolna grupa. Odatle se može zaključiti da je poluvreme eliminacije jedinjenja iz jetre miša 26 h, a da bi se nova doza trebala uzimati na 54 h, što je dug vremenski period uzimajući u obzir da se na primer prosečan antibiotik mora unositi na 6 h, odnosno 7 puta češće od sintetisanog jedinjenja. Dužina njegovog dejstva znatno bi olakšala primenu jedinjenja kao potencijalnog lekovitog sredstva.

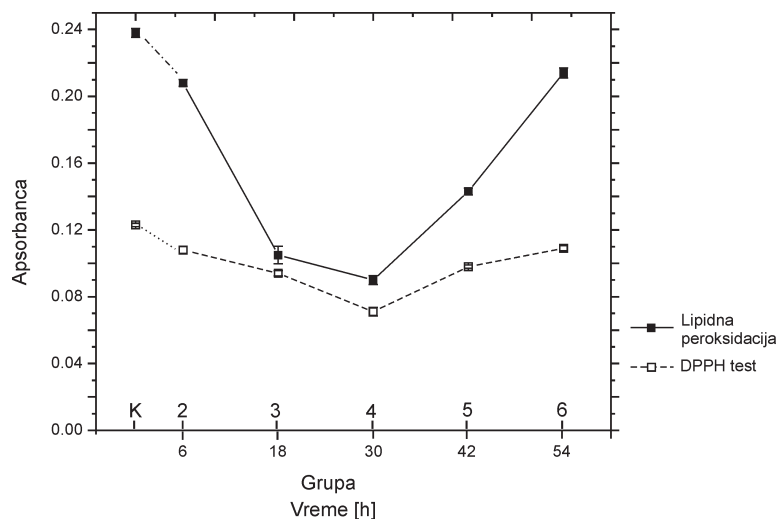
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 3 može se zaključiti da sintetisano jedinjenje pokazuje veoma jak antioskidativni efekat u bubrezima laboratorijskog miša. Već nakon 6 h od tretmana oksidativni stres je smanjen za jednu četvrtinu. Period u kom se dostiže maksimalni efekat nastupa 18 h od tretmana, i traje 12 h. Uzimajući u obzir to da većina



Slika 3.
Lipidna peroksidacija u bubrezima i DPPH test za bubrege

Figure 3
Lipid peroxidation in the kidneys and DPPH test for the kidneys of mice

lekova koja se danas upotrebljava ima maksimalni efekat u trajanju od 4 do 6 časova ili manje dužina maksimalnog efekta sintetisanog jedinjenja može se smatrati još jednom njegovom prednošću. U narednih 24 h oksidativni stres u bubrezima miša izjednačava se sa oksidativnim stresom 6 h nakon tretmana, pa se može zaključiti da dejstvo acil-derivata kvercetina i stearinske kiseline traje više od 54 h od same aplikacije jedinjenja.



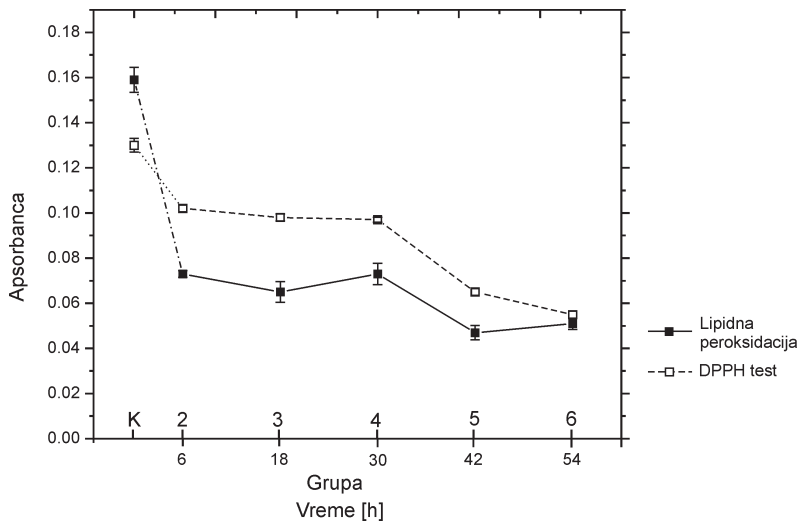
Slika 4.
Lipidna peroksidacija u slezini i DPPH test za slezinu

Figure 4
Lipid peroxidation in the spleen and DPPH test for the spleen of mice

Na osnovu grafika na slici 4 može se tvrditi da sintetisano jedinjenje pokazuje antioksidativnu aktivnost i u slezini miša. Smanjenje oksidativnog stresa vidljivo je već nakon 6 h od tretmana. Oksidativni stres nastavlja da opada do 30 h od aplikacije jedinjenja gde ono pokazuje svoj najjači terapijski efekat. U sledećih 24 h oksidativni stres raste ali si ni posle 54 h od aplikacije ne izjednačava sa kontrolnim, što ukazuje na to da je dejstvo sintetisanog jedinjenja u slezini duže od 54 h.

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 6 može se zaključiti da je pretpostavka da će acil-derivat kvercetina i stearinske kiseline zbog povećanja lipofilnosti moći da pređe krvno-moždanu barijeru, tačna.

Jedinjenje pokazuje veliku antioksidativnu aktivnost već 6 h nakon aplikacije. Prema rezultatima dobijenim u testu lipidne peroksidacije, nakon 6 h oksidativni stres u mozgu miša smanjen je za jednu polovinu, što bi bilo maksimalni efekat u drugim organima. Međutim, ovo smanjenje predstavlja samo latentni period. Maksimalni efekat biva ispoljen tek 42 sata nakon aplikacije jedinjenja prema testu lipidne peroksidacije, dok prema DPPH testu i dalje opada do 54 h. Tačna dužina dejstva ne može se sa sigurnošću utvrditi iz dobijenih rezultata, ali se na poređenjem da grafikonima dobijenim za druge organe može pretpostaviti da je dejstvo znatno duže od 54 h, koliko je ono mereno. Može se reći da jedinjenje ispoljava svoj najjači efekat upravo na mozgu miša.



Slika 5.
Lipidna peroksidacija u mozgu i DPPH test za mozak miševa

Figure 5
Lipid peroxidation in the brain and DPPH test for the brain of mice

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je sintetisan acil-derivat kvercetina i stearinske kiseline. Takođe, može se zaključiti da je ovo jedinjenje 9 puta jači antioksidant od polaznog molekula, odnosno kvercetina, i ispoljava terapeutski efekat u svim ispitivanim organima: jetri, slezini, bubrezima i mozgu. Jedinjenje je zbog svoje lipofilnosti prešlo krvno-moždanu barijeru i ispoljilo svoj najjači efekat upravo na mozgu miša, gde je snizilo oksidativni stres više od tri puta. Ni na ostalim organima njegovo dejstvo nije zanemarljivo. U jetri, slezini i bubrezima snižava oksidativni stres i do dva puta. Svi rezultati ukazuju da je sintetisano jedinjenje veoma jak antioksidant.

Zahvalnost. Želim da se zahvalim mentorima Luki Mihajloviću i Aleksanrdu Đuriću na stručnoj pomoći, Ani Parabucki sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” na pomoći pri disekciji laboratorijskih miševa, kao i Institutu „Torlak” i Miroslavu Stajiću na ustupanju miševa neophodnih za ivodenje eksperimenta.

Literatura

- Cadenas E., Davies J. A. K. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad.Biol. Med.*, **29**: 222.
- Chou D. K., Krishnamurthy R., Randolph T. W., Carpenter J. F., Manning M. C. 2005. Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of Albutropin during agitation. *J. Pharm. Sci.*, **94** (6): 1368.
- Cook N. C., Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **7**: 66.

- Halliwell B., Gutteridge J. M., Cross C.E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, **119**: 598.
- Hensley K, Robinson K. A., Gabbita S. P., Salsman S., Floyd R. A. 2000. Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**: 1456.
- Mordente A., Martorana G. E., Minotti G., Giardina B. 1998. Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone). *Chem. Res. Toxicol.*, **11**: 54.
- Morton L. W., Caccetta R. A-A., Puddey I. B., Croft K. D. 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **27**: 152.
- Musialik M., Kuzmicz R., Pawlowski T. S., Litwinienko, G. 2009. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *The Journal of Organic Chemistry*, **74** (7), 2699.
- Oser B. L., Oser M. 1956. Nutritional studies on rats of diets containing high levels of partial ester emulsifiers. II. Reproduction and lactation. *J. Nutr.*, **60** (4): 489.
- Peterson, Michael; Talcott, Patricia A. 2006. *Small animal toxicology*. St. Louis: Saunders Elsevier, str. 997.
- Sayre M. L., Perry G., Smith A. M. 1999. Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. chem. Biol.*, **3**: 220.
- Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. U *Oxidative stress* (ur. H. Sies). Academic Press, str. 346.
- Zhou J. L., Jin G. H., Yi Y. L., Zhang J. L., Huang X. L. 2003. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J. Gastroenterol.*, **9** (6): 1318.

Karla Ilić Đurđić

Synthesis and Effect of Quercetine Derivatives with Stearic Acid on the Parameters of Oxidative Stress in Mice (*Mus musculus*)

Acyl-derivative of quercetin and stearic acid was synthesized. DPPH assay showed that the synthesized compound has 9 times stronger antioxidant activity than quercetin, which was used as a starting molecule for synthesis. The effects on the oxidative status were followed during 54 h *in vivo*, in several mice organs. DPPH assay and assay for lipid peroxidation showed that the synthesized compound is a very powerful antioxidant, and that it manifests therapeutic effect on all tested organs. The compound, is due to its lipophilicity able to cross the blood-brain barrier and showed its strongest effect on the mice brain, with a 3-fold reduction of the measured parameters. The effect is significant in other organs as well. The compound warrants interest for the dietetic supplement industry, and ought to be fully investigated.

