

# Određivanje protuupalne učinkovitosti kinolinsko-arilamidinskih hibrida in vitro

---

**Periš, Antonio**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:300548>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO-**  
**LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE**

**Antonio Periš**

**ODREĐIVANJE PROTUUPALNE**  
**UČINKOVITOSTI KINOLINSKO-**  
**ARILAMIDINSKIH HIBRIDA *IN VITRO***

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO-**  
**LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE**

**Antonio Periš**

**ODREĐIVANJE PROTUUPALNE**  
**UČINKOVITOSTI KINOLINSKO-**  
**ARILAMIDINSKIH HIBRIDA *IN VITRO***

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentor: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac

Rad ima 50 listova, 10 slika i 2 tablice

*Najprije veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac za prenošenje neprocjenjiva znanja tijekom trajanja studija, prilikom izrade ovoga diplomskog rada i zalaganja za boljitak, unapređenje i konačno priznavanje struke magistara MLD-a.*

*Zahvaljujem se dr. Marijani Jukić i Ivani Jelavić za prenošenje važnoga praktičnog znanja i pomoć tijekom eksperimentalnoga dijela izrade rada u ovim čudnim pandemijskim okolnostima. Isto tako, zahvaljujem se cijeloj katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, docentici Teuti Opačak-Bernardi i Katarini Mišković-Špoljarić za nesebično prenošenje znanja i veliku profesionalnost.*

*Veliko hvala mojoj obitelji bez čije podrške nikada ne bih uspio ostati motiviran i naći snage za sve životne izazove.*

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Upala</b> .....	1
1.1.1. Akutna upala.....	1
1.1.2. Kronična upala.....	2
<b>1.2. Makrofagi</b> .....	4
1.2.1. Aktivacijska stanja makrofaga .....	5
1.2.2. Makrofagi u upalnim bolestima.....	5
<b>1.3. Oksidativni stres</b> .....	6
1.3.1. Reaktivne kisikove i dušikove vrste .....	7
1.3.2. Antioksidansi .....	8
<b>1.4. Dušikov oksid (NO)</b> .....	8
1.4.1. Peroksinitrit .....	9
1.4.2. NO u upalnim bolestima .....	10
<b>1.5. Lipidna peroksidacija</b> .....	10
1.5.1. Malondialdehid (MDA) .....	11
1.5.1.1. Malondialdehid (MDA) u upalnim bolestima .....	11
<b>1.6. Amidini</b> .....	12
<b>1.7. Kinolini</b> .....	12
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	14
<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	15
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	16
<b>4.1. Materijali</b> .....	16
4.1.1. Ispitivani spojevi.....	16
4.1.2. Kemikalije .....	16
4.1.3. Stanična linija .....	17
<b>4.2. METODE</b> .....	18
4.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i> .....	18
4.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi .....	18
4.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom .....	19
4.2. 4. Određivanje ukupnoga antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom.....	20

4.2.5. Određivanje NO Griessovim testom.....	21
4.2.6. Određivanje lipidne peroksidacije TBARS testom.....	21
4.2.7. Statistička obrada podataka.....	22
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>23</b>
5.1. Određivanje citotoksičnoga učinka kinolinsko-arilamidinskih hibrida na kulturu RAW 264.7 stanica MTT testom.....	23
5.2. Određivanje citotoksičnoga učinka kinolinsko-arilamidinskih hibrida i standarda Troloxa na kulturu RAW 264.7 stanica stimuliranu LPS-om MTT testom.....	24
5.3. Određivanje antioksidativnoga kapaciteta kinolinsko-arilamidinskih hibrida ABTS metodom.....	25
5.4. Učinak kinolinsko-arilamidinskih hibrida na stvaranje dušikova oksida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 stanicama <i>in vitro</i> .....	25
5.5. Učinak kinolinsko-arilamidinskih hibrida na stvaranje malondialdehida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 stanicama <i>in vitro</i> .....	26
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>28</b>
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>32</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>33</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>34</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>35</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>50</b>

## POPIS KRATICA

- ABTS – eng. – *2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt*
- APOA-I – Apolipoprotein A1
- BH4 – tetrahidrobiopterin (eng. – tetrahydrobiopterin)
- CD4 – stanični diferencijacijski antigen 4 (eng. – *Cluster of Differentiation 4*)
- COVID-19 – eng. – *Coronavirus disease 2019*
- CRP – C – reaktivni protein
- DAMP – molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (eng. – *Damage-Associated Molecular Patterns*)
- DMEM – Dulbeccov minimalni esencijalni medij (eng. – *Dulbecco's Minimal Essential Medium*)
- DMSO – dimetil sulfoksid
- DNK – deoksiribonukleinska kiselina
- eNOS – endotelna sintaza dušikovog oksida (eng. – *endothelial nitric oxide synthase*)
- FAD – flavin adenin dinukleotid (eng. – flavin adenine dinucleotide)
- FMN – flavin mononukleotid (eng. – flavin mononucleotide)
- HDL – lipoprotein visoke gustoće (eng. – *high-density lipoprotein*)
- HLA – humani leukocitni antigen (engl. – *human leukocyte antigen*)
- ICL– međulančana ukriženja (eng. – *Interstrand crosslinks*)
- IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$
- IGF-1 – faktor rasta sličan Insulinu 1 (eng. – Insulin like growth factor 1)
- IL-1 $\beta$  – interleukin 1 $\beta$
- IL-6 – interleukin 6
- IL-12 – interleukin 12
- IL-8 – interleukin 8
- iNOS – inducibilna sintaza dušikova oksida (eng. – *inducible nitric oxide synthase*)
- LPS – lipopolisaharid
- MCP-1 – čimbenik koji privlači monocite (engl. – *monocyte chemoattractant protein 1*)
- MDA – malondialdehid
- MTT – eng. – *(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)*



nNOS – neuronska sintaza dušikova oksida (eng. – *neuronal nitric oxide synthase*)  
NO– dušikov oksid (eng. – *nitric oxide*)  
NADPH – reducirani nikotinamid dinukleotid fosfat (eng. – *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)  
NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (eng. – *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*)  
NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi (eng. – *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*)  
OSE – specifični oksidacijski epitopi (eng. – *Oxidation-specific epitopes*)  
PAMP – molekularni obrasci patogenih mikroorganizama (eng. – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)  
PBS – fosfatni pufer (eng. – *phosphate-buffered saline*)  
PDGF – trombocitni faktor rasta (engl. – *platelet-derived growth factor*)  
PGE-2 – prostaglandin E2  
PGH2 – prostaglandin H<sub>2</sub>  
PRR – receptori prepoznavanja obrazaca (eng. – *Pattern Recognition Receptors*)  
PUFA – polinezasićene masne kiseline (eng. – *Polyunsaturated fatty acids*)  
RNK – ribonukleinska kiselina  
RNS – reaktivne dušikove vrste (eng. – *reactive nitrogen species*)  
ROS – reaktivne kisikove vrste (eng. – *reactive oxygen species*)  
RPMI 1640 – (eng. – *Roswell Park Memorial Institute*) medij  
SAA – serumski amiloid A  
SASP – sekretorni fenotip senescentnih stanica (eng. – *Senescence-associated secretory phenotype*)  
SLE – Sistemski eritemski lupus (eng. - *systemic lupus erythematosus*)  
SNP – natrijev nitroprusid (eng. – *sodium nitroprusside*)  
SOD – superoksid dismutaza (eng. *superoxide dismutase*)  
SŽS – središnji živčani sustav  
TAM – eng. *tumor associated macrophages*  
TBARS – eng. – *Thiobarbituric acid reactive substances*  
TGFβ – transformirajući faktor rasta beta (eng. – *transforming growth factor beta*)  
TNFα – faktor tumorske nekroze α (eng. – *tumor necrosis factor α*)  
UV - eng. *ultraviolet*  
VEGF – faktor rasta vaskularnog endotela (eng. – *vascular endothelial growth factor*)

# 1. UVOD

## 1.1. Upala

Upala je esencijalan homeostatski odgovor organizma na štetni podražaj. Uspješan imuni odgovor mora biti snažan, te prostorno i vremeski reguliran (1). U evolucijskome pogledu, domaćin nema koristi od kronične upale ili odgovora niskoga stupnja neučinkovitoga za uklanjanje opasnosti jer takva je kronična upala glavni faktor progresije brojnih kroničnih bolesti poput raka, dijabetesa, kardiovaskularnih i autoimunskih bolesti (1, 2).

### 1.1.1. Akutna upala

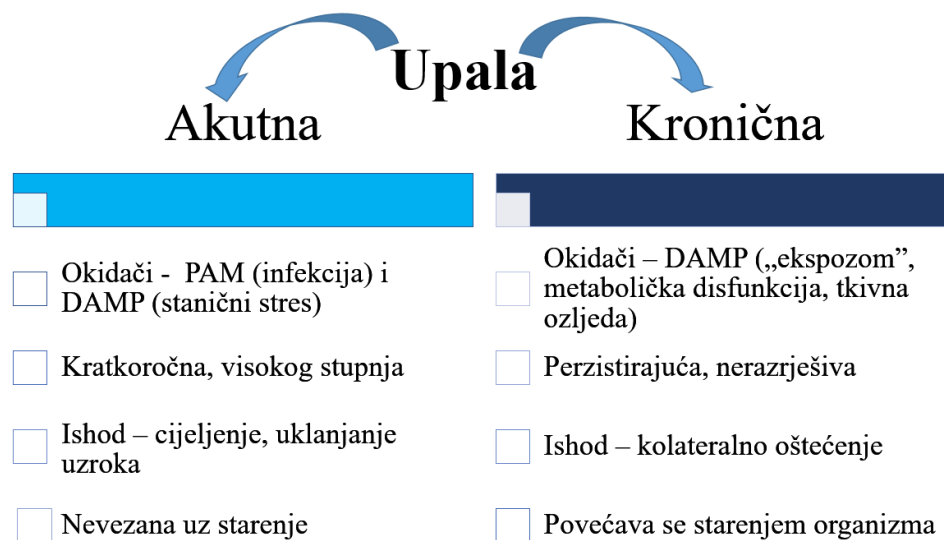
Upala započinje kada stanice prepoznaju evolucijski očuvane strukture patogena (PAMP – eng. – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ili endogene signale opasnosti (DAMP – eng. – *Damage-Associated Molecular Patterns*) preko zamjetnih receptora prepoznavanja obrazaca (PRR – eng. – *Pattern Recognition Receptors*), koji su izraženi na brojnim upalnim stanicama, ali i epitelnim stanicama i fibroblastima (3). Aktivirani granulociti odgovaraju otpuštanjem sadržaja granula što uključuje mješavinu antimikrobnih agensa, enzima, citokina i reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, koji oštećuju tkivo, ali imaju i izražene učinke na krvne žile. Primjerice, pod utjecajem histamina i citokina TNF $\alpha$  (eng. – *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) dilatiraju se krvne žile, povećava se protok krvi prema tkivima i povećava permeabilnost endotelnih stanica. To omogućava plazmi i proteinima ulazak i pripremanje tkiva za infiltraciju stanicama u čijemu usmjeravanju sudjeluju i gradijenti kemokina (4). Takve promjene uzrokuju vidljive znakove upale kao što su: i) crvenilo i bol zbog povećana krvnoga protoka, ii) edem zbog povišena onkotskoga tlaka (povišen albumin) u tkivu, te iii) bol preko djelovanja bradikinina i prostaglandina na neuroreceptore (5). Transport upalnih stanica u tkivo odvija se preko adhezijskih molekula i uključuje leukocitno kotrljanje na vaskularnoj površini, praćeno brojnim reverzibilnim interakcijama sa selektinima, te čvrsto vezanje i potpuno zaustavljanje posredovano integrinima (6–8). Leukociti potom pužu do mjesta spajanja endotelnih stanica i dolazi do njihove transmigracije u tkivo ili dijapedeze (9). Prve stanice privučene na mjesto upale su neutrofili, praćeni monocitima, limfocitima i mastocitima (10). Tipičan profil stanica periferne krvi u upali karakteriziran je neutrofilijom sa skretanjem ulijevo (nezreli oblici) te monocitozom. Limfopenija je čest nalaz zbog sekundarnoga stresa, a vidljiv je i blagi pad parametara crvene krvne slike (11).

Brojni učinci upale posredovani su i proteinima akutne faze koji se sintetiziraju u jetri u odgovoru na interleukin - 6 (IL-6) te mijenjaju svoju serumsku koncentraciju više od 25 %. Njihovo mjerenje u serumu radi visoke dijagnostičke osjetljivosti koristi se kako bi se evaluirali prisutnost, intenzitet i tijek upalnoga procesa (12). Pozitivni proteini akutne faze (povećavaju svoju koncentraciju u upali) su primjerice CRP (C- reaktivni protein), SAA (serumski amiloid A), haptoglobin i fibrinogen, a negativni cink, željezo i albumin (13). Bitno je napomenuti da se proteini akutne faze mogu povećati u odgovoru na stres i nespecifičnu tkivnu ozljedu pa se njihove vrijednosti moraju interpretirati u odnosu na ostale nalaze (11). Na kraju upalnoga procesa rezolucija upale posredovana je smjenom lipidnih posrednika od upalnih prostaglandina do reparativnih lipoksina, rezolvina, protektina i marezina koji inhibiraju infiltraciju leukocita, diluiraju kemokinske gradijente te potiču uklanjanje apoptotskih stanica (2, 14, 15). Također, tkivni makrofagi i fibroblasti promiču tkivni popravak i remodeliranje tkiva, izlučujući faktore rasta kao što je TGF $\beta$  (transformirajući faktor rasta beta). (14). Deregulacija ovoga procesa dovodi do kronične upale i daljnjega oksidativnog stresa (13).

### 1.1.2. Kronična upala

Kronična upala je, za razliku od akutne upale, češće aktivirana endogenim noksama otpuštenim tijekom staničnoga stresa (DAMP), a povećava se s dobi, niskoga je stupnja i perzistentna, uzrokuje oštećenja tkiva i organa te slabi njihove normalne imune funkcije što uzrokuje loš odgovor na cjepiva te podložnost oportunističkim infekcijama i nastajanju malignih procesa u organizmu (Slika 1.) (16, 17). Studija na kohorti od 160 000 ljudi pokazala je da su markeri upale, tj. CRP, albumin i neutrofilni neovisni prediktori smrtnosti od svih uzroka u periodu od 8 godina (18). Studija na stogodišnjacima u Japanu prikazala je da je upala, ali ne i duljina telomera, važan pokretač starenja i da je njezina supresija najvažniji faktor dugovječnosti, s većom značajnosti u kasnijoj dobi (19). Kronična je upala danas shvaćena kao ubikvitarna karakteristika starenja i smatra se kako je velikim dijelom uzrokovana procesom stanične senescencije, koja je karakterizirana zaustavljanjem staničnoga ciklusa i usvajanjem senescencijom posredovana sekretotnoga fenotipa (SASP – eng. – *Senescence-associated secretory phenotype*) koji uključuje izlučivanje proupalnih citokina, kemokina, tkivno razarajućih proteaza te faktora koji oštećuju funkciju matičnih i progenitorskih stanica (20–23). Rezultati nedavnih studija potvrđuju da senescencija djeluje na rast i širenje raka preko izlučenih faktora rasta te da se može širiti i na susjedne stanice, što dodatno intenzivira tkivno propadanje (24). Senescencijom posredovano opadanje imune funkcije kompromitira

uklanjanje takvih stanica makrofagima što dodatno pogoršava upalu (25, 26). Smatra se da stanice stječu takav fenotip kombinacijom endogenih i egzogenih uzroka, no veća se važnost danas ipak pridaje nenasljednim, egzogenim čimbenicima na što upućuje i studija blizanaca koja pokazuje da čovjekovu podložnost kroničnim bolestima najvećim dijelom određuje ekspozom, tj. skup okolišnih faktora izloženosti tijekom života kao što su prehrana, fizička aktivnost i stres (27–29). U prilog tomu ide i longitudinalna studija koja je pokazala da je veća izloženost mikrobima u ranome djetinjstvu povezana s nižim CRP-om u odrasloj dobi, a što je u skladu s hipotezom prema kojoj niska izloženost bezopasnim mikrobima u suvremenom načinu života predisponira čovjeka prema razvoju kroničnih upalnih stanja (30–32). Prisutnost upale tijekom trudnoće u majke i njezina izloženost štetnim čimbenicima okoliša mogu epigenetskim mehanizmom prenijeti rizik za razvoj kronične upale i značajno izmijeniti razvoj mozga potomstva što je prikazano na mišjem modelu (16, 33, 34). Epigenetske modifikacije nastaju i u leukocitima pretilih djece i objašnjavaju perzistenciju metaboličke upale te rizika za dijabetes u odrasloj dobi, čak i nakon gubitka težine (35). Sve više dokaza posljednjih nekoliko godina upućuje na to da kronična upala posreduje nastanak široka raspona kroničnih bolesti koje su vodeći uzrok mortaliteta u svijetu, a koje uključuju rak, dijabetes, kardiovaskularne i neurološke bolesti (36, 37).



**Slika 1.** Značajke akutne i i kronične upale (16)

Danas su u uporabi brojne klase protuupalnih lijekova, no većina onih koji se koriste imaju značajnu toksičnost (38). Nesterodni protuupalni lijekovi (NSAID – eng. – *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*) su najčešći lijekovi za liječenje upalnih bolesti u svijetu

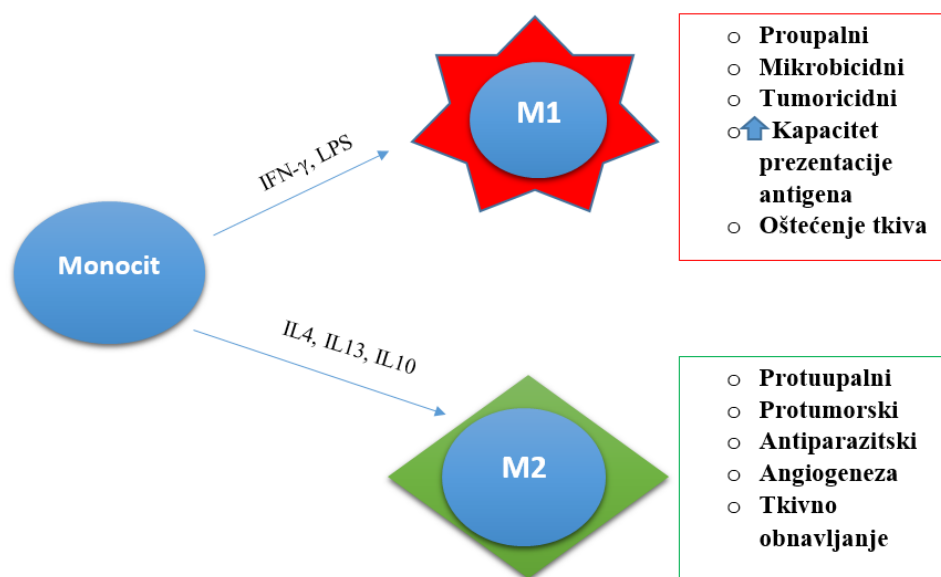
koje koristi 30 milijuna Amerikanaca, a u RH im je potrošnja u 2018. porasla za 11 % u odnosu na 2017. g. (39, 40) zbog njihove široke dostupnosti. Njihova zloupotreba velik je problem, kao i nuspojave: probavne ulceracije, krvarenja, disfunkcija trombocita, bubrežna i jetrena toksičnost, a korištenje im je povezano sa značajnim rizikom od akutnoga infarkta miokarda što je pokazano metaanalizom Ballyja i sur. (41–43). Stoga ne čudi da se u SAD-u svake godine 100 000 hospitalizacija i 17 000 smrti pripisuje tim lijekovima (44). Budući napori trebali bi stremiti prema dizajnu lijekova bez ili sa smanjenom toksičnosti, koji mogu djelovati na više razina upalne kaskade i kroniciteta upalnoga odgovora. Hibridni lijekovi pokazali su obećavajuće rezultate kod takvoga pristupa (45, 46).

## 1.2. Makrofagi

Makrofagi pripadaju mononuklearnom fagocitnom sustavu, obitelji profesionalnih fagocita koji uključuju monocite i dendritičke stanice (47). Hvatanje, endocitoza i prezentacija antigenskih fragmenata u kompleksu s humanim leukocitnim antigenom (HLA – engl. – *human leukocyte antigen*), te stimulacija T stanica bitne su značajke makrofaga kojim povezuju urođenu i adaptivnu imunost (48). Danas se zna da većina tkivnih makrofaga, koji uključuju mikrogliju u SŽS-u, osteoklaste u kostima, alveolarne makrofage, histiocite i Kupfferove stanice nastaju iz embrionskih prekursorskih stanica koje koloniziraju tkiva prije rođenja, imaju samoobnavljajuća svojstva i održavaju se neovisno o cirkulirajućim monocitima (48, 49). Transkriptomске su anlike pokazale da se takve makrofagne populacije razlikuju jedna od druge na epigenetskoj razini. Takve su promjene reverzibilne jer zreli makrofagi preneseni iz jednoga tkiva u drugo poprimaju fenotip ciljnoga tkiva (50). Tkivni makrofagi imaju bitne uloge u razvoju, homeostazi i rezoluciji upale. No u odgovoru na upalni stimulus, brojni monociti odlaze u tkiva pod utjecajem PAMP i DAMP signala, te kemokina gdje ih inicira robusni upalni odgovor, izlučujući citokine kao što su TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (51). Nakon što rani upalni odgovor završi, makrofagi usvajaju fenotip obnavljanja tkiva stvarajući brojne faktore rasta kao PDGF (engl. – *platelet-derived growth factor*), TGF $\beta$ , IGF-1 (eng. – *Insulin like growth factor 1*) i VEGF (eng. – *vascular endothelial growth factor*). Ako ovaj proces nije efikasno kontroliran, perzistirajuća upala dovest će do destrukcije tkiva i fibroze (52).

### 1.2.1. Aktivacijska stanja makrofaga

Prema aktivacijskome stanju, makrofagi se dijele na M1 i M2 makrofage. M1 ili klasično aktivirani makrofagi su makrofagi prisutni u veliku broju u upaljenome tkivu te su stimulirani lipopolisaharidom (LPS) ili interferonom -  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Oni posjeduju specifične karakteristike poput a) pojačane sekrecije proupalnih citokina kao TNF $\alpha$  i IL1b, b) pojačan kapacitet prezentacije antigena, c) visoka produkcija reaktivnih dušikovih i kisikovih radikala i d) izlučivanje IL-12 koji potiče TH1 polarizaciju CD4<sup>+</sup> limfocita. Općenito imaju mikrobicidna, citotoksična i antitumorska svojstva (53–55). M2 makrofagi se polariziraju u odgovoru na IL-4, IL-10, IL-13 i glukokortikoide te izlučuju visoke količine IL-8, MCP 1 (engl. – *monocyte chemoattractant protein-1*) i IL-10 (Slika 2.). Karakteristično za njih je da kontroliraju upalu, aktivirani su tijekom parazitskih i fungalnih infekcija, podržavaju angiogenezu i popravak tkiva, ali i tumorsku progresiju (55, 56). Ipak, ovakva podjela predstavlja samo *in vitro* ekstremizaciju i pojednostavljenje dinamičkoga kontinuuma fenotipa koji makrofagi usvajaju *in vivo* u odgovoru na lokalni citokinski okoliš (56).



**Slika 2.** Aktivacijska stanja makrofaga (56)

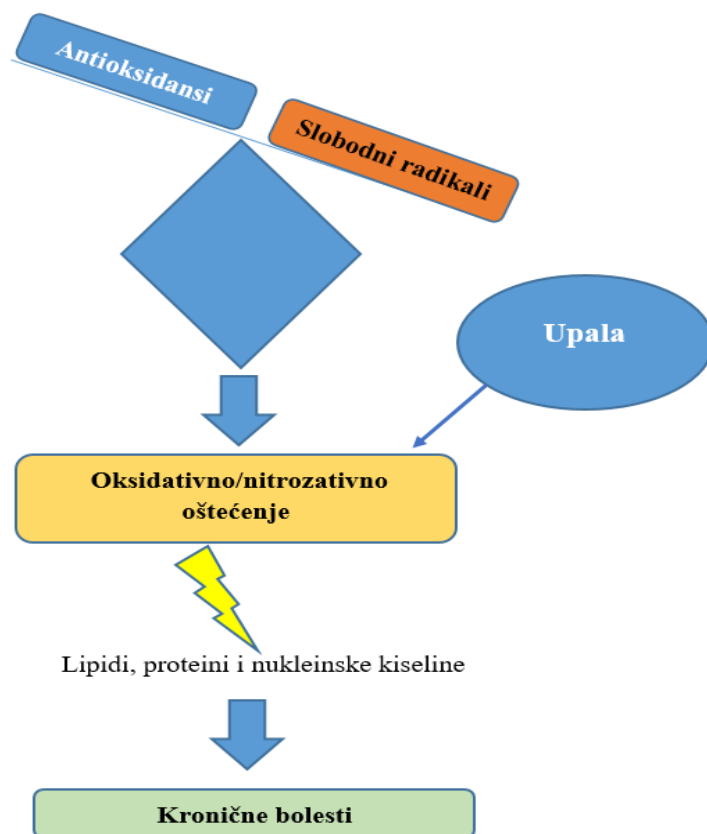
### 1.2.2. Makrofagi u upalnim bolestima

U brojnim upalnim bolestima makrofagi su vodeće stanice koje utječu na ishod bolesti (57). Prisutni su u svim stadijima ateroskleroze i pokazano je kako u pacijenata s aterosklerozom

simptomatski plakovi obiluju M1 makrofagima, dok makrofagi u asimptomatskom plakovima imaju M2 markere (58). Upalni makrofagi sekrecijom citokina i proteaza povećavaju opseg lezije i mijenjaju morfologiju aterosklerotskoga plaka, promovirajući nekrozu plaka i stanjivanje protektivne fibrozne kape što dovodi do rupture i akutne lumenalne tromboze (59). U pretilosti također imaju pretežno M1 fenotip te oko mrtvih adipocita formiraju strukture slične kruni koje dodatno doprinose metaboličkim komplikacijama i progresiji nealkoholne masne bolesti jetre (NAFLD – eng. – *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) (60, 61). Pokazano je i da se makrofagi tijekom upale gušteračnih otočića polariziraju u M1 makrofage i glavni su izvor upalnih citokina, posebice IL1b koji inhibira inzulinsku sekreciju praćenu destrukcijom otočića u mišjim modelima diabetes mellitusa tipa 2 (62). Zanimljivo, tumorski makrofagi (TAM – eng. – *tumor associated macrophages*) imaju dvojnu ulogu u tumorskome rastu, s protumorskim M1 fenotipom u ranim stadijima rasta tumora, dok s tumorskom progresijom podržavaju rast tumora usvajajući M2 fenotip pod utjecajem signalnih tumorskih molekula IL4, IL10, TGFβ i prostaglandina E2 (PGE2). Eksperimentalne i kliničke studije otkrile su kako njihova povećana infiltracija korelira s lošijim ishodima u pacijantima (63–65). Shodno tomu, makrofagi su zanimljiva meta terapije različitih patofizioloških stanja (57).

### **1.3. Oksidativni stres**

Redoks balans, tj. delikatna ravnoteža povoljnih i štetnih učinaka radikala ključna je u održavanju ispravne funkcionalnosti vitalnih staničnih funkcija, a pretpostavlja se da je većina, ako ne i svi transkripcijski događaji u stanici, modulirana ili kritično ovisna o redoks signalizaciji (66–68). Oksidativni/nitrozativni stres, kao privilegija aerobnih organizama, opisuje stanje neadekvatne obrane organizma od prekobrojnih reaktivnih vrsta bilo zbog neadekvatnih zaliha antioksidansa ili presnažna stvaranja takvih radikala (69). Klinički podatci jasno ukazuju na povezanost upale i oksidativnoga stresa, kao i njihovu patogenu ulogu u kroničnim upalnim bolestima (Slika 3.) (70).



**Slika 3.** Povezanost upale i oksidativnoga stresa s bolestima (2)

### 1.3.1. Reaktivne kisikove i dušikove vrste

Slobodni radikali su tvari s nesparenim elektronom, sposobne za neovisno postojanje (69). Reaktivne kisikove (ROS – eng. – *reactive oxygen species*) i dušikove (RNS – eng. – *reactive nitrogen species*) vrste primjer su takvih radikala. Superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikal i singlet kisik su ROS, a dušikov oksid i peroksinitrit RNS (71, 72). ROS i RNS stvaraju se u metabolizmu djelovanjem različitih enzima kao što su NADPH oksidaze, ksantin oksidaze, peroksidaze, dušik oksid sintaze, zatim djelovanjem endogenih (imune stanice, upala, mentalni i fizički stres, hipoksija), te egzogenih (teški metali, lijekovi, UV zračenje) faktora (73, 74). Posljednjega desetljeća prihvaćen je koncept dvojnoga karaktera reaktivnih vrsta koji pokazuje da umjerene količine radikala induciraju reverzibilne oksidativne/nitrozativne modifikacije u redoks osjetljivim ostacima regulatornih proteina koji reguliraju ključne stanične procese kao što su genska ekspresija, diferencijacija, migracija i epigenetika (75, 76). Ipak, kod patoloških stanja njihovo prekomjerno stvaranje oštećuje ove



regulatorne mehanizme što rezultira trajnim oštećenjem na molekularnoj i staničnoj razini, te amplifikacijom proupalnoga fenotipa (67, 77).

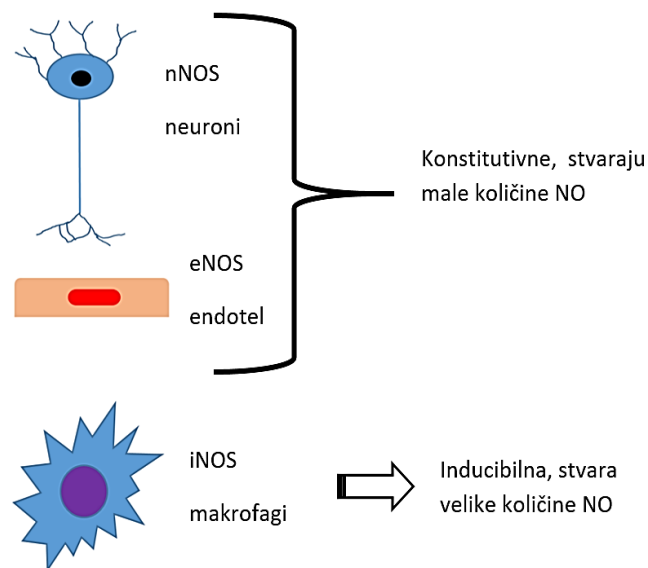
### 1.3.2. Antioksidansi

Pod biološkim antioksidansom smatra se bilo koji spoj koji je, kada je prisutan u nižoj koncentraciji od slobodnoga radikala, sposoban ga neutralizirati i time reducirati kapacitet njegova štetnoga učinka (78, 79.) Endogeni antioksidansi dijele se na enzimske (katalaza, glutation peroksidaza, superoksid dismutaza) i neenzimske (glutation, lipaze, proteaze, bilirubin, lipoična kiselina), a primjeri egzogenih su flavonoidi, karotenoidi, kao i vitamini E i C (80, 81). Antioksidansi mogu potaknuti raspad reaktivnih vrsta unutar stanice (superoksid dismutaza (SOD), katalaza), direktno hvatati slobodne radikale (vitamini C i E) ili obnavljati oštećenja uzrokovana radikalima (lipaze, proteaze) (82, 83). Sintetske modifikacije antioksidansa i razvoj hibridnih spojeva novi su pristupi u razvoju antioksidativno baziranih terapijskih spojeva (84).

## 1.4. Dušikov oksid (NO)

Dušikov oksid (NO – eng. – *nitric oxide*) primarni je oblik RNS-a stvoren u reakciji konverzije arginina u citrulin. Reakcija se zbiva u aerobnim uvjetima u prisutnosti koenzima NADPH (eng. – *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), FAD (eng. – flavin adenine dinucleotide), FMN (eng. – flavin mononucleotide) i BH4 (eng. – tetrahydrobiopterin) (75). NO slobodno difundira preko staničnih membrana, omogućujući distalno signaliziranje, čak i unutar susjednih stanica (85). NO ima regulatornu funkciju djelujući na vaskularni tonus i plastičnost, medijator je u SZS-u i inhibira agregaciju trombocita (86). NO sintaze su hemoenzimi prisutni u 3 izoforme: i) nNOS (eng. – *neuronal nitric oxide synthase*), konstitutivno izražena u stanicama središnjega živčanog sustava, uključena u sinaptičku transmisiju, neurogenezu, učenje i pamćenje, ii) eNOS (eng. – *endothelial nitric oxide synthase*), konstitutivno izražena u vaskularnom endotelu, uključena je u regulaciju vaskularne funkcije, iii) iNOS (eng. – *inducible nitric oxide synthase*), producira NO nakon stimulacije LPS-om ili IFN- $\gamma$ , a izražena je u brojnim stanicama kao što su makrofagi, neutrofil i hepatociti (75). U kontrastu nNOS-a i eNOS-a, izražaj iNOS za posljedicu ima stvaranje velikih količina NO-a. Aktivna je samo tijekom upale (Slika 4.) (87). Shodno tomu, neselektivna NOS inhibicija praćena je brojnim nuspojavama i pokazano je kako može povećati mortalitet u septičnih pacijenata, a selektivna inhibicija iNOS ima manje neželjenih učinaka i široku terapijsku

korist kod dijabetasa, raka, respiratornih i neuroloških stanja. Unatoč povoljnim animalnim studijama, nijedan iNOS inhibitor nije odobren za ljudsku primjenu (88).



**Slika 4.** Tipovi sintaza dušikova oksida (87)

#### 1.4.1. Peroksinitrit

Signalizacija preko NO-a ovisi o koncentraciji i redoks mikrookolišu. Toksičnost NO-a tijekom oksidativnoga stresa proizlazi iz NO izvedenih radikala, posebno peroksinitrita koji promovira oksidaciju i nitraciju brojnih biomolekula (86). Aktivirani makrofagi stvaraju velike količine  $O_2$  preko NADPH oksidaze, te NO preko iNOS enzima pri čemu se stvara peroksinitrit, o čijoj produkciji ovisi zaštitna uloga makrofaga protiv patogena. Ipak, prekomjerno stvaranje ili deregulacija sinteze peroksinitrita povezano je i s brojnim kroničnim upalnim bolestima kao što su dijabetes tip 2, aterosleroza i neurodegenerativne bolesti što dokazuje njegovu dvojnu prirodu (89). Peroksinitrit pojačava i aktivira proupalne procese aktivacijom proupalnih puteva, inhibicijom enzima respiratornoga lanca te SOD-a i glutaciona, čime uzrokuje oksidativnu staničnu ozljedu. Reakcijom s lipidima dovodi do peroksidacije i stvaranja malondialdehida (90). U DNK peroksinitrit dovodi do stvaranja 8-okso- i 8-nitrogvanozina koje su osnova mutagenoze (91). Peroksinitrit promovira nitraciju tirozinskih ostataka na proteinima što daje 3-nitrotirozin, otisak aktivnosti peroksinitrita, korišten kao marker progresije i prediktor ishoda upalnih bolesti (92). Bitan aspekt nitriranja proteina je pojačavanje njihove imunogenosti i

akumulacija autoloških nitriranih proteina pokazana je u upaljenim tkivima koji tada postaju strani imunom sustavu i aktiviraju autoimuni odgovor (93).

#### 1.4.2. NO u upalnim bolestima

Razvoj je raka usko povezan s kroničnom upalom, a kronično generiranje NO-a, uz ROS, igra esencijalnu ulogu u održavanju oksidativnog/nitrozativnog stresa u tumorima (94). Rezultati metaanalize i sustavnoga pregleda literature koji su uključili više od 1700 pacijenata s 11 različitih solidnih tumora pokazali su da je prekomjerni izražaj iNOS-a, odgovornoga za prekomjernu produkciju NO-a, povezan sa slabim preživljavanjem u humanim tumorima te može biti dobar prognostički tumorski biljeg (95). Dodatno, metaanaliza i sustavni pregled literature koji je uključio 277 pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE – eng. – *systemic lupus erythematosus*) pokazao je pozitivnu korelaciju izražaja iNOS-i patologije u SLE-u (96). NO produciran iNOS-om unutar SŽS-a dominantno pridonosi multiploj sklerozi, a NO i peroksinitrit uzrokuju u SŽS-u lipidnu peroksidaciju, oštećenje oligodendrocita i krvno-moždane barijere te aksonalnu degeneraciju (97). Lee i suradnici su pokazali kako dugotrajna konzumacija visoko masne dijeta aktivira izražaj iNOS hipotalamičkih makrofaga, dovodi do hipotalamičke upale i abnormalnoga metabolizma glukoze. Inhibicija iNOS-a ukida proupalnu citokinsku produkciju i popravlja glukozni metabolizam u pretilu mišu (98). Pacijenti s reumatoidnim artiritisom imaju dualnu abnormalnost u NO ovisnoj vaskularnoj funkciji i imaju smanjenu aktivnost eNOS-a i povišenu aktivnost iNOS-a koji producira velike količine NO-a, što dovodi do endotelne disfunkcije (99).

### 1.5. Lipidna peroksidacija

Stanične membrane, kao i membrane organela, zbog visoka su sadržaja polinezasićenih masti (PUFA – eng. – *Polyunsaturated fatty acids*) posebno osjetljive na oštećenja izazvana ROS-om i RNS-om koji induciraju lipidnu peroksidaciju (100). Radikali mogu oštetiti fosfolipide direktno i inducirati staničnu smrt, ali i same PUFA mogu postati radikali i propagirati daljnju lančanu peroksidaciju (101). Proces se odvija u trima fazama. U *inicijalnoj fazi* dolazi do uklanjanja vodika iz masnih kiselina djelovanjem ROS i RNS vrsta kao što su hidroksilni, hidroperoksilni radikal, i peroksinitrit, pri čemu se stvara lipidni radikal. Tijekom *propagacijske faze* formirani lipidni radikal reagira s kisikom tako da formira peroksilni radikal koji može formirati novi lipidni radikal i lipidni peroksid. U *fazi terminacije* dva lipidna ili peroksilna radikala reagiraju jedan s drugim ili s antioksidansom (102). Peroksidacija lipida

izražava toksične učinke preko dvaju mehanizama: 1. narušava signalizacijski transport, fluidnost i permeabilnost membrane te 2. generira visoko reaktivne sekundarne produkte kao što su 4-hidroksinonenal, malondialdehid i akrolein koji narušavaju funkciju proteina i DNK (103, 104). Njihova toksičnost slična je onoj ROS-a i RNS-a, a zbog toga što su stabilniji od drugih slobodnih radikala, sekundarni produkti mogu regirati i oštetiti biomolekule na distalnim mjestima (105).

### 1.5.1. Malondialdehid (MDA)

MDA je opsežno korišten godinama kao pogodan marker lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, a može nastati enzimatskim i neenzimatskim procesima (106). Prvim načinom tromboksan sintaza konvertira ciklooksigenazom stvoren prostaglandin (PG)<sub>2</sub> u ekvimolarne količine tromboksana A<sub>2</sub>, 15-hidroksiheptadekatrienoat (HHT) i MDA (107). Neenzimski način u stanicama sisavaca kao prekursore koristi polinezasićene masne kiseline poput arahidonske i dokozaheksanoične te ih konvertira preko formiranja i raspada raznih bicikličkih intermedijera u slobodni MDA (108). Smatra se da neenzimatski stvoren MDA ima velik potencijal reakcije s biomolekulama (106). MDA, kao reaktivni aldehid, može generirati kovalentne adukate s primarnim aminima proteina te amino grupama lipida i tako stvoriti oksidacijske specifične epitope (OSE – eng. – *Oxidation-specific epitopes*) (109). MDA epitopi su potencijalno opasni jer mogu potaknuti imune odgovore i povećati ekspresiju proupalnih citokina u makrofagima (110). Njihovo prekomjerno stvaranje i neučinkovito uklanjanje dovodi do induciranja proupalnih odgovora i rezultira razvojem kroničnih upalnih bolesti (111). Na ljudskim fibroblastima pokazano je da MDA može generirati velike insercije i visokomutagene lezije u DNK te međulančane križne veze (ICL – eng. – *Interstrand crosslinks*) koje blokiraju DNK i RNK polimerizaciju (112). Osim stvaranja adukata i epitopa, MDA može križno povezivati biomolekule kao što su strukturni i funkcionalni proteini, primjerice kolagen, što dovodi do križnoga povezivanja kolagena, potičući gubitak elastičnosti i remeti tkivno remodeliranje te dovodi do patologije u krvožilnom sustavu (113).

#### 1.5.1.1. Malondialdehid (MDA) u upalnim bolestima

U studiji Rašića i suradnika, serumski MDA kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom pokazao se kao neovisni pozitivni prediktor dubljine tumorske invazije intestinalnoga zida, infiltracije limfnoga čvora te pojavnosti metastaza što je indiciralo poveznicu MDA s karcinogenezom i progresijom kolorektalnog karcinoma (114). MDA epitopi također

predstavljaju ključan medijator upale u aterosklerozi. HDL (eng. – *high-density lipoprotein*) izoliran iz humanih aterosklerotskih regija bogatiji je MDA epitopima u odnosu na zdrave donore. Modifikacija apolipoproteina Apo-A1, glavnoga proteina HDL-a s MDA, oštećuje bitne kardioprotektivne funkcije HDL-a što doprinosi razvoju ateroskleroze (115). U studiji 29 pacijenta s tipom 1 diabetes mellitusa pokazano je kako je nastup bolesti bio praćen povišenjem plazmatske razine MDA te su koncentracije MDA bile značajno povišene u odnosu na zdrave ispitanike iste dobi (116). U istraživanju provedenom na 73 pacijenta s Alzheimerovom bolesti koncentracije MDA bile su značajno više u skupini pacijenata u odnosu na kontrolu te su uz alel  $\epsilon 4$  predstavljene kao neovisan faktor rizika koji doprinosi samoj patogenezi te bolesti. Štoviše, omjer izgleda pokazao je kako sâm alel  $\epsilon 4$  povisuje rizik za razvoj bolesti za oko 5 puta, dok ga povišen MDA povisuje za čak 9 puta (117). Karcinogeni učinak MDA je nadalje potkrijepljen detekcijom povišenih razina MDA kod pacijenata s karcinomima bazalnih stanica te prostate u odnosu na kontrolu (118, 119).

## 1.6. Amidini

Amidini, koji se mogu smatrati dušičnim analogima karboksilnih kiselina, grade brojne prirodne spojeve od medicinskoga interesa. Također izgrađuju brojne heterocikličke spojeve, značajni su biološki aktivni spojevi i često se koriste u dizajnu novih spojeva s terapijskom učinkovitosti (120, 121). Amidini i njegovi derivati posjeduju antidegenerativna, antimikrobna, protutumorska, antikonvulzijska i protuupalna svojstva, a pokazani su i kao inhibitori sintaze dušikova oksida i serinske proteaze (121, 122). Njihova protuupalna učinkovitost opetovano je pokazana na mišjim modelima, pokazujući usporediv učinak sa standardnim lijekovima ibuprofenom i aspirinom. Studija Khanna i sur. pokazala je da amidinski derivati nemaju gastrointestinalnu toksičnost koja je česta nuspojava vezana uz primjenu standardnih protuupalnih lijekova (123, 124).

## 1.7. Kinolini

Kinolinska jezgra bitna je strukturna jedinica široko prisutna u prirodnim alkaloidima i nosintetiziranim spojevima s terapijskim učincima, te čini važnu okosnicu u razvoju novih lijekova zbog brojnih bioloških svojstava kao što su protuupalno, protutumorsko, antioksidativno, antimikrobno i antihipertenzivno. Kinolini također mogu interkalirati u DNK dupleks i zaštititi DNK od slobodnih radikala i oksidativna oštećenja (125).

7-Klorokinolinski derivati, među kojima su najpoznatiji klorokin i hidroksiklorokin, pokazali su se korisnim u liječenju brojnih kroničnih upalnih bolesti (SLE, reumatoidni artritis, osteoartritis), a zbog odličnih protuupalnih svojstava istražuju se i protiv bolesti COVID-19 (eng. – *Coronavirus disease 2019*). Pilot-studije su pokazale poboljšanje kliničkoga ishoda i skraćanje trajanja bolesti u bolesnika s COVID-19, liječenih tim lijekovima (126–128). Smatra se kako je takav učinak posljedica potentnoga protuupalnog učinka tih spojeva koji djeluje sinergistički s antiviralnim svojstvom (129). Pokazano je da u određenih teških oblika COVID-19 imunosni sustav pacijenata pretjerano reagira, proizvodeći visoke razine proupalnih citokina IL-6, IL1b i TNF $\alpha$ , što je poznato kao citokinska oluja te je povezana s negativnim kliničkim ishodom u tih pacijenta (130). Klorokin i hidroksiklorokin sposobni su inhibirati antigensku prezentaciju, aktivaciju Tollu sličnih receptora te T i B receptora i sekreciju proupalnih citokina IL-6, IL-1 i TNF $\alpha$  u alveolarnim makrofagima te tako potencijalno smanjiti hiperupalni odgovor u bolesti COVID-19. Tijekom posljednja tri mjeseca započete su brojne studije kako bi se efekti tih lijekova, odnosno hidroksiklorokina kao sigurnijega analoga, valjano evaluirali u kvalitetnim kliničkim studijama (131).

## **2. Hipoteza**

Polazna pretpostavka je da novosintetizirani kinolinsko-arilamidinski hibridi mogu inhibirati upalni odgovor u induciranim RAW 264.7 mišjim makrofagima.

### **3. Cilj istraživanja**

U liposaharidima induciranim RAW264.7 stanicama nakon tretmana s molekulskim kinolinsko-arilamidinskih hibridima:

1. ispitati njihovu protuupalnu aktivnost određivanjem dušikova oksida i malonilaldehida
2. odrediti antioksidativan kapacitet hibrida.

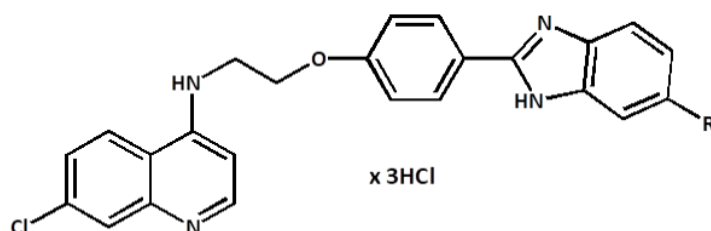


## 4. Materijali i metode

### 4.1. Materijali

#### 4.1.1. Ispitivani spojevi

Kinolinsko-arilamidinski hibridi sintetizirani su u Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Slika 5, Tablica 1.). Spojevi su otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji 0,01 M (mol/dm<sup>3</sup>) i potom pohranjeni na -20 °C do uporabe. Neposredno prije testiranja pripravljene su radne otopine otapanjem stock otopine (0.01 M) u mediju čija su završna razrjeđenja bila 0,1, 1, 10 i 100 μM.



Slika 5. Struktura kinolinsko-arilamidinskih molekularnih hibrida

Tablica 1. Amidinski supstituenti hibrida

Hibrid	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
R							-CN

#### 4.1.2. Kemikalije

- DMEM, s visokim udjelom glukoze (4,5 g/L) i L-glutaminom, Capricorn Scientific GmbH (Slough, Velika Britanija) g/l
- Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640), Lonza (Basel, Switzerland)

- Fetalni goveđi serum (FBS), Na-piruvat i antibiotik-antimikotik (penicilin–streptomycin) 100x, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija)
- Amonijev persulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dimetil sulfoksid (AppliChem, Darmstadt, Njemačka)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) (Merck, New Jersey, SAD)
- Tripansko modriilo 0.4 % (Sigma-Aldrich, VB)
- 2,2'-azino-bis(3-ethybenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Lipopolisaharid (LPS iz *Escherichia coli* O111:B4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Natrijev nitrit (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Griessov reagens (1 % sulfanilamid u 5 % fosfornoj kiselini, i 0,1 % naftiletenediamid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Malondialdehid (MDA) (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Trikloroctena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- TBA (2-tiobarbiturna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1,1,3,3- Tetraetoksipropan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### 4.1.3. Stanična linija

Učinci kinolinsko-arilamidinskih hibrida (Slika 5., Tablica 1.) ispitivali su se na kulturi RAW 264.7 (ATCC® TIB-71) stanica mišjih makrofaga.

## 4.2. METODE

### 4.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Stanice su uzgojene u bočicama za kultivaciju površine rasta 25 i 75 cm<sup>2</sup> (BD Falcon, Njemačka) u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub> te visoku vlažnost.

RAW 264.7 adherentna stanična linija kultivirana je u RPMI 1640 mediju uz dodatak 10 % FBS-a, 2 mM glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicina. Konfluentnost stanica provjeravala se svakodnevno pomoću invertirnoga mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Za odvajanje adherentnih stanica od podloge koristio se 0,25 % tripsin/EDTA. Stanice su se tripsinizirale 6 min u CO<sub>2</sub> inkubatoru nakon čega je tripsin inaktiviran dodatkom medija za uzgoj.

### 4.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Broj stanica i vijabilnost određen je bojenjem stanične suspenzije tripan plavilom. Na 50 µL resuspendirane stanične suspenzije dodana je boja tripan plavilo. Stanična suspenzija s bojom nanešena je na Bürker-Türkovu komoricu, a stanice su brojene pomoću invertirnoga mikroskopa. Žive stanice su nebojene jer imaju intaktnu staničnu membranu, te boju aktivno izbacuju pomoću membranskih pumpi. Boja se nakuplja u mrtvim stanicama. Brojene su stanice unutar 4 kvadrata te one u gornjemu i jednom od postranih bridova kvadrata (Slika 6).

Broj živućih stanica određen je formulom:

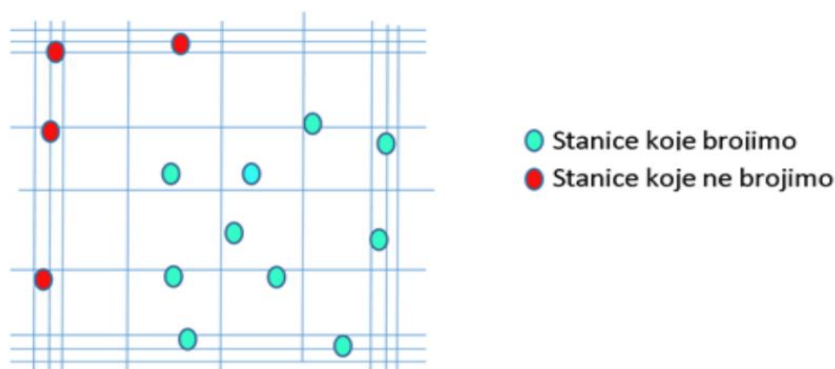
$$N/4 \cdot 3 = X \cdot 10^4 \text{ stanica/cm}^3$$

Gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrijeđenja



**Slika 6.** Mikroskopski prikaz Bürker-Türk komorice

#### 4.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

Učinak testiranih spojeva na vijabilnost mišje makrofagne stanične linije RAW 264.7 (ATCC® TIB-71) određen je kolorimetrijskim metiltetrazolij (MTT – eng. – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) testom. Mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolički aktivnih stanica reducira tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid) što rezultira stvaranjem tamnoljubičastih kristala formazana koji se nakuplja u stanicama.

Stanice RAW 264.7 mišjih makrofaga nasađene su na mikrotitarske ploče s 96 jažica u koncentraciji  $2 \times 10^4$  st/mL u volumenu od 200  $\mu$ l (180  $\mu$ l stanične suspenzije i 20  $\mu$ l spoja). Nasađene su i kontrole stanica koje ostaju netretirane. Kontrole početnoga broja stanica pohranjuju se u dvije epruvete od 1 ml te se ostave na  $-20$  °C do kraja testa. Stanice su se inkubirale na  $37$  °C / 24 h u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Na prvi dan testa stanice su tretirane kinolinsko-arilamidinskim hibridima u finalnim koncentracijama od 0,1, 1, 10 i 100  $\mu$ M tijekom 72 h. Dodatno, stanice su pretretirane hibridima 1a – 1g i Troloxom kao standardom u koncentraciji od 10  $\mu$ M tijekom 2h, te potom stimulirane lisopolisaharidima (LPS) (1 $\mu$ g/mL) tijekom 24 h. Nakon 72, odnosno 24 h, medij se uklonio, a stanice su tretirane 1X MTT/PBS-om u koncentraciji od 5 mg/mL. Stanice su potom inkubirane u inkubatoru 4 h. Formazanski kristali otopljeni su sa 160  $\mu$ l DMSO-a, uz laganu trešnju na tresilici (OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvia) na sobnoj temperaturi. Rezultati su očitani na mikročitaču (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na valnoj duljini od 595 nm.

Nakon dobivenih rezultata apsorbancije, kontrola i pozadine (*background*), određen je udio preživljavanja stanica koji se izražava prema sljedećoj formuli:

$$\text{vijabilnost (\%)} = \frac{A_{\text{tretman}} - A_{\text{background}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{background}}} \times 100$$

#### 4.2. 4. Određivanje ukupnoga antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom

Kod određivanja ukupnoga antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom ABTS 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), kao radikal koristi se plavo-zeleno obojeni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline (ABTS radikal) koji se formira oksidacijom otopine ABTS-a. Dodatak antioksidansa izaziva gubitak boje, a ta se promjena detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 734 nm.

ABTS<sup>+</sup> radikal se priprema miješanjem 7 mM ABTS otopljenoga u vodi s 2,45 mM amonijevim persulfatom ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (1 : 1). Pripremljenu otopinu ostavi se na sobnoj temperaturi 12 – 16h prije upotrebe u mraku. Treba se razviti plava boja. Otopina se potom razrijedi miješanjem ABST otopine i MetOH kako bi se dobila A 0,700 ± 0,02 na 734 nm. Otpipetira se 50 μM tesiranoga spoja i pomiješa s ABST otopinom u MetOH u istome volumnom omjeru. Standardni spojevi, Eskuletin i Trolox aplicirani su u istoj koncentraciji. Reakcijska smjesa se inkubirala u mraku kroz 30 i 60 min i apsorbance se izmjerila na 750 nm na mikročitaču (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA). Sva su mjerenja izvedena u triplikatu. Postotak inhibicije apsorbance na 750 nm izračunat je preko formule:

ABTS<sup>+</sup> učinak uklanjanja radikala

$$(\%) = 100 - ((A_s/A_b) \cdot 100)$$

gdje je A<sub>b</sub> apsorbancija ABTS radikala + metanol; a A<sub>s</sub> je apsorbancija ABTS radikala + testirani hibrid/standard.

#### 4.2.5. Određivanje NO Griessovim testom

Koncentracija nitrita kao mjera unutarstanične koncentracije NO-a mjerena je u supernatantu RAW 264.7 stanica.

Stanice u koncentraciji  $5 \times 10^5$  stanica/ml nasađene su na ploču s 24 jažice i inkubirane preko noći u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Stanice su potom tretirane 10 μM testnih hibridima ili Troloxom tijekom 2 h. Po isteku vremena inkubacije, na stanice se dodao lipopolisaharid (LPS) (1 μg/ml) kojim su stanice kontinuirano stimulirane kroz 24 h. Nakon 24 sata stanični supernatant pomiješao se 1:1 s Griessovim reagensom (1 % sulfanilamid u 5 % fosfornoj kiselini, i 0.1 % naftiletilenedamid) otopljenim u vodi. Mješavina je inkubirana 15 min u mraku prije mjerenja te je apsorbancija očitana na ELISA čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na 515 nm. Slijepa proba bila je Griessov reagens i deH<sub>2</sub>O u omjeru 1 : 1. Koncentracija nitrita (μM) izračunata je pomoću NaNO<sub>2</sub> standardne krivulje.

#### 4.2.6. Određivanje lipidne peroksidacije TBARS testom

Metoda se temelji na mjerenju koncentracije reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline (TBARS *eng* – *Thiobarbituric acid reactive substances*), uglavnom MDA. RAW 264.7 stanice u koncentraciji od  $5 \times 10^5$  stanica/ml nasađene su na ploču s 24 jažice i inkubirane preko noći u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Stanice su tretirane s 10 μM testnih hibrida ili Troloxom tijekom 2h. Po isteku inkubacije na stanice se dodao LPS (1 μg/ml). Stanični supernatant je pokupljen nakon 24 h stimulacije s LPS-om te pomiješan u omjeru 1 : 2 s 30 % trikloroocetnom kiselinom (TCA) i centrifugiran na 3500xg 10 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je pomiješan s otopinom tiobarbiturne kiseline (TBA) (1 : 1). Pomiješane otopine zagrijavane su 30 min na 95 °C. Tijekom zagrijavanja kisele reakcijske smjese lipidni peroksidi se raspadaju te nastali MDA reagira s TBA. Kao posljedica te reakcije nastaje crveno obojenje. Nakon inkubacije se reakcijska smjesa hladila 15 min. Apsorbancija kompleksa TBA-MDA određena je spektrofotometrijski na 532 nm UV/VIS spektrofotometrom (Lambda 25 UV/VIS, PerkinElmer, USA). Količina TBARS-a, odnosno MDA, izračunala se pomoću jednadžbe pravca standardnoga dijagrama pripremljenog s 1,1,3,3- tetrametoksipropanom kao standardom te su TBARS vrijednosti izražene kao μM malondialdehid (MDA) ekvivalenta.

#### 4.2.7. Statistička obrada podataka

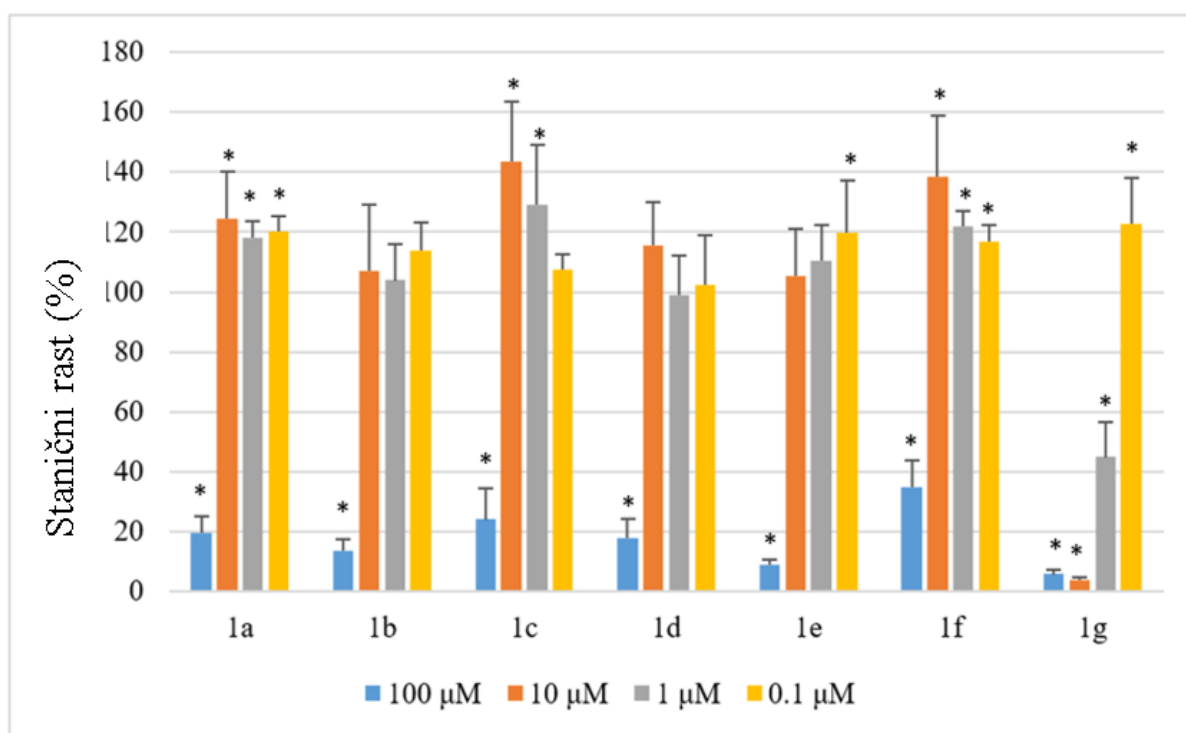
Svi prikazani biološki eksperimenti obavljani su u triplicatu. Normalnost raspodjele podataka dobivenih testovima citotoksičnosti određena je Kolmogorov-Smirnov testom. Primijenio se neparametrijski test Mann-Whitney uza statističku značajnost  $p < 0.05$ . Statistička analiza podataka obavljena je pomoću statističkoga programa XLStat za Windows operativne sustave. Statističke razlike među svim skupinama podataka u eksperimentima određene su koristeći jednosmjernu analizu varijance (ANOVA) parnom usporedbom s Dunnet (dvosmjernom) analizom. Sve analize su provedene koristeći 95 %-ni interval pouzdanosti ( $\alpha = 0,05$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Određivanje citotoksičnoga učinka kinolinsko-arilamidinskih hibrida na kulturu RAW 264.7 stanica MTT testom

Antiproliferativni učinak testiranih hibrida (1a – 1g) ispitan je na adherentim stanicama mišjih makrofaga RAW 264.7. Rezultati su prikazani na Slici 7. Testirani hibridi djelovali su inhibicijski na rast RAW 264.7 stanica pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$ . Pri toj koncentraciji svi hibridi su inhibirali rast RAW 264.7 stanica za više od 60 %. Pri koncentracijama od 10 i 1  $\mu\text{M}$  jedino je hibrid 1g djelovao značajno inhibicijski na rast stanica, inhibirajući rast u potpunosti pri koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$ , te 55 % pri koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ .

Ostali hibridi (1a – 1f) su pri koncentracijama 10 i 1  $\mu\text{M}$  djelovali blago ili značajno proliferacijski na rast stanica, dok su pri najmanjoj primijenjenoj koncentraciji od 0.1  $\mu\text{M}$  svi hibridi djelovali stimulatивно na proliferaciju stanica.

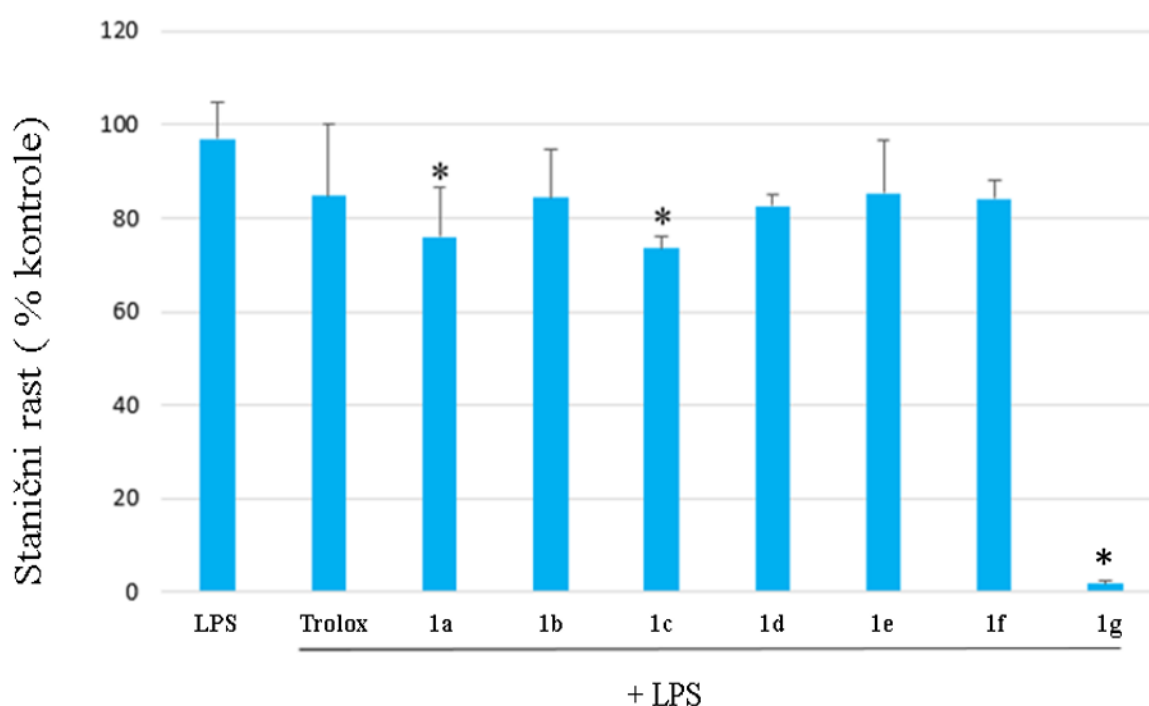


**Slika 7.** Citotoksični učinak kinolinsko-arilamidinskih hibrida na rast RAW 264.7 stanica mišjih makrofaga nakon inkubacije 72 h. Ispitivana stanična linija izložena je djelovanju hibrida kroz 72 h pri koncentracijama 0,1, 1, 10 i 100  $\mu\text{M}$ . Citotoksičnost je određena MTT testom u tri vremenski nezavisna ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je  $p < 0,05(*)$  u odnosu na kontrolne netretirane stanice.



## 5.2. Određivanje citotoksičnoga učinka kinolinsko-arilamidinskih hibrida i standarda Troloxa na kulturu RAW 264.7 stanica stimuliranu LPS-om MTT testom

MTT testom ispitan je učinak hibrida (1a – 1g) te standarda Troloxa kao referentnoga spoja na rast RAW 264.7 stanica pri koncentraciji od 10  $\mu$ M. Kako je vidljivo iz Slike 8., stimulacija s lipopolisaharidom iz E.coli u koncentraciji od 1  $\mu$ g/mL tijekom 24h u prisutnosti hibrida 1b, 1d, 1e, 1f i Troloxa nije dovela do značajna antiproliferativnoga učinka na rast RAW 264.7 stanica te je stanični rast održan iznad 80 %. Hibridi 1a i 1c doveli su do blaga, ali statistički značajna antiproliferativnoga djelovanja od 25 % na rast LPS-om stimulirane kulture RAW 264.7 stanica. Uočljiv je izrazit antiproliferativni učinak hibrida 1g koji je u potpunosti inhibirao rast LPS-om stimuliranih RAW 264.7 stanica te je na temelju toga isključen iz daljnjih pokusa.



**Slika 8.** Citotoksični učinak kinolinsko-arilamidinskih hibrida (1a – 1g) i standarda Troloxa na rast LPS-om stimuliranih RAW 264.7 stanica mišjih makrofaga. Ispitivana stanična linija predinkubirana je hibridima 2h pri koncentraciji 10  $\mu$ M te stimulirana 1  $\mu$ g/mL LPS-om kroz 24 h. Citotoksičnost je određena MTT testom u tri vremenski nezavisna ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je  $p < 0,05$ (\*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

### 5.3. Određivanje antioksidativnoga kapaciteta kinolinsko-arilamidinskih hibrida ABTS metodom

ABTS metoda određivanja antioksidativnoga kapaciteta često je korištena metoda koja ispituje sposobnost spojeva prema uklanjanju stabilnoga radikal kationa ABTS<sup>+</sup> (132). Kako je vidljivo u Tablici 2, testirani hibridi pokazali su zanemariv učinak uklanjanja radikala (0,2 – 14,2) u usporedbi s referentnim spojevima Troloxom i Eskuletinom.

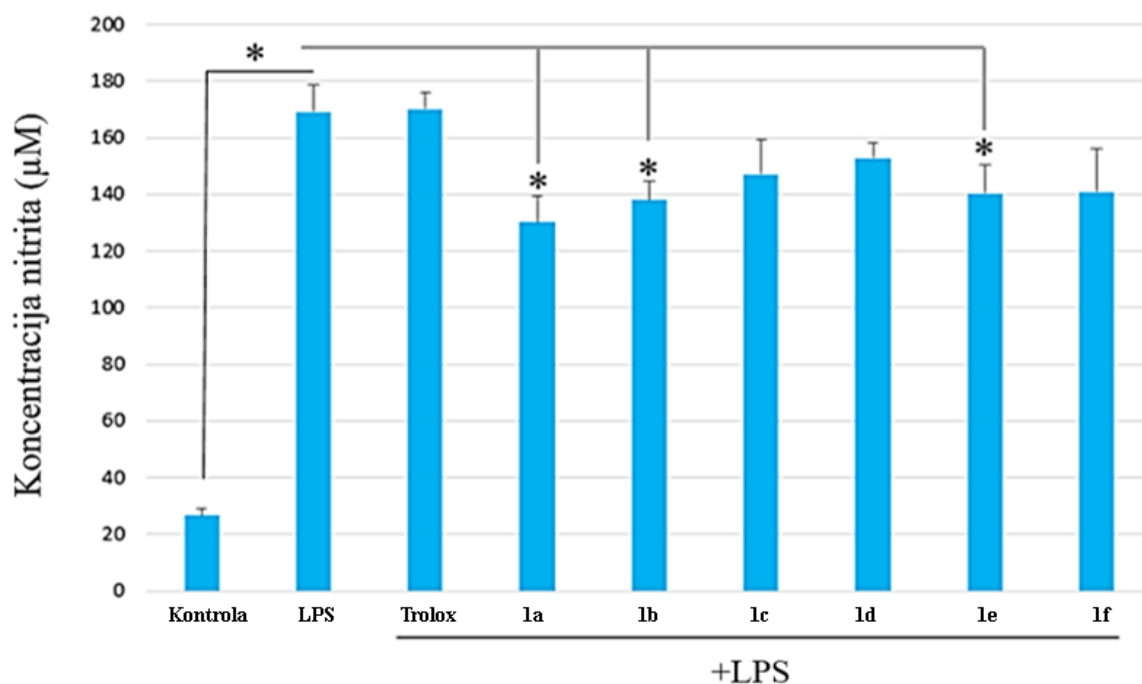
**Tablica 2.** Učinak hibrida 1a – 1f i standarda Troloxa i Eskuletina na uklanjanje (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin6-sulfonat) radikal kationa (ABTS<sup>+</sup>), izraženo kao srednja vrijednost triju ponavljanja (n = 3) ± SD nakon inkubacije od 60 minuta

Hibrid	1a	1b	1c	1d	1e	1f	Trolox	Eskuletin
	14,0	0,2	3,7	0,2	0,6	1,4	91,5	91,4
	± 2,2	± 0,1	± 0,3	± 0,1	± 0,1	± 0,2	± 2,0	± 1,5

### 5.4. Učinak kinolinsko-arilamidinskih hibrida na stvaranje dušikova oksida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 stanicama *in vitro*

Griessov test je metoda mjerenja količine dušikova oksida u tekućim otopinama nakon njegova pretvaranja u nitrit (133).

Kao što je vidljivo na Slici 9., stimulacija RAW 264.7 stanica s 1µg/mL LPS-om statistički je značajno povisila razine dušikova oksida (169,2 ± 9,4 µM) za više od šest puta u odnosu na kontrolne, nestimulirane stanice (26,7 ± 2,4 µM). Nadalje, hibridi 1a, 1b i 1e aplicirani u koncentraciji od 10 µM statistički su značajno inhibirali stvaranje dušikova oksida u LPS-om stimuliranim stanicama u odnosu na LPS-om stimulirane kontrolne stanice te je najveći učinak imao hibrid 1a, inhibiravši stvaranje dušikova oksida za oko 25 %. Hibridi 1c, 1d i 1f, kao i Trolox, nisu pokazali učinak na inhibiciju stvaranja dušikova oksida pri ispitivanoj koncentraciji.

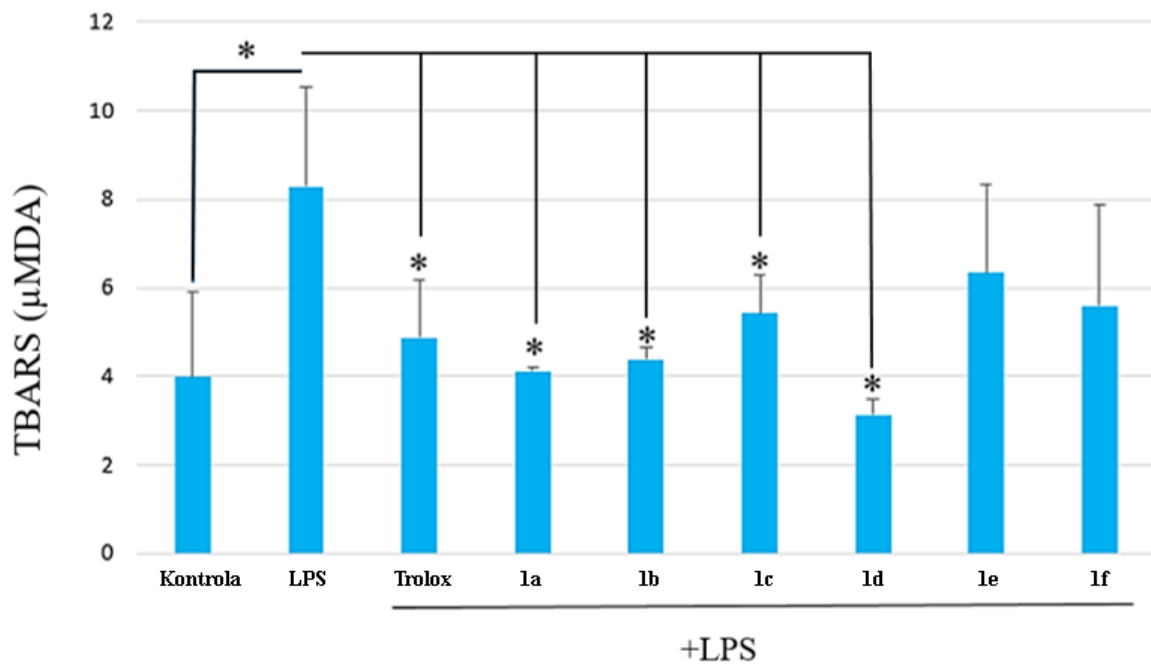


**Slika 9.** Učinak hibridnih spojeva na stvaranje dušikova oksida u LPS-om stimuliranim RAW stanicama. Stanice su preinkubirane s testiranim hibridima i Troloxom u koncentraciji od 10 µM tijekom 2h i onda kontinuirano stimulirane s 1µg/mL LPS-om tijekom 24 h. Kontrola: netretirane i nestimulirane stanice. LPS: stanice stimulirane LPS-om tijekom 24 h. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± SD. One-way ANOVA s Dunnett analizom ( $\alpha < 0.05$ ) korištena je kako bi se odredile razlike između LPS-om stimuliranih kontrolnih stanica i stanica tretiranih hibridima u prisutnosti LPS-a

### 5.5. Učinak kinolinsko-arilamidinskih hibrida na stvaranje malondialdehida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 stanicama *in vitro*

TBARS test je često korišten test mjerenja lipidne peroksidacije u tekućini preko količine malondialdehida koji reagira s tiobarbituratnom kiselinom kako bi proizveo ružičasti adukt koji se mjeri spektrofotometrijski (134). Kako je prikazano na Slici 10., stimulacija LPS-om povisila je razine malondialdehida za više nego dvostruko ( $8,3 \pm 2,2$ ) u odnosu na kontrolne, nestimulirane stanice ( $4,0 \pm 1,9$ ). Predinkubacija hibridima 1a – 1d tijekom 2 h pri koncentraciji od 10 µM dovela je do statistički značajne inhibicije stvaranja MDA u odnosu na LPS-om stimulirane kontrolne stanice. Hibrid 1c inihibirao je stvaranje MDA za 35 %, dok su hibridi 1a i 1b inihibirali stvaranje MDA za oko 50 % te tako spustili razine MDA na razine kontrolnih,

nestimuliranih stanica. Hibrid 1d imao je najjači inhibicijski učinak na stvaranje MDA te je inhibirao njegovo stvaranje za 63 % u odnosu na RAW stanice stimulirane LPS-om.



**Slika 10.** Učinak hibridnih spojeva na TBARS razine izražene kao količina MDA u LPS-om stimuliranim RAW stanicama. Stanice su preinkubirane testiranim hibridima i Troloxom u koncentraciji od 10 µM tijekom 2h i onda kontinuirano stimulirane s 1 µg/mL LPS-om tijekom 24 h. Kontrola: netretirane i nestimulirane stanice. LPS: stanice stimulirane LPS-om tijekom 24 h. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± SD. One-way ANOVA s Dunnett analizom ( $\alpha < 0,05$ ) korištena je kako bi se odredile razlike između LPS-om stimuliranih kontrolnih stanica i stanica tretiranih hibridima u prisutnosti LPS-a

## 6. RASPRAVA

Jedno od najvažnijih medicinskih otkrića u posljednjih 20 godina je da su upalni procesi prisutni kod velika broja mentalnih i fizičkih oboljenja čovjeka (16). Kronične upalne bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, rak i dijabetes, danas su vodeći uzrok smrtnosti u svijetu i odgovorne su za oko 60 % svih smrti (37). Brojna istraživanja na animalnim modelima i ljudima upućuju na usku povezanost upale s oksidativnim/nitrozativnim stresom i smatra se kako akumulirane reaktivne kisikove/dušikove vrste mogu djelovati kao primarni ili sekundarni patofiziološki okidači brojnih kroničnih bolesti (70, 135). Sučelje toga procesa čine makrofagi koji nakon proupalne stimulacije generiraju veliku količinu tih reaktivnih vrsta koji dovode do staničnoga oštećenja te generiranja mutagenih i toksičnih produkata (136). Stoga terapijske intervencije usmjerene k makrofagima i njihovim produktima predstavljaju vijabilnu strategiju kontrole upalnih bolesti (137). Shvaćanje da je upala kao temelj kroničnih bolesti multifaktorijalna osnova je za potpuno nove pristupe u dizajnu lijekova i liječenju. Jedan od novijih pristupa u stvaranju novih lijekova je dizajn hibridnih molekula koje nastaju povezivanjem dvaju ili više kemijskih spojeva ili farmakofora molekularnom poveznicom, pa tako imaju sposobnost djelovati na više mjesta istovremeno, djelovati na različite stanične molekule i modulirati više razina upalne kaskade te kronicitet upalnoga odgovora (46, 138).

Dušične heterociklične molekule osnova su brojnih lijekova zbog izraženih bioloških svojstava, a pokazano je i da konjugirane molekule koje sadržavaju dušik stabiliziraju slobodne radikale (125, 139). Dokazano je kako su amidin i njegovi derivati biološki aktivni i da mogu djelovati antidegenerativno, antimikrobno, protutumorski i protuupalno, a pokazani su i kao visoko selektivni inhibitori sintaze dušikova oksida (122, 140). Klorokinski analozi, uz to što su spasili brojne živote kao antimalarični lijekovi, pokazali su se izuzetno korisnima u liječenju brojnih upalnih bolesti poput reumatoidnoga artritisa, SLE i raka (141). Budući da kinolinska okosnica ima velik biološki potencijal, osnova je za razvoj novih hibridnih molekula (142).

U ovome su radu ispitani antioksidativni kapacitet i protuupalni učinci molekularnih hibrida 7-klorokinolina i arilamidina na mišjim makrofagima, nedavno opisanih u radu Krstulovića i sur. gdje su pokazali protutumorsku selektivnost na leukemijske stanice (143). S obzirom na to da je kronična upala uključena u neoplastičnu transformaciju i stimulaciju tumorskoga rasta te se procjenjuje da oko 25 % tumora ima upalnu podlogu koja je prepoznata kao značajno obilježje malignoga procesa (8, 37, 144), bilo je opravdano istražiti moguće protuupalne učinke ovih spojeva.

U ovome je radu MTT testom pokazano kako svi ispitivani hibridi, osim hibrida 1g, nisu značajno toksični u koncentraciji 10  $\mu$ M pa je iz toga razloga ova koncentracija korištena za istraživanja protuupalne učinkovitosti.

Brojnim je studijama na RAW 264.7 stanicama dokazano da njihova stimulacija LPS-om dovodi do genskoga izražaja inducibilnoga oblika sintaze dušikova oksida te sinteze i otpuštanja NO-a (145). Količina tako stvorenoga NO-a premašuje njegove fiziološke koncentracije, djeluje proupalno i dovodi do stvaranja peroksinitrita koji posreduje štetne učinke dušikova oksida kao što su oštećenje DNK, lipidna peroksidacija, inhibicija mitohondrijske respiracije te isto tako ciljajući enzime i signalne molekule ključne za život stanice (72, 146).

U uvjetima ovoga istraživanja stimulacija LPS-om stanične linije makrofaga šest je puta povećala stvaranje NO-a u odnosu na kontrolne neinducirane stanice. Testirani molekularni hibridi 7-kinolina i arilamidina 1a, 1b i 1e u 10  $\mu$ M koncentraciji postigli su statistički značajnu inhibiciju stvaranja NO-a u stimuliranim stanicama (20 – 25 %) (Slika 9.). Dobiveni rezultat može se povezati s rezultatima prethodno objavljenih studija u kojima je pokazano da je amidinska struktura, formamidin, sposobna selektivno inhibirati iNOS i stvaranje NO-a (147), kao i da je amidinski derivat N-(3-(aminometil)benzil)acetamidin (1400w) ireverzibilni, visoko selektivni inhibitor humane iNOS (5000 i 2000 x selektivniji za iNOS u odnosu na eNOS i nNOS) (140). Nadalje, studija Thanga i sur. pokazala je kako se inhibicija stvaranja NO-a prilikom inkubacije amidinskih spojeva s iNOS-om smanjivala povećanjem veličine alkilnoga supstituenta amidinske skupine (148), što je vidljivo i u ovome radu na primjeru derivata 1c i 1d koji su imali glomaznije amidinske skupine i najslabije inhibirali NO, što ukazuje da se steričke smetnje s okolnim ostacima povećavaju povećanjem veličine supstituenta na amidinskoj skupini.

Nadalje, pokazano je i da klorokin značajno može inhibirati stvaranje NO-a preko blokiranja indukcije iNOS-a u mišjim peritonealnim makrofagima stimuliranih IFN- $\gamma$  i štakorskim makrofagima pri koncentracijama 50 – 100  $\mu$ M bez toksičnih učinaka (149) te u parakvatom induciranoj plućnoj ozljedi u miša (150). Njegov analog hidroksiklorokin značajno je inhibirao LPS-om aktiviranu produkciju proupalnih citokina IL1 $\beta$ , IL-6 i TNF $\alpha$  te ROS u RAW 264.7 stanicama, pri konc. od 10  $\mu$ M s najjačim učinkom pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 20  $\mu$ M, ipak bez testiranoga utjecaja na vijabilnost (151).

Također, i drugi istraživani 7-klorokinolinski spojevi pokazali su zapažen protuupalni učinak. U studiji Saraiva i sur. 7-klorokinolinski derivati s triazol karboksilatnom skupinom značajno su inhibirali stvaranje NO-a pri rasponu koncentracija 50 – 500  $\mu$ M te lipidnu peroksidaciju induciranu natrijevim nitroprusidom( SNP – eng. – *sodium nitroprusside* ) u štakorskoj jetri, no nisu pokazali antioksidativno djelovanje (152), što je dokazano i u ovome radu na testiranim kinolinsko-arilamidinskim hibridima (Tablica 2., Slike 9. i 10.).

Membranski lipidi su ciljna mjesta raznih reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta što rezultira lipidnom peroksidacijom koja oštećuje integritet, funkciju i permeabilnost membrana i generira potencijalno toksične sekundarne metabolite kao što je MDA (103). MDA je široko korišten kao pouzdan biomarker lipidne peroksidacije čije su povišene razine povezane s brojnim patološkim stanjima (106). Smatra se najmutagenijim sekundarnim produktom lipidne peroksidacije s visokim kapacitetom reakcije i s ključnim biomolekulama kao što su glutation, DNK i strukturalni i funkcionalni proteini, uzrokujući oštećenje njihove funkcije i konačnu disfunkciju stanice (106, 153).

U ovome radu stimulacija LPS-om povisila je razine MDA u TBARS testu za više nego dvostruko u odnosu na nestimulirane stanice. Testirani 10  $\mu$ M hibridi 1a, 1b, 1c i 2d statistički su značajno inhibirali akumuliranje MDA i u potpunosti spustili koncentraciju toga reaktivnog aldehida na vrijednosti kontrolnih, nestimuliranih stanica.

Rezultati dobiveni ABTS testom pokazali su da testirani derivati pokazuju zanemarivu *in vitro* sposobnost uklanjanja slobodnih radikala (0,2 – 14,2) u usporebi s Troloxom (91,5) i eskuletinom (91,4), što ukazuje na to da ne djeluju kao antioksidansi. Rezultati ABTS testa amidino supstituiranih benzotiazola i benzoimidazola pokazali su da jak utjecaj na sposobnost uklanjanja radikala ima tip amidinske skupine vezan na heteroaromatski kostur, pa su tako spojevi s nesuspstituiranom amidinskom skupinom (kao hibrid 1a) imali jaču aktivnost od spojeva s imidazolskim supstituentom na amidinskoj skupini (kao hibrid 1e). Dodatno, broj hidroksilnih skupina vezanih na fenolni prsten također je utjecao na antioksidativnu aktivnost, na način da veći broj takvih skupina povećava sposobnost uklanjanja radikala (154).

Prethodno navedeni rezultati brojnih studija jasno upućuju na velik protuupalni i antioksidativni potencijal spojeva sa 7-klorokinolinskom i amidinskom skupinom te opravdavaju strategiju povezivanja tih dvaju farmakološki aktivnih farmakofora u jedinstvenoj hibridnoj molekuli. Smatra se kako spojevi koji posjeduju antioksidativno i protuupalno

djelovanje mogu biti obećavajući ključ uspješna liječenja upalnih bolesti (155). Gore navedene studije, kao i pokusi u ovome radu, jasno upućuju na protuupalni i antioksidativni potencijal spojeva sa 7-klorokinolinskom i amidinskom skupinom. Ovdje treba naglasiti potrebu daljnjih *in vitro* i *in vivo* pokusa za otkrivanjem mehanizma djelovanja testiranih kinolinsko-arilamidinskih hibrida te ispitati djeluju li učinkovito na više mjesta i razina upalnoga procesa sinergističkim učinkom, što bi trebala biti prednost hibridnih molekula (46, 138).



## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti kako molekularni hibridi sa 7-klorokinolinom i arilamidinom, povezani s fleksibilnom 2-aminoetanolskom poveznicom:

1. Ne djeluju antioksidativno
2. Inhibiraju stvaranje dušikova oksida u LPS-om stimuliranim RAW264.7 makrofagima
3. Značajno inihibiraju lipidnu peroksidaciju u LPS-om stimuliranim RAW264.7 makrofagima.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Kronične upalne bolesti predstavljaju stalno medicinsko, socijalno i ekonomsko opterećenje, a njihova farmakoterapija i dalje je nerazriješen problem. Proupalno stimulirani makrofagi generiraju velike količine reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta koje induciraju oksidativni stres i oštećenje tkiva. Medicinski potencijal klorokinških analoga povećava se, između ostaloga, zbog njihovih potentnih protuupalnih učinaka. Budući da kinolinska okosnica ima velik potencijal za razvoj novih lijekova, nov obećavajući pristup baziran je na sintezi hibridnih spojeva koji djeluju na više ciljeva zasebnim mehanizmima.

**Cilj istraživanja:** Ispitati protuupalnu aktivnost kinolinsko-arilamidinskih hibrida u LPS induciranoj RAW264.7 kulturi mišjih makrofaga određivanjem antioksidativnoga kapaciteta hibrida, te količine dušikova oksida i malonilaldehida.

**Materijali i metode:** MTT test je korišten kako bi se istražio utjecaj sedam kinolinsko-arilamidinskih hibrida na rast mišje makrofagne stanične linije RAW 264.7 u nestimuliranim uvjetima te nakon proupalne stimulacije lipopolisaharidom (LPS) *E.coli*. Koncentracije dušikova oksida (NO) i malondialdehida (MDA) određene su spektrofotometrijskim metodama. Antioksidativni kapacitet određen je (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ABTS metodom.

**Rezultati:** Testirani hibridi različito su utjecali na proliferaciju nestimuliranih i LPS-om stimuliranih stanica. Hibridi ne djeluju na uklanjanje radikala u ABTS testu. U LPS-om stimuliranim stanicama umjereno su inhibirali stvaranje NO-a, te značajno snizili razine malondialdehida u TBARS testu pri koncentraciji od 10  $\mu$ M.

**Zaključak:** Hibridi 7-klorokinolina i arilamidina povezanih 2-aminoetanolskom poveznicom mogu djelovati protuupalno inhibicijom stvaranja NO-a i MDA u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 stanicama.

**Ključne riječi:** hibridne molekule, 7-klorokinolin, aromatski amidin, protuupalno djelovanje *in vitro*

## 9. SUMMARY

### **Evaluation of Antiinflammatory efficacy of Quinoline-Arylamidine Hybrids *in vitro***

**Introduction:** Chronic inflammatory diseases represent constant medical, social, and economic burden, and their pharmacotherapy is still an unresolved issue. Proinflammatory stimulated macrophages generate high levels of reactive oxygen and nitrogen species that induce oxydative/nitrosative stress and tissue damage. Medical potential of chloroquine analogues is increased, among other things, due to their potent anti-inflammatory effects. Since the quinoline skeleton has great potential for the development of new drugs, a new promising approach is based on the synthesis of hybrid compounds that act on multiple targets by distinct mechanisms.

**Research objectives:** To investigate the anti-inflammatory activity of quinoline-arylamidine hybrids in murine macrophage RAW264.7 cell line by determining the antioxidant capacity of hybrids, and the amount of nitric oxide and malonyldehyde.

**Materials and methods:** The MTT assay was used to investigate the effect of seven quinoline-arylamidine hybrids on the growth of the murine macrophage cell line RAW 264.7 under unstimulated conditions and after proinflammatory stimulation with *E. coli* lipopolysaccharide (LPS). Nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) levels were determined by spectrophotometric methods. Antioxidant capacity of tested compounds was tested by 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method.

**Results:** Tested hybrid compounds differentially influenced proliferation of non-stimulated and LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The hybrid compounds have not presented ABTS radical-scavenger activity. In the LPS-stimulated RAW 264.7 cells 10  $\mu$ M compounds slightly decreased production of NO and significantly modulated malondialdehyde levels in TBARS test.

**Conclusion:** Molecular hybrids of 7-chloroquinoline and arylamidine moieties joined through 2-aminoethanol linker may express anti-inflammatory activity by modulating the production of NO and MDA in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

**Keywords:** Hybrid molecules, 7-Chloroquinoline, Aromatic amidine, Anti-inflammatory activity *in vitro*

## 10. LITERATURA

1. Hotamisligil G. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017; 542:177–185.
2. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar SS, i sur. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5276130.
3. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis EJ i sur. A guiding map for inflammation. *Nat Immunol* 2017;18: 826–831.
4. Munn LL. Cancer and inflammation. *WIREs Syst Biol Med*.2017;9(2):1370.
5. Iqbal AJ, Fisher EA, Greaves DR. Inflammation-a Critical Appreciation of the Role of Myeloid Cells. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5):10.
6. Agita A, Alsagaff MT. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Acta Med Indones*. 2017;49(2):158-165.
7. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*. 2015;107(3):331-339.
8. Korniluk A, Koper O, Kemonah H, Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Ir J Med Sci*. 2017;186(1):57-62.
9. Filippi MD. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol*. 2016;129:25-53.
10. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J i sur. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9(6):7204-7218.
11. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018;1803:57-79.
12. Schrödl W, Büchler R, Wendler S, Reinhold P, Muckova P, Reindl J i sur. Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10(11):1077-1092.

13. Varela ML, Mogildea M, Moreno I, Lopes A.. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation* 2018;41:1115–1127.
14. Murphy EP, Crean D. Molecular Interactions between NR4A Orphan Nuclear Receptors and NF- $\kappa$ B Are Required for Appropriate Inflammatory Responses and Immune Cell Homeostasis. *Biomolecules*. 2015;5(3):1302-1318.
15. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?. *Front Immunol*. 2016;7:160.
16. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C. i sur. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med*. 2019;25(12):1822-1832.
17. Meirou Y, Baniyash M. Immune biomarkers for chronic inflammation related complications in non-cancerous and cancerous diseases. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(8):1089-1101.
18. Proctor MJ, McMillan DC, Horgan PG, Fletcher CD, Talwar D, Morrison DS. Systemic inflammation predicts all-cause mortality: a glasgow inflammation outcome study. *PLoS One*. 2015;10(3):e0116206.
19. Arai Y, Martin-Ruiz CM, Takayama M, Abe Y, Takebayashi T, Koyasu S, i sur. Inflammation, But Not Telomere Length, Predicts Successful Ageing at Extreme Old Age: A Longitudinal Study of Semi-supercentenarians. *EBioMedicine*. 2015;2(10):1549-1558.
20. Khosla S, Farr JN, Tchkonja T, Kirkland JL. The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(5):263-275.
21. Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*. 2015;160(5):816-827.
22. Watson N, Ding B, Zhu X, Frisina RD. Chronic inflammation - inflammaging - in the ageing cochlea: A novel target for future presbycusis therapy. *Ageing Res Rev*. 2017;40:142-148.
23. Minciullo PL, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crucitti A, Maltese G. i sur. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(2):111-126.

24. LeBrasseur NK, Tchkonina T, Kirkland JL. Cellular Senescence and the Biology of Aging, Disease, and Frailty. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2015;83:11-18.
25. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018;217(1):65-77.
26. Kim DH, Bang E, Jung HJ, Noh SG, Yu BP, Choi YJ, i sur. Anti-aging Effects of Calorie Restriction (CR) and CR Mimetics based on the Senoinflammation Concept. *Nutrients.* 2020;12(2):422.
27. Brodin P, Jovic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJ, Furman D, i sur. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell.* 2015;160(1-2):37-47.
28. Niedzwiecki MM, Walker DI, Vermeulen R, Chadeau-Hyam M, Jones DP, Miller GW. The Exposome: Molecules to Populations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019;59:107-127.
29. Olvera Alvarez HA, Kubzansky LD, Campen MJ, Slavich GM. Early life stress, air pollution, inflammation, and disease: An integrative review and immunologic model of social-environmental adversity and lifespan health. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018;92:226-242.
30. Renz H, Holt PG, Inouye M, Logan AC, Prescott SL, Sly PD. An exposome perspective: Early-life events and immune development in a changing world. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(1):24-40.
31. Rook G, Bäckhed F, Levin BR, McFall-Ngai MJ, McLean AR. Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *Lancet.* 2017;390(10093):521-530.
32. McDade TW, Rutherford J, Adair L, Kuzawa CW. Early origins of inflammation: microbial exposures in infancy predict lower levels of C-reactive protein in adulthood. *Proc Biol Sci.* 2010;277(1684):1129-1137.
33. Le Belle JE, Sperry J, Ngo A, Ghochani Y, Laks DR, López-Aranda M, i sur. Maternal inflammation contributes to brain overgrowth and autism-associated behaviors through altered redox signaling in stem and progenitor cells. *Stem Cell Reports.* 2014;3(5):725-734.

34. Macpherson A, de Agüero M, Ganal-Vonarburg S. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nat Rev Immunol* 2017;17: 508–517.
35. Singer K, Lumeng CN. The initiation of metabolic inflammation in childhood obesity. *J Clin Invest.* 2017;127(1):65-73.
36. Gupta SC, Kunnumakkara AB, Aggarwal S, Aggarwal BB. Inflammation, a Double-Edge Sword for Cancer and Other Age-Related Diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2160.
37. Kunnumakkara AB, Sailo BL, Banik K, Harsha C., Prasad S, Gupta S, i sur. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? *Journal of Translational Medicine.* 2018;16(1).
38. Dhingra AK, Chopra B, Dua JS, Prasad DN. Therapeutic Potential of N-heterocyclic Analogs as Anti-inflammatory Agents. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2017;16(3):136-152.
39. Potrošnja lijekova u Hrvatskoj 2014. – 2018. HALMED. Dostupno na adresi: <https://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Novosti/2020/HALMED-objavio-publikaciju-Potrosnja-lijekova-u-Hrvatskoj-od-2014-do-2018-godine/2290>. Datum pristupa 20.8.2020.
40. Pereira-Leite C, Nunes C, Jamal SK, Cuccovia IM, Reis S. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Therapy: A Journey Toward Safety. *Med Res Rev.* 2017;37(4):802-859.
41. Thomas K, Moody TW, Jensen RT, Tong J, Rayner CL, Barnett NL, i sur. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid nitroxide-based non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem.* 2018;147:34-47.
42. Mohsin, NU, Ahmad M. Hybrid organic molecules as antiinflammatory agents; a review of structural features and biological activity. *Turkish Journal of Chemistry,* 2018;42:1-20.
43. Bally M, Dendukuri N, Rich B, Nadeau N, Helin-Salmivaara A, Garbe E, i sur. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data. *BMJ.* 2017;357:1909.

44. Rane MA, Foster JG, Wood SK, Hebert PR, Hennekens CH. Benefits and Risks of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Methodologic Limitations Lead to Clinical Uncertainties. *Ther Innov Regul Sci.* 2019;53(4):502-505.
45. de Oliveira Pedrosa M, Duarte da Cruz RM, de Oliveira Viana J, de Moura RO, Ishiki HM, Barbosa Filho JM, i sur. Hybrid Compounds as Direct Multitarget Ligands: A Review. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(9):1044-1079.
46. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res.* 2001 ;44(6):437-50.
47. Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, i sur. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders?. *J Immunol Res.* 2018;2018:8917804.
48. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, i sur. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-6440.
49. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(12):731-744.
50. Watanabe S, Alexander M, Misharin AV, Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 2019;129(7):2619-2628.
51. Nielsen SR, Schmid MC. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9624760.
52. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 2016;44(3):450-462.
53. Bashir S, Sharma Y, Elahi A, Khan F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm. Res.* 2016;65:1–11 .
54. Wang Y, Smith W, Hao D, He B, Kong L. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *Int Immunopharmacol.* 2019;70:459-466.



55. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018;223(4-5):383-396.
56. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1801.
57. Geeraerts X, Bolli E, Fendt SM, Van Ginderachter JA. Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. *Front Immunol*. 2017;8:289.
58. Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Orekhov AN. Macrophages and Their Contribution to the Development of Atherosclerosis. *Results Probl Cell Differ*. 2017;62:273-298.
59. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity*. 2017;47(4):621-634.
60. Thomas D, Apovian C. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. *Metabolism*. 2017;72:120-143.
61. Appari M, Channon KM, McNeill E. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(3):297-312.
62. Eguchi K, Nagai R. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *J Clin Invest*. 2017;127(1):14-23.
63. Ngambenjawong C, Gustafson HH, Pun SH. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;114:206-221.
64. Zheng X, Turkowski K, Mora J, Brüne B, Seeger W, Weigert A, i sur. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget*. 2017;8(29):48436-48452.
65. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006;66(2):605-612.
66. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, i sur. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(6):595-637.

67. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.
68. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6501046.
69. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J.* 2016;15(1):71.
70. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7432797.
71. Hardy M, Zielonka J, Karoui H, Sikora A, Michalski R, Podsiadły R, i sur. Detection and Characterization of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Biological Systems by Monitoring Species-Specific Products. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(15):1416-1432.
72. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603–1616.
73. Ahmad W, Ijaz B, Shabbiri K, Ahmed F, Rehman S. Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/ RNS generation. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):76.
74. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, i sur. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763.
75. Moldogazieva NT, Mokhosev IM, Mel'nikova TI, Zavadskiy SP, Kuz'menko AN, Terentiev AA. Dual Character of Reactive Oxygen, Nitrogen, and Halogen Species: Endogenous Sources, Interconversions and Neutralization. *Biochemistry (Mosc).* 2020;85(1):56-78.
76. Moldogazieva NT, Mokhosev IM, Feldman NB, Lutsenko SV. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radic Res.* 2018;52(5):507-543.

77. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9:1162.
78. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-126.
79. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74.
80. Yadav A, Kumari R, Yadav A, Mishra JP, Srivastava S, Prabha S. Antioxidants and its functions in human body - A Review. *Res Environ Life Sci* 2016; 9(11): 1328-1331.
81. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):532-553.
82. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem.* 2019;178:687-704.
83. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease *Journal of Clinical Pathology.* 2001;54:176-186.
84. Tailor N, Sharma M. Antioxidant hybrid compounds: a promising therapeutic intervention in oxidative stress induced diseases. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13(2):280-297.
85. Thomas DD, Heinecke JL, Ridnour LA, Cheng RY, Kesarwala AH, Switzer CH, i sur. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. *Free Radic Biol Med.* 2015;87:204-225.
86. Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* 2018;14:618-625.
87. Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, i sur. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:370-375.
88. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* 2020;40(1):158-189.

89. Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(6):711-717.
90. Ahmad R, Hussain A, Ahsan H. Peroxynitrite: cellular pathology and implications in autoimmunity. *J Immunoassay Immunochem*. 2019;40(2):123-138.
91. Islam BU, Habib S, Ahmad P, Allarakha S, Moinuddin, Ali A. Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(4):368-385.
92. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(23):5839-5848.
93. Batthyány C, Bartesaghi S, Mastrogiovanni M, Lima A, Demicheli V, Radi R. Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(7):313-328.
94. Monteiro HP, Rodrigues EG, Amorim Reis AKC, Longo LS, Ogata FT, Moretti AIS, i sur. Nitric oxide and interactions with reactive oxygen species in the development of melanoma, breast, and colon cancer: A redox signaling perspective. *Nitric Oxide*. 2019;89:1-13.
95. Liao w, Ye T, Liu H. Prognostic value of inducible nitric oxide synthase (inos) in human cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biomed res int*. 2019;2019:6304851.
96. Pan L, Yang S, Wang J, Xu M, Wang S, Yi H. Inducible nitric oxide synthase and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *BMC Immunol*. 2020;21(1):6.
97. Predonzani A, Cali B, Agnellini AH, Molon B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. *World J Exp Med*. 2015;5(2):64-76.
98. Lee CH, Kim HJ, Lee YS, Kang GM, Lim HS, Lee SH, i sur. Hypothalamic Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Obesity-Associated Hypothalamic Inflammation. *Cell Rep*. 2018;25(4):934-946.e5.

99. Garg N, Syngle A, Krishan P. Nitric Oxide: Link between Inflammation and Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *Int J Angiol.* 2017;26(3):165-169.
100. Łuczaj W, Gęgotek A, Skrzydlewska E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Rad Biol Med.* 2017;111:87-101.
101. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, i sur. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:5080843.
102. Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol.* 2019;23:101107.
103. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(3):419-425.
104. Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A, Cetrangolo GP, i sur. Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants (Basel).* 2018;7(8):102.
105. Zarkovic K, Jakovcevic A, Zarkovic N. Contribution of the HNE-immunohistochemistry to modern pathological concepts of major human diseases. *Free Radic Biol Med.* 2017;111:110-126.
106. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
107. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Graham LB, Parker CE, Ames BN, i sur. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl<sub>4</sub> poisoning. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(6):711-718.
108. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
109. Weismann D, Binder CJ. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(10):2465-2475.

110. Hyvärinen S, Uchida K, Varjosalo M, Jokela R, Jokiranta TS. Recognition of malondialdehyde-modified proteins by the C terminus of complement factor H is mediated via the polyanion binding site and impaired by mutations found in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Biol Chem*. 2014;289(7):4295–4306.
111. Busch CJ, Binder CJ. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(4):398-406.
112. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*. 2003;278(33):31426-31433.
113. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chem Phys Lipids*. 2019;221:46-52.
114. Rašić I, Rašić A, Akšamija G, Radović S. The relationship between serum level of malondialdehyde and progression of colorectal cancer. *Acta Clin Croat*. 2018;57(3):411-416.
115. Papac-Milicevic N, Busch CJ, Binder CJ. Malondialdehyde Epitopes as Targets of Immunity and the Implications for Atherosclerosis. *Adv Immunol*. 2016;131:1–59.
116. Fatima N, Faisal SM, Zubair S, Ajmal M, Siddqui SS, Moin S, i sur. Role of Pro-Inflammatory Cytokines and Biochemical Markers in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Correlation with Age and Glycemic Condition in Diabetic Human Subjects. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161548.
117. López-Riquelme N, Alom-Poveda J, Viciano-Morote N, Llinares-Ibor I, Tormo-Díaz C. Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 allele and malondialdehyde level are independent risk factors for Alzheimer's disease. *SAGE Open Med*. 2016;4:2050312115626731.
118. Arif M, Rashid A, Majeed A, Qaiser F, Razak S. Evaluation of correlation between expression of P53 and Malondialdehyde levels in prostate cancer patients. *J Pak Med Assoc*. 2018;68(9):1373-1377.
119. Majidi Z, Djalali M, Javanbakht MH, Fathi M, Zarei M, Foladsaz K. Evaluation of the Level of Zinc and Malondialdehyde in Basal Cell Carcinoma. *Iran J Public Health*. 2017;46(8):1104-1109.

120. Aly A, Brase S, Gomaa M. Amidines: Their synthesis, reactivity, and applications in heterocycle synthesis. *Arkivoc*. 2018(6):85-138.
121. Belskaya N, Demina M, Sapognikova S, Fan ZJ, Zhang HK, Dehaen W, Bakulev V. Synthesis and oxidative cyclization of 2-arylhydrazono-2-cyanoacetamides to 5-amino-2-aryl-2H-[1,2,3]triazole-4-carbonitrile. *Arkivoc*. 2008; 9-21.
122. Arya S, Kumar N, Roy P, Sondhi SM. Synthesis of amidine and bis amidine derivatives and their evaluation for anti-inflammatory and anticancer activity. *Eur J Med Chem*. 2013;59:7-14.
123. Sondhi SM, Rani R, Roy P, Agrawal SK, Saxena AK. Conventional and microwave assisted synthesis of small molecule based biologically active heterocyclic amidine derivatives. *Eur J Med Chem*. 2010;45(3):902-908.
124. Sondhi SM, Dinodia M, Kumar A. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2006;14(13):4657-4663.
125. Naik HR, Naik HS, Naik TR, Naika HR, Gouthamchandra K, Mahmood R, i sur. Synthesis of novel benzo[h]quinolines: wound healing, antibacterial, DNA binding and in vitro antioxidant activity. *Eur J Med Chem*. 2009;44(3):981-989.
126. Devaux CA, Rolain JM, Colson P, Raoult D. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19?. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;105938.
127. McKee DL, Sternberg A, Stange U, Laufer S, Naujokat C. Candidate drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19. *Pharmacol Res*. 2020;104859.
128. El-Azzouny AMAE, Aboul-Enein MN, Hamissa MF. Structural and biological survey of 7-chloro-4-(piperazin-1-yl)quinoline and its derivatives. *Drug Dev Res*. 2020;10.1002/ddr.21678.
129. Zhao M. Cytokine storm and immunomodulatory therapy in COVID-19: Role of chloroquine and anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;105982.

130. Tufan A, Avanoğlu Güler A, Matucci-Cerinic M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. *Turk J Med Sci.* 2020;50(1):620-632.
131. Shukla AM, Archibald LK, Wagle Shukla A, Mehta HJ, Cherabuddi K. Chloroquine and hydroxychloroquine in the context of COVID-19. *Drugs Context.* 2020;9:2020-4-5.
132. Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS(\*+) assay. *J Agric Food Chem.* 2004;52(15):4669-4674.
133. Schmölz L, Wallert M, Lorkowski S. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. *J Immunol Methods.* 2017;449:68-70.
134. Ghani MA, Barril C, Bedgood DR Jr, Prenzler PD. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem.* 2017;230:195-207.
135. Kruk J, Aboul-Enein HY, Kładna A, Jacquelyn EB. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. *Free Radical Research.* 2019;1–661.
136. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery.* 2009; 3(1):73–80.
137. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target - Inflammation & Allergy,*2005; 4(3):281–286.
138. Kaur G, Silakari O. Benzimidazole scaffold based hybrid molecules for various inflammatory targets: Synthesis and evaluation. *Bioorg Chem.* 2018;80:24-35.
139. Silva JP, Proença FM, Coutinho OP. Protective role of new nitrogen compounds on ROS/RNSmediated damage to PC12 cells. *Free Radical Research.* 2008; 42(1):57-69.



140. Zhu Y, Nikolic D, Van Breemen RB, Silverman RB. Mechanism of inactivation of inducible nitric oxide synthase by amidines. Irreversible enzyme inactivation without inactivator modification. *J Am Chem Soc.* 2005;127(3):858-868.
141. Plantone D, Koudriavtseva T. Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious, Immune, Neoplastic, and Neurological Diseases: A Mini-Review. *Clin Drug Investig.* 2018;38(8):653-671.
142. Senerovic L, Opsenica D, Moric I, Aleksic I, Spasić M, Vasiljevic B. Quinolines and Quinolones as Antibacterial, Antifungal, Anti-virulence, Antiviral and Anti-parasitic Agents. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1282:37-69.
143. Krstulović L, Stolić I, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Starčević K, Bajić M, i sur. New quinoline-arylamidine hybrids: Synthesis, DNA/RNA binding and antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2017;137:196-210.
144. Dedon, PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2004; 423(1), 12–22.
145. Chen CC, Wang JK. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol.* 1999;55(3):481-488.
146. Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54(4):469-487.
147. Billack B, Heck DE, Porterfield DM., Malchow RP., Smith PJ., Gardner CR, i sur. Minimal amidine structure for inhibition of nitric oxide biosynthesis. *Biochemical pharmacology.* 2001; 61; 12: 1581-6 .
148. Tang W, Li H, Poulos TL, Silverman RB. Mechanistic studies of inactivation of inducible nitric oxide synthase by amidines. *Biochemistry.* 2015;54(15):2530–2538.
149. Hrabák A, Sefrioui H, Vercruyssen V, Temesi A, Bajor T, Vray B. Action of chloroquine on nitric oxide production and parasite killing by macrophages. *Eur J Pharmacol.* 1998;354(1):83-90.

150. Shen H, Wu N, Wang Y, Zhao H, Zhang L, Li T, i sur. Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis. *Int Immunopharmacol.* 2017;46:16-22.
151. Yao J, Xie J, Xie B, Li Y, Jiang L, Sui X, i sur. Therapeutic effect of hydroxychloroquine on colorectal carcinogenesis in experimental murine colitis. *Biochem Pharmacol.* 2016;115:51-63.
152. Saraiva MT, Krüger R, Baldinotti RSM, Lenardão EJ, Luchese C, Savegnago L, Wilhelm EA, Alves D. 7-Chloroquinoline1,2,3-triazoyl Carboxylates: Organocatalytic Synthesis and Antioxidant Properties. *J Braz Chem Soc* 2016;1:41-53.
153. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2008;153(1):6-20.
154. Racané L, Cindrić M, Perin N, Roškarić P, Starčević K, Mašek T, i sur. Synthesis and Antioxidative Potency of Novel Amidino Substituted Benzimidazole and Benzothiazole Derivatives. *Croatica Chemica Acta*, 2017;90 (2):187-195.
155. Gera A, Mohan C, Madan J, Arora S. Molecular Hybrids of N-Phthaloylglycyl Hydrazide and Hydrazinecarbothioamide with Anti-inflammatory and Anti-oxidant Activities. *Curr Org Synth.* 2019;16(7):1055-1066.

## 11. ŽIVOTOPIS

Antonio Periš rođen je 4. veljače 1996. godine. Nakon završenoga osnovnog obrazovanja u OŠ Jagode Truhelke, 2011. godine upisuje smjer prirodoslovne gimnazije u Tehničkoj školi i prirodoslovnoj gimnaziji Ruđera Boškovića gdje je sudjelovao u projektu *Youth for EU – Mladi za Europu* te u 4. razredu bio prvi na županijskome natjecanju iz biologije.

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike upisuje 2015. godine na Medicinskome fakultetu u Osijeku gdje je član udruge CMLDSA u sklopu koje sudjeluje u raznim aktivnostima. Diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike upisuje 2018. godine i dobitnik je Rektorove nagrade za akademsku godinu 2016./2017. te 2018./2019. Tijekom studija bio je stipendist Osječko-baranjske županije te grada Osijeka. Sudjelovao je na *Tjednu mozga* 2020. na MEFOS-u gdje je održao predavanje na temu neurobiologije straha od javnih nastupa.

U procesu objave mu je znanstveni rad iz teme diplomskoga rada pod nazivom *Effects of Quinoline-Arylamidine Hybrids on LPS-induced Inflammation in RAW 264.7 cells* u časopisu *Periodicum Biologorum*.