

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Dušan S. Dimić

**EKSPERIMENTALNO I TEORIJSKO
ISPITIVANJE ODNOSA STRUKTURA-
ANTIRADIKALSKA AKTIVNOST
ODABRANIH NEUROTRANSMITERA,
NJIHOVIH PREKURSORA I
METABOLITA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Dušan S. Dimić

**EXPERIMENTAL AND THEORETICAL
INVESTIGATION OF STRUCTURE-
ANTIRADICAL ACTIVITY
RELATIONSHIP OF SELECTED
NEUROTRANSMITTERS, THEIR
PRECURSORS AND METABOLITES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentori:

dr Jasmina Dimitrić Marković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

dr Zoran Marković, redovni profesor
Departman za hemijsko-tehnološke nauke, Državni univerzitet u Novom Pazaru

Članovi komisije za odbranu disertacije:

dr Jasmina Dimitrić Marković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

dr Zoran Marković, redovni profesor
Državni univerzitet u Novom Pazaru – Departman za hemijsko-tehnološke nauke

dr Miloš Mojović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

dr Mihajlo Etinski, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

dr Marko Živanović, naučni saradnik
Univerzitet u Kragujevcu – Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju i
ekologiju

Datum odbrane:

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem mentorima ove doktorske disertacije, dr Jasmini Dimitrić-Marković, redovnom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, i dr Zoranu Markoviću, redovnom profesoru Departmana za hemijsko-tehnološke nauke Državnog univerziteta u Novom Pazaru. Tokom ovih godina izrade teze mentori su svojim značajnim sugestijama, velikim znanjem i zalaganjem pomogli da disertacija dobije svoj krajnji oblik.

Važan deo istraživanja je urađen u laboratoriji za EPR spektroskopiju, tako da veliku zahvalnost upućujem i dr Milošu Mojoviću, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, i Đuri Nakaradi, istraživaču saradniku Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu. Dr Milošu Mojoviću se zahvaljujem i za korisne savete u toku pisanja disertacije.

Dr Mihajlu Etinskom, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, i dr Marku Živanoviću, naučnom saradniku Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, hvala za pristanak da budu članovi Komisije za odbranu disertacije i na korisnim savetima koji su doprineli kvalitetu diskusije rezultata prikazane u okviru disertacije.

Spektrofluorimetrijska merenja su urađena na Stokholmskom univerzitetu i Institutu za multidisciplinarna istraživanja, i ne bi bili mogući bez saradnje sa dr Vladanom Vukojević, vanrednom profesoru Karolinska Instituta, i Milenom Dimitrijević, istraživača saradnika Instituta za multidisciplinarna istraživanja. Hvala na posvećenom vremenu i želji da eksperimenti budu urađeni kvalitetno i precizno.

Posebnu zahvalnost dugujem i dr Dejanu Milenkoviću, naučnom saradniku Istraživačko razvojnog centra za bioinženjering, koji je svojom stručnošću pomogao da teorijski deo istraživanja bude urađen u prikazanom obimu i kvalitetu. Posete i rad u Kragujevcu ne bi bili tako zanimljivi bez dr Jelene Đorović, istraživača saradnika Istraživačko razvojnog centra za bioinženjering, i Edine Avdović, istraživača saradnika Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

Deo doktorske disertacije je urađen u saradnji sa master studentima i diplomcima u okviru njihovih završnih radova. Aleksa Radović, Bojana Kočmaruk, Jelica Ilić, Dragana Sretenović i Goran Jovanović su svojim trudom i zalaganjem u okviru završnih

radova doprineli obimu i kvalitetu eksperimentalnih i teorijskih istraživanja prikazanih u okviru disertacije.

Svojim prijateljima, koji su upotpunili deo aktivnosti koje nisu bile sastavni deo disertacije želim posebno da se zahvalim, zbog njih je bilo vredno raditi i završavati sa poslom na vreme. Dr Ani Stanojević, hvala za stalnu podršku u procesu pisanja teze i pomoć oko dela eksperimentalnog rada urađenog na Stokholmskom univerzitetu.

Roditeljima i bratu, hvala na svemu, posebno na tome što su učinili da školovanje i odrastanje budu tako posebni. Njima posvećujem ovu disertaciju.

Autor

Naslov doktorske disertacije:

**EKSPERIMENTALNO I TEORIJSKO ISPITIVANJE ODNOSA STRUKTURA-
ANTIRADIKALSKA AKTIVNOST ODABRANIH NEUROTRANSMITERA,
NJIHOVIH PREKURSORA I METABOLITA**

Rezime:

Predmet istraživanja ove doktorske teze je *in vitro* određivanje antiradikalске aktivnosti odabranih neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita, a u cilju uspostavljanja odnosa na liniji struktura-antiradikalска aktivnost. Rezultati su upotupnjeni teorijskim proračunima kako bi se dobila potpuna slika parametara važnih za aktivnost prema radikalima od interesa, ali i termodinamički i kinetički najpovoljnijih mehanizama.

Veliki broj spoljašnjih faktora utiče na povećanje koncentracije slobodnih radikala u organizmu pri čemu nastaje oksidacioni stres. U ovom procesu se ireverzibilno oštećuju biološki značajni molekuli i to dejstvom reaktivnih vrsta kiseonika, azota, hlora i sumpora. U literaturi je pokazano da su slobodni radikali direktno ili indirektno povezani sa razvojem neurodegenerativnih bolesti (Parkinsonove, Alchajmerove, šizofrenije i amiotrofične lateralne skleroze). Aktivnost može biti izražena ili kroz oksidaciju biološki molekula ili formiranje polimernih struktura, odnosno plakova. Većina ispitivanih egzogenih antioksidanasa ne može preći krvno-moždanu barijeru, tako da se ne mogu direktno koristiti za lečenje neurodegenerativnih bolesti. Zbog toga sve veći značaj se pridaje molekulima koji su prisutni u organizmu.

Po svojoj strukturi, većina neurotransmitera pripada klasi kateholamina, odnosno poseduju kateholnu grupu koja je i čest strukturni parametar dobrih antioksidanasa. Dopamin, norepinefrin, epinefrin, njihov prekursor L-DOPA i dopaminski metabolit DOPAC poseduju ovu strukturnu jedinicu. Zamenom jedne hidroksilne grupe metil-grupom nastaju 3-metoksitiramin, homovanilinska kiselina, vanililbademova kiselina (*vanillylmandelic acid* – VMA), značajni metaboliti neurotransmitera koji se eksperimentalno određuju prilikom dijagnoze bolesti povezanih sa koncentracijom dopamina. Tiramin, tirozin i oktopamin imaju hidroksilnu grupu u *p*-položaju u odnosu na alifatični niz dok fenilalanin i feniletilamin u strukturi nemaju hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu. Tri hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu su prisutne kod 6-

hidroksidopamina. Svi ovi molekuli su uključeni u istraživanje kako bi se eksperimentalno i teorijski odredili strukturni parametri, broj i vrsta supstituenata, kao i krajnje grupe alifatičnog niza značajni za antiradikalnu aktivnost.

Prvi cilj doktorske teze se odnosi na potpunu spektrohemijsku karakterizaciju metabolita neurotransmitera, 3-metoksitiramina, VMA, oktopamina i 6-hidroksidopamina. Drugi cilj teze je eksperimentalno određivanje aktivnosti pomenutih molekula prema hidroksi-radikal, superoksid radikal-anjonu, askorbil-radikal, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikal (DPPH[•]) i 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonskoj kiselini (ABTS^{•+}). Teorijski najpovoljniji mehanizam je određen izračunavanjem promena entalpije reakcija prema predloženim modelima. Kinetički parametri su izračunati na osnovu teorije prelaznog stanja i Markusove teorije. U okviru trećeg cilja ispitana je i mogućnost vezivanja odabranih molekula za goveđi serum albumin, a na osnovu metode molekulskog dokinga određene i najznačajnije interakcije sa aktivnim mestom. Primenjene spektrohemijske i elektrohemijske metode uključuju spektrofotometriju, EPR, elektronsku, IC, ramansku i NMR spektroskopiju kao i cikličnu voltometriju. Četvrti cilj je sinteza, kristalografska i spektroskopska karakterizacija derivata 4-hidroksikumarina sa dopaminom. Modifikacijom kumarinske hromofore dobijen je novi ligand sa ciljem da se ispita sinergistički uticaj dva biološki relevantna molekula, koji pokazuju antiradikalnu aktivnost, na nekoliko linija ćelija tumora.

Naučni doprinos teze je u boljem razumevanju antiradikalne aktivnosti neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita, sa stanovišta uticaja strukture molekula. Dodatnim razvijanjem teorijskih metoda, kombinacijom termodinamičkih i kinetičkih parametara reakcija, omogućeno je dobijanje opšteg postupka za ispitivanje najverovatnijeg mehanizma redukcije i ukupne reaktivnosti molekula prema različitim radikalnim vrstama.

Ključne reči: Neurotransmiteri; Antiradikalna aktivnost; Pro-oksidaciona aktivnost; Hidroksi-radikal; Superoksid radikal-anjon; DPPH; Askorbil-radikal; EPR spektroskopija; Ciklična voltometrija; Elektronska spektroskopija; Kumarin; Antitumorska aktivnost; Teorija funkcionala gustine; Markusova teorija.

Naučna oblast: Fizička hemija

Uže naučne oblasti: Fizička hemija – spektrohemija; Fizička hemija – biofizička hemija i dinamika neravnotežnih procesa; Fizička hemija – kvantna hemija.

UDK broj:

Title:

EXPERIMENTAL AND THEORETICAL INVESTIGATION OF STRUCTURE-ANTIRADICAL ACTIVITY RELATIONSHIP OF SELECTED NEUROTRANSMITTERS, THEIR PRECURSORS AND METABOLITES

Abstract:

The research topic of this doctoral dissertation is *in vitro* determination of antiradical activity of selected neurotransmitters, their precursors and metabolites, with main goal of establishment of the structure-antiradical activity relationship. The results incorporate theoretical calculations in order to obtain full picture of parameters important for activity towards radicals of interest, but also to determine the thermodynamically and kinetically most favorable mechanism.

Large number of external parameters influences the increase in concentration of free radicals which leads to oxidative stress. In this process the biologically important molecules are irreversibly damaged by the activity of reactive oxygen, nitrogen, chlorine and sulfur species. It is shown in literature that free radicals are directly or indirectly connected to the development of neurodegenerative diseases (Parkinson, Alzheimer, schizophrenia, amyotrophic lateral sclerosis). The activity of the reactive species is expressed through oxidation of biologically important molecules or the formation of polymeric structures, plaque. The most of investigated exergonic antioxidants cannot cross the blood-brain barrier, therefore they cannot be used for the neurodegenerative diseases treatment. Because of this there is an increased interest in the naturally occurring molecules in organism.

Structurally, the majority of neurotransmitters are catecholamines, which means that they possess catechol moiety, common structural motif of good antioxidants. Dopamine, norepinephrine, epinephrine, their precursor L-DOPA and dopamine metabolite DOPAC have this group. When one of the hydroxyl groups is exchanged with methyl group the following molecules are obtained: 3-methoxytyramine, homovanillic acid, vanillylmandelic acid. These molecules are experimentally determined in diagnosis of diseases resulting from a decrease in the dopamine concentration. Tyramine, tyrosine and octopamine have one hydroxyl group in *p*-position with respect to the aliphatic chain. Phenylalanine and phenylethylamine do not possess any hydroxyl groups attached to the

aromatic ring. There are three hydroxyl groups in structure of 6-hydroxydopamine. All of these molecules are included in investigation so experimentally and theoretically important structural parameters like number and type of substituents, and ending groups of aliphatic chain are determined.

The first goal of this doctoral dissertation concerns the complete spectrochemical characterization of neurotransmitters' metabolites for which there is insufficient data in literature. These metabolites are: 3-methoxytyramine, vanillylmandelic acid, octopamine and 6-hydroxydopamine. The second goal is experimental determination of the activity of mentioned molecules towards hydroxy-radical, superoxide radical anion, ascorbyl radical, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil radical (DPPH[•]) and monoanion radical of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{•+}). The theoretically most advantageous mechanism was determined by calculating the change in the enthalpy of reactions according to the proposed models. Kinetic parameters are determined based on the Transition state theory and Marcus' theory. Within third goal the bonding of selected molecules with bovine serum albumin is also investigated. The most important interactions with BSA's active parts are obtained by molecular docking method. The applied spectroscopic and electrochemical techniques include spectrofluorimetry, EPR, electronic, IR, Raman and NMR spectroscopies as well as cyclic voltammetry. The fourth goal is synthesis, crystallographic and spectroscopic characterization of 4-hydroxycoumarin derivative with dopamine. By modifying coumarin chromophore, a new ligand was obtained in order to investigate the synergistic effect of two biologically relevant molecules, that exhibit antiradical activity, on several tumor cells lines.

The scientific contribution of this dissertation is in better understading of antiradical activity of neurotransmitters, their precursors and metabolites, form the perspective of molecular structure. By further developing theoretical methods, by combining the thermodynamic and kinetic parameters of the reactions, it is possible to obtain a general procedure for testing the most probable reduction mechanism and the total reactivity of the molecules towards various radical species.

Keywords: Neurotransmitters; Antiradical activity, Pro-oxidative activity, Hydrxy-radical; Superoxide radical anion; DPPH; Ascorbyl radical; EPR spectroscopy; Cyclic voltammetry; Electronic spectroscopy; Coumarin; Antitumor activity; Density Functional Theory; Marcus' theory.

Scientific Field: Physical chemistry

Fields of Academic Expertise: Physical chemistry – Spectrochemistry; Physical chemistry – Biophysical chemistry and nonlinear dynamics; Physical chemistry – Quantum chemistry

UDK:

Sadržaj

1. Uvodni deo	1
1.1 Oksidacioni stres.....	1
1.2 Reakcije formiranja ROS, RNS i RCS u biološkim sistemima	3
1.3 Antioksidansi	9
2. Neurotransmiteri, njihovi prekursori i metaboliti	11
2.1. L-3,4-dihidroksifenilalanin	12
2.2. Dopamin.....	13
2.3. Norepinefrin.....	13
2.4. Epinefrin	14
2.5. 3,4-Dihidroksifenil sirćetna kiselina.....	14
2.6. Homovanilinska kiselina.....	15
2.7. Vanililbademova kiselina.....	15
2.8. 3-Metoksitiramin	15
2.9. Tiramin.....	16
2.10. Tirozin.....	16
2.11. Fenilalanin	17
2.12. Feniletilamin	17
2.13. Oktopamin	17
2.14. 6-Hidroksidopamin	18
2.15. Katehol.....	18
3. Teorije razvoja neurodegenerativnih bolesti, uticaj slobodnih radikala	19
3.1. Parkinsonova bolest	20
3.2. Alchajmerova bolest	21
3.3. Šizofrenija.....	21
3.4. Amiotrofična lateralna skleroza.....	22
4. Značaj neurotransmitera u borbi protiv oksidacionog stresa – pregled literature	23
4.1. Optimizacija struktura i poređenje sa eksperimentalnim spektrima	23
4.2. Antiradikalska aktivnost neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita.	28
4.3. Teorijsko ispitivanje mehanizma antiradikalske aktivnosti neurotransmitera.	31
4.4. Interakcije kateholamina sa goveđim serum albuminom	32

5. Cilj rada	33
6. Eksperimentalne i teorijske metode	34
6.1. Hemikalije.....	34
6.2. Eksperimentalne metode, instrumenti i uslovi snimanja	35
6.2.1. Elektronska spektroskopija.....	35
6.2.2. Infracrvena i ramanska spektroskopija	40
6.2.3. Nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija.....	41
6.2.4. Elektronska paramagnetska rezonantna spektroskopija	42
6.2.5. Cikična voltametrija	43
6.2.6. Spektrofluorimetrija	45
6.2.7. Kristalografija X-zraka	47
6.2.8. Antitumorska aktivnost	47
6.2.9. Sinteza kumarin-dopamin derivata.....	48
6.3. Teorijske metode.....	50
6.3.1. Metode molekulske mehanike	50
6.3.2. Osnove kvantne hemije i Šredingerova jednačina.....	50
6.3.3. Teorija funkcionala gustine	52
6.3.4. Hibridni funkcionali	53
6.3.5. Korišćeni modeli rastvarača	55
6.3.6. Teorija prirodnih vezivnih orbitala (Natural Bond Orbital Analysis - NBO)	55
6.3.7. Teorijski mehanizmi antioksidacione aktivnosti	56
6.3.8. Izračunavanje konstante brzine prema teoriji prelaznog stanja.....	59
6.3.9. Izračunavanje konstante brzine reakcije prenosa elektrona prema Markusovoj teoriji.....	60
6.3.10. Kvantna teorija atoma u molekulu (Quantum Theory of Atoms in Molecules, QTAIM).....	61
6.3.11. Fukui funkcije.....	62
7. Rezultati i diskusija.....	64
7.1. Eksperimentalno i teorijsko ispitivanje strukture metabolita neurotransmitera	64
7.1.1. 3-Metoksitiramin	64
7.1.2. Oktopamin	72
7.1.3. 6-Hidroksidopamin.....	77
7.1.4. Vanililbademova kiselina	83

7.2. Eksperimentalno i teorijsko određivanje antiradikalske aktivnosti neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita prema odabranim radikalima.....	91
7.2.1. DPPH [•]	91
7.2.2. ABTS ^{•+}	112
7.2.3. Hidroksi-radikal.....	117
7.2.4. Askorbil-radikal.....	122
7.2.5. Superoksid radikal-anjon.....	126
7.2.6. Hlorovani metilperoksi-radikali	130
7.3. Spektrofluorimetrijsko ispitivanje vezivanja neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita za goveđi serum albumin	138
7.4. Spektroskopsko i strukturno ispitivanje 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona.....	144
8. Zaključak	153
9. Literatura.....	160
10. Dodatak	191
11. Biografija autora	205
12. Prilozi.....	208
Prilog 1. Izjava o autorstvu	208
Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije	209
Prilog 3. Izjava o korišćenju	210

1. Uvodni deo

1.1 Oksidacioni stres

Slobodni radikali su molekuli ili atomi koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Najjednostavniji slobodan radikal je atom vodonika, ali su u biološkim sistemima najčešće prisutni radikali koji sadrže kiseonik, azot, sumpor i hlor [1]. Vrste koje u reakcijama sa slobodnim radikalima daju manje reaktivne vrse se nazivaju antioksidansi. Termin „antioksidans“ i „dobar antioksidans“ se široko koriste, ali je iznenađujuće teško dati jedinstvenu definiciju koja zavisi i od oblasti u kojoj se vrši ispitivanje. Jedna od često korišćenih definicija antioksidansa je *da je to svaka supstanca koja, kada je prisutna u malim koncentracijama u odnosu na oksidabilni supstrat, značajno usporava ili sprečava oksidaciju tog supstrata* [2]. U biološkim, *in vivo* uslovima, supstrat može biti bilo koji molekul koji je zbog svoje važnosti potrebno sačuvati od dejstva slobodnih radikala, pri čemu su različiti antioksidansi potrebni za zaštitu različitih biomolekula, prvenstveno zbog polarnosti i rastvorljivosti.

Uticaj ksenobiotika, hemikalija, zagađenja, ultraljubičastog (ULj) zračenja, dima cigareta i zračenja su samo neki od faktora koji dovode do nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (*Reactive Oxygen Species* – ROS), azota (*Reactive Nitrogen Species* – RNS) i hlora (*Reactive Chlorine Species* – RCS) u ljudskom organizmu [3,4]. Nastale reaktivne vrste ne moraju nužno da budu radikali, već mogu biti u prvom redu anjoni ili neutralni molekuli. Formiranje reaktivnih vrsta je značajno za normalno funkcionisanje organizma, zato što su ove vrste uključene u procese kao što su prenošenje signala, neurotransmisija, lagano otpuštanje mišića, modulacija krvnog pritiska, rast ćelija, kontrola imunog sistema, proizvodnja energije, učenje i pamćenje. Danas se i sam proces starenja smatra posledicom progresivnog oksidacionog oštećenje važnih ćelijskih komponenata, primarno mitohondrija, i smanjenja mogućnost slobodnih radikala da prenose signale u organizmu [5]. Zbog prethodno opisanih funkcija, merenje koncentracije reaktivnih vrsta je veoma značajno. Povećana koncentracija slobodnih radikala može postojati prilikom patoloških procesa i oštećenja ćelija, ali i pri fiziološkim uslovima u skeletnim mišićima. U mišićima ROS i RNS nastaju od superoksid radikal-anjona i azot monoksida do koncentracija koje mogu biti reda pmol do mmol po mg mišića u minuti [6]. Sa

povećanjem koncentracije reaktivnih vrsta uloga antioksidanasa postaje sve značajnija. Njihova uloga prvenstveno zavisi od mesta gde je radikal generisan, kao i od specifičnog molekula sa kojim može da reaguje [1]. Usled povećanja količine slobodnih radikala, odnosno smanjene mogućnosti organizma da se sa njima izbori, nastaje oksidacioni stres. Oksidacioni stres je skup procesa koji podrazumevaju oksidaciji biomolekula kao što su lipidi ćelijske membrane, proteina iz tkiva, enzimi, ugljeni hidrati i nukleinske kiseline. Ukoliko su antioksidansi prisutni u organizmu moguće je sprečiti dalja oštećenja, do momenta kada promene u organizmu postaju ireverzibilne, što može dovesti do razvoja većeg broja bolesti.

Oksidacioni stres je povezan sa razvojem očnih, bubrežnih i plućnih bolesti, reumatoidnim artritismom, rastom fetusa, određenim vrstama tumora. Veliki broj neurodegenerativnih oboljenja, kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest, gubitak memorije, multipleks skleroza i depresija u svojoj osnovi imaju dejstvo slobodnih radikala. Postoje istraživanja koja pokazuju da reaktivne vrste kiseonika i azota mogu takođe biti uključene u razvoj kardiovaskularnih oboljenja, kao što su ishemija, kardiomiopatija, povišeni pritisak i arteroskleroza.

Kao što je prethodno pomenuto, veliki broj biološki važnih molekula mogu biti meta reaktivnih vrsta. Prilikom reakcija ovih molekula sa ROS i RNS nastaje veći broj nusproizvoda kao što su aldehidi, ketoni, alkoholi i peroksidi. Deo nastalih proizvoda može biti toksičan za limfocite i makrofage, koji su deo prirodne, *in vivo*, zaštite organizma, čime se dodatno smanjuje mogućnost organizma da se odbrani [7]. Pokazano je da je u molekulu DNK guanin prvi koji podleže jedno-elektronskoj oksidaciji. Zbog najmanjeg oksidacionog potencijala, sve vrste koje uključuju guanin, kao što su guanozin, 2'-deoksiguanozin i 2'-deoksiguanozin-5'-monofosfat mogu biti uključene u proces oksidacionog oštećenja. Zračenje i reakcija sa oksidansima mogu oksidovati ovu nukleotidnu bazu do radikal-katjona, koji u daljim reakcijama može da dovede do oštećenja i prekida DNK lanca. Vrsta koja nastaje od oksidovanog guanina je i 8-okso-2-dezoksiguanozin (8-okso-2dG) koja se koristi kao marker oksidacionog stresa. Reakcije proteina sa radikalima, prvenstveno veoma reaktivnim hidroksi-radikalom ($\text{OH}^{\bullet}$) može dovesti do strukturnih promena unutar samog proteina i njegove fragmentacije. Veliki broj aminokiselina, među kojima su triptofan, metionin, lizin, serin, leucin, glutamin i glutaminska kiselina, je identifikovan kao mesto reakcije sa hidroksi-radikalom.

Aminokiseline sa sumporom, cistein i metionin, su vrlo podložne reakcijama sa reaktivnim vrstama kiseonika, pri čemu mogu nastati reaktivne vrste sumpora. Reaktivnost radikala prema aminokiselinama određena je i strukturom aminokiselina i njihovim položajem u strukturi proteina. Kod aminokiselina bez supstituenata kao što su glicin i alanin reakcije se dešavaju na α -ugljeniku. Mesto reakcije može biti i bočni lanac kod aminokiselina sa voluminoznijim grupama. Interakcije na ugljenikovim atomima koji nisu u α ili β položaju u strukturi ovih biomolekula zavise od strukturnih faktora, mogućih interakcija unutar aminokiseline ili proteina i rastvarača. Moguće su i reakcije formiranja radikalskog adukta koje se dešavaju na aromatičnim prstenovima tirozina i fenilalanina.

Mehanizmi zaštite od slobodnih radikala mogu biti različiti. U zavisnosti od vremena kada se primenjuju antioksidansi se mogu se podeliti na one koji učestvuju u prevenciji, zaštiti i saniranju posledica delovanja slobodnih radikala.

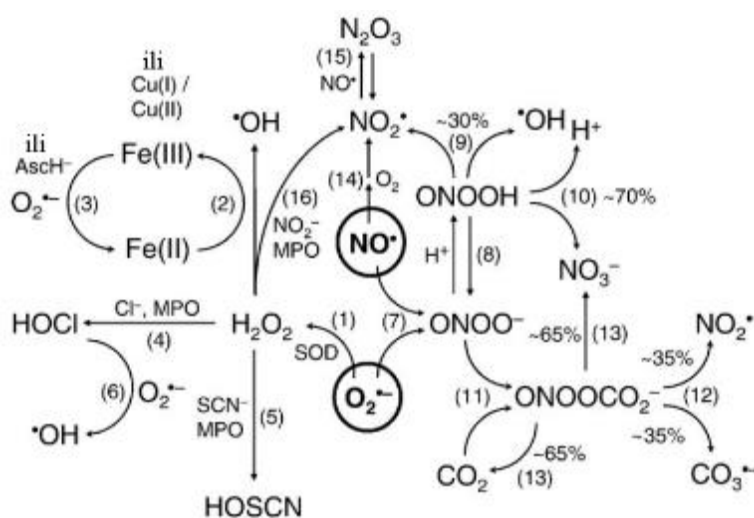
Zbog svog značaja u organizmu, ispitivanje reakcija koje uključuju reaktivne vrste i antioksidanse je od velike važnosti u modernoj nauci. Razvijen je niz metoda, teorijskih i eksperimentalnih, kojima se mogu opisati reakcije i predvideti aktivnost molekula koji su novo-sintetisani ili već prisutni u organizmu.

1.2 Reakcije formiranja ROS, RNS i RCS u biološkim sistemima

U organizmu se konstatno dešava stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika i azota. Zbog isprepletanosti reakcija u kojima učestvuju ove vrste potrebno je definisati izraze reaktivne vrste kiseonika i azota. Izraz reaktivne vrste kiseonika se odnosi na vrste koje nastaju redukcijom kiseonika do superoksid radikal-anjona i vodonik-peroksida, dok se vrste koje nastaju od azot monoksida nazivaju reaktivne vrste azota. Za deo reaktivnih vrsta potrebni su i molekulski kiseonik i azot monoksid, kao u slučaju nastanka peroksinitrita, tako da podela nije uvek jednoznačna [8,9]. U okviru teze će se izrazi ROS i RNS koristiti za vrste koje su eksplicitno navedene u narednim paragrafima. Na slici 1 su prikazani mogući reakcioni putevi nastanka različitih reaktivnih vrsta u organizmu.

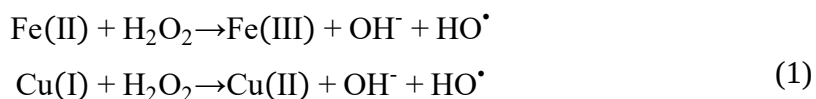
Kiseonik je neophodan za život aerobnih organizama. Njegovim aktiviranjem u ROS dolazi do univerzalne toksičnosti, odnosno prelaska u reaktivnije vrste koje stupaju u reakcije sa biološki važnim molekulima. Prilikom ovih procesa oštećuju se strukture u organizmu na molekulskom nivou, kao što je opisano prilikom definisanja oksidacionog stresa. Nastanak ROS-a je moguće u biološki značajnim procesima fotosenzibilizacije,

pri čemu se tripletski kiseonik prevodi u singletski oblik, hidroksi-radikal i vodonik peroksid. Hemijske vrste kao što su hinoni ili fenoli takođe mogu biti uključeni u proces aktiviranja [10]. Zbog svoje prirode ROS predstavljaju vrste koje su aktivnije od molekulskog kiseonika i mogu biti u obliku anjona, radikala ili molekula. Najznačajnije ROS vrste su superoksid radikal-anjon ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoksi- ($HO_2^{\bullet}$), hidroksi ($HO^{\bullet}$), peroksi- ($ROO^{\bullet}$) i alkoksi- ($RO^{\bullet}$) radikali, molekul vodonik-peroksida (H_2O_2), ozona (O_3) i singletskog kiseonika (1O_2) [3]. Nastanak radikala u organizmu može biti i slučajan prilikom prelaska elektrona sa mitohondrijalnog lanca na molekulski kiseonik, pri čemu nastaje superoksid radikal-anjon. Pod uticajem elektromagnetskog zračenja dovoljne energije homolitički se raskida jedna veza u molekulu vode pri čemu se proizvode hidoksil-radikal i atom vodonika. Superoksid radikal-anjon nastaje i kao deo odbrambenog mehanizma ćelija, a pretpostavlja se da ima i dodatne biološki značajne funkcije [1]. Prema slici 1, oksidacioni stres nastaje disproporcionisanjem i nastankom vodonik-peroksida uz prisustvo enzima superoksid dismutaze (SOD). Od ove molekulske vrste, kao rezultat reakcije Fentonovog tipa (2), uz prisustvo Fe(II) i Cu(I) jona kao katalizatora, jedan od proizvoda je visoko-reaktivni hidroksi-radikal. Redukovani joni gvožđa i bakra mogu nastati u organizmu kroz druge reakcije sa superoskid radikal-anjonom ili askorbatom (reakcije 2 i 3). Reakcije 4 i 5 prikazuju nastanak hipohloraste i hipotiocijanitne kiseline, u reakciji sa hloridima, tiocijanatima ili mieloperoksidazom. Hipohlorasta kiselina je takođe reaktivna vrsta koja sa superoksid radikal-anjonom daje hidroksi-radikal, reakcija 6.



Slika 1 Reakcioni putevi formiranja reaktivnih vrsta u organizmu od azot-monoksida i superoksid radikal-anjon

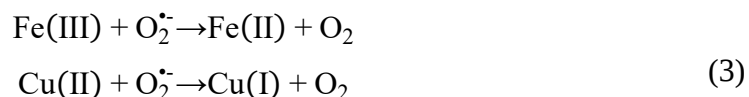
Hidroksi-, askrotil- i superoksid radikal-anjon su od posebnog značaja u biološkim sistemima. Hidroksi-radikal je najreaktivnija vrsta kiseonika. Može nastati usled homolitičkog raskidanja veza u molekulu pod dejstvom jonizujućeg i ultraljubičastog zračenja, kao i u enzimskim reakcijama koje se dešavaju u organizmu. Vrlo brzo nakon nastanka hidroks-radikal reaguje sa molekulima u blizini i to neselektivno, sa konstantama brzina koje su uporedive sa konstantom brzine difuzije. Pretpostavlja se da preko 60% štete koja nastaje u mišićima nakon delovanja jonizujućeg zračenja potiče od reakcija u koje je uključen hidroksi-radikal [11]. Kao što je prikazano na slici 1, hidroksi-radikal može nastati u reakcijama Fentonovog tipa, ali ukoliko su prisutni joni gvožđa i bakra moguća je i Haber-Vajsova rekombinacija. Ove dve reakcije se razlikuju u početnom oksidacionom stanju metala kao i verovatnoći odigravanja u biološkim sistemima. U Fentonovoj reakciji učestvuju redukovani oblici metala:



Haber-Vajsova rekombinacija se može prikazati jednačinom:

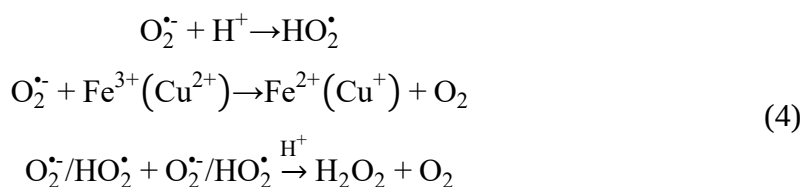


Ovako prikazana reakcija nije od biološkog značaja zato što se dešava veoma sporo. U prisustvu metalnog jona, Haber-Vajsova reakcija se može prikazati kao proces u dva koraka u kome je prvi redukcija metalnog jona i formiranje molekulskog kiseonika (jednačina 3), i drugog koji je identičan Fentonovoj reakciji. Metalni jon je katalizator u ovoj reakciji i čak pri malim koncentracijama može učestvovati u nastanku velike količine hidroksi-radikala.

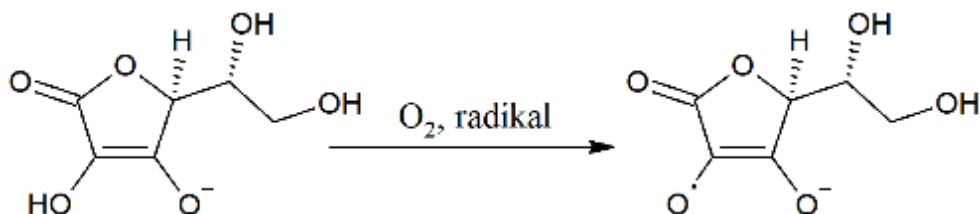


Oksidovana stanja gvožđa i bakra su češća u biološkim sistemima pri čemu se redukcija može desiti i sa drugim prisutnim molekulima. Obe reakcije zbog toga zavise i od helirajućih agenasa, pH vrednosti sredine i enzimskih procesa koji se dešavaju u okruženju. Mesto odigravanja Fentonove reakcije je i citohtom P450 mitohondrija.

Superoksid radikal-anjon nastaje u organizmu enzimskim putem, posredstvom NADH oksidaze, ksantin oksidaze i peroksidaze, prenošenjem jednog elektrona na molekulski kiseonik. Ovo je veoma reaktivna vrsta kiseonika čiji oblik zavisi od pH vrednosti i prirode sredine. U kiseloj sredini superoksid radikal-anjon se može protonovati do hidroperoksi radikala. Ovaj molekul takođe može da redukuje metalne jone i pokrene Fentonovu reakciju. Reakcijom disproporcionisanja superoksid radikal-anjon može preći u vodonik-peroksid i molekulski kiseonik. U sudaru sa molekulima koji mogu da doniraju proton superoksid radikal-anjon se ponaša kao oksidaciono sredstvo. Pregled reakcija ove radikalske vrste je dat u nastavku:



Askorbil-radikal (slika 2) nastaje u organizmu u procesima u kojima se kao antioksidans koristi askorbinska kiselina. Ova kiselina se u organizmu može ponašati kao antioksidans ili pro-oksidans u reakciji sa kiseonikom i u prisustvu različitih enzima i katalizatora [12]. Proizvod svih reakcija sa slobodnim radikalima u kojima učestvuje askorbinska kiselina je askorbil-radikal. Askorbil-radikal ima karakterističan EPR spektar koji je uočen u velikom broju reakcija askorbinske kiseline. Zbog ovoga, ali i prisustva u tkivima, predloženo je da se koristi kao indikator oksidacionog stresa. Koncentracija askorbil-radikala može rasti prilikom izloženosti pesticidima, intoksikacije bakterijskim toksinima i vodonik-peroksidom.



Slika 2 Proces nastanka askorbil-radikala

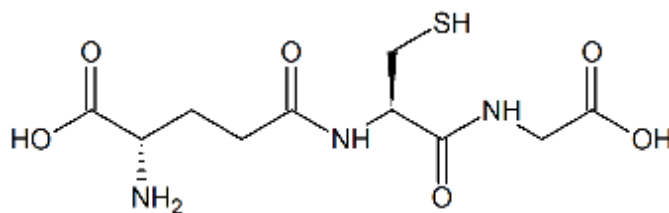
RNS u organizmu učestvuju u prenošenju signala kroz aktiviranje enzima. Jedan od prvih molekula koji su otkriveni kao prenosioци signala je azot-monoksid. Ovaj molekul ima veći broj značajnih uloga, od normalnih fizioloških procesa kao što je

neurotransmisija i odbrana imunog sistema, do zapaljenja, ishemije, tumora i neurodegeneracije. Dejstvo ove reaktivne vrste izaziva „azotni stres“ [13], proces analogan oksidacionom stresu. Vremenom je otkriven i veliki broj RNS koje su uključene u fiziološke i patološke procese, kao što su azot-dioksid (NO_2), diazot-trioksid (N_2O_3), peroksinitrit ($\text{ONOO}^\bullet$), nitrit (NO_2^-), nitrat (NO_3^-) i azanon (HNO). Na slici 1 su prikazane i reakcije u kojima nastaju ove vrste. U reakciji 7 između azot-monoksida i superoksid radikal-anjona nastaje peroksinitrit koji je u ravnoteži sa peroksinitritnom kiselinom (reakcija 8), reaktivnom vrstom koja učestvuje u oksidacionom stresu. Peroksinitritna kiselina je nestabilna hemijska vrsta koja se nakon vremena od 1 do 3 sekunde razlaže na hidroksi-radikal i azot-dioksid ili nitrat. Na osnovu prikazanog mehanizma moglo bi se zaključiti da je u uslovima *in vivo* količina ove kiseline mala. Međutim, zbog ravnoteže sa peroksinitritom i karbonatnim puferom u organizmu ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$), količina peroksinitritne kiseline značajno varira. U reakcijama sa ugljen-dioksidom nastaju i egzotične kratko-živuće vrste, kao što je nitrozoperoksikarbonat (ONOOOCO_2^-), sa vremenom života od 1 μs . Ova vrsta je zanimljiva zato što kao rezultat razlaganja daje dve radikalske vrste, azot-dioksid i karbonat radikal-anjon ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), koje imaju veći koeficijent difuzije i veću selektivnost od hidroksi-radikala. Treba istaći da interesovanje za ove radikalske vrste raste zbog pomenutih osobina. Deo reakcija sa slike 1 ne uključuje direktnu reakciju azot-monoksida sa superoksid radikal-anjonom, već sa vodonik-peroksidom (reakcija 14). Reakcija azot-monoksida sa kiseonikom je složen proces u kome nastaje azot-dioksid. Ovaj proces je malo verovatan zbog kratkog vremena života reaktivnih vrsta u citoplazmi. U laboratorijskim uslovima moguć je dobijanje diazot-trioksida iz azot-monoksida i azot-dioksida.

RCS su najmanje zastupljene od svih reaktivnih vrsta. Najbolje opisana je hipohlorasta kiselina, jak oksidans koji reaguje sa svim ćelijskim makomolekulima [14]. Ova kiselina, koja se po nekim autorima svrstava u ROS, nastaje u reakciji hlora i vodonik-peroksida, u procesu katalizovanom mieloperoksidazom [15]. Prilikom ulaska mikroorganizama u organizam stvaraju se veće količine hipohloraste kiseline (HClO) koja je jako sredstvo u odbrani organizma. Prevelika proizvodnja HClO može dovesti do artritisa, bolesti bubrega i tumora. Jedinjenja koje sadrže sumpor, kao što su cistein, metionin i glutation, reaguju 100 puta brže sa HOCl nego sa ostalim reaktivnim vrstama [16] gradeći intermedijerni sulfenil-hlorid (R-SCl) koji u reakciji sa vodom prelazi u

sulfensku kiselinu (R-SOH). Ove relativno reaktivne vrste mogu dalje da budu oksidovane do sulfinskih ili sulfonskih kiselina. Proteinski disulfidni mostovi se smatraju stabilnim strukturama, ali u prisustvu HOCl se mogu redukovati do tiosulfinata [R-S(O)-R'] i tiosulfonata [R-S(O₂)-R']. Druge biološki važne strukture su primarni i sekundarni amini. U ovim reakcijama se amini hloruju pri čemu nastaju hloroamini (-NHCl), koji imaju značajnu antimikrobnu aktivnost. Hloroamini imaju nekoliko puta manju aktivnost od hipohloraste kiseline prema biološki važnim molekulima ali imaju specifičnu reaktivnost za oksidaciju cisteina i metionina [14,15]. Hloroamini se mogu razložiti do aldehida, ili u reakciji sa gvožđem i bakrom dati azotne radikale. Hipohlorasta kiselina i hloroamini mogu reagovati i sa nukleotidima i lipidima [15,16], tri do sedam puta sporije nego sa aminokiselinama. U reakciji hipohloraste kiseline sa nukleotidima nastaju hlorovani nukleotidi i azotni radikali. Zavisno od grupe u strukturi lipida sa kojom reaguju hipohlorasta kiselina i hloroamini proizvodi mogu biti hlorohidrini, koji dodatno doprinose oštećenju ćelije [17], ili hloroamini ukoliko su uključene početne grupe koje sadrže azot. RCS mogu u organizam dospeti i preko hemikalija koje se koriste za čišćenje i pranje, kako je detaljnije opisano u narednom paragrafu.

Alkil-radikali imaju veliku ulogu u slobodno-radikalnim reakcijama u organizmu i hlorovani metilperoksi-radikali se često koriste kao model sistemi [18–20]. Ugljentetrahlorid je ksenobiotik sa toksičnim efektom na jetru koji se može redukovati u ljudskom organizmu citohrom P-450 proteinom [21]. Ovo dovodi do formiranja trihlorometil-radikala i, u prisustvu kuseonika, do trihlorometilperoksi-radikala [22]. Jetra nije jedini organ koji može biti meta hlorovanih metilperoksi-radikala, već to mogu biti i srce, pluća, mozak i krv, bubrezi i testisi [23–25]. Reakcije hlorovanih metilperoksi-radikala su takođe ispitivane eksperimentalno prema biološki značajnim molekulima i antioksidansima [19,26–28], likopenu [29], drugim karotenoidima [20], nesteroidnim lekovima protiv inflamacije (*non-steroidal anti-inflammatory drugs* – NSAID) [30]. Pokazano je da ove reakcije zavise od polarnosti rastvarača [31]. Pored ovih, reakcije metilperoksi-radikala sa dobrim antioksidansima su ispitivane i eksperimentalno i teorijski [32,33].



Slika 3 Strukturna formula glutationa

Reaktivne vrste sumpora (RSS) najčešće nastaju u reakcijama ROS i RNS sa tiolima uz prisustvo enzima [34]. Ova reakcija uključuje glutation (slika 3), antioksidans prisutan u organizmu, od koga nakon redukcije tiolne grupe nastaje glutation-disulfid. Očekivano je da su RSS manje reaktivne od vrsta od kojih nastaju ali su u literaturi poznate njihove reakcije sa proteinima [34,35]. U *in vitro* eksperimentima je pokazano da ukoliko u sistemu postoji povećana koncentracija vodonik-peroksida tada sa tiolima ili disulfidima vrlo brzo nastaju disulfid-S-monoksid i disulfid-S-dioksid. U biološkim uslovima reaktivne vrste sumpora doprinose posledicama oksidacionog stresa [36]. Primeri ovih vrsta su tzv. radikali sa 2-centra-3-elektrona, kao što su $RSSR^{\bullet-}$, $RSSR^{+\bullet}$ i R_2SX , kod kojih je X halogen [37,38].

1.3 Antioksidansi

Antioksidansi su svi molekuli koji se mogu koristiti u borbi protiv slobodnih radikala ili sprečavanja njihovog nastanka. Kao što je pomenuto na početku, antioksidansi sprečavaju oksidaciju supstrata kada su prisutni u malim koncentracijama. Ukoliko se posmatra redoks par molekula antioksidansa A^+/A , njegova antioksidaciona aktivnost se može definisati kao sposobnost da redukuje oksidovanu vrstu, pri čemu sam prelazi u oksidovani oblik. Jedinjenje se može smatrati dobrim antioksidansom ukoliko je njegov redoks potencijal niži od redoks potencijala reaktivne vrste.

Postoji nekoliko mehanizama delovanja antioksidanasa: direktne reakcije sa radikalima ili njihovim prekursorima, inhibicija njihovog formiranja, kompleksiranje sa metalima uključenim u proces nastanka radikala i dodatak spoljašnjih antioksidanasa kroz ishranu [39]. U organizmu postoje dva osnovna sistema antioksidacione zaštite, to su: enzimi i antioksidansi male molekulske mase (low molecular weight antioxidants – LMWA). Samo mali broj proteina se može klasifikovati u enzimske antioksidanse:

superoksid dizmutaza (SOD), katalaze i peroksidaze. U životinjskim organizmima enzim citohrom P₄₅₀ je odgovoran za zaštitu organizma od toksičnih vrsta unetih ishranom [7].

Druga grupa antioksidanasa se može podeliti zavisno od mehanizma delovanja na direktne, koji reaguju sa slobodnim radikalima i prekidaju lanac nastanka, i indirektne, na primer helirajuće agense. Antioksidansi sa direktnim delovanjem su najbrojniji, uključuju i endogene i egzogene molekule, odnosno molekule koji su prisutni u organizmu i one koji se unose hranom. Većina supstanci iz ove grupe se unosi u organizam ishranom i u njih spadaju karotenodi, polifenoli, askorbinska kiselina i tokoferoli. Samo mali broj molekula sa antiradikalnim svojstvima se može sintetisati u ćeliji. Pored antioksidativne aktivnosti većina pomenutih LMWA ima i antitumorsku, antimikrobnu, antibakterijsku, antiviralnu i anti-inflamatornu aktivnost, tako da je njihova uloga u organizmu višestruka [7]. Uzimanje egzogenih antioksidanasa je takođe povezano sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, diabetesa, tumora i ostalih stanja koja se razvijaju sa starenjem.

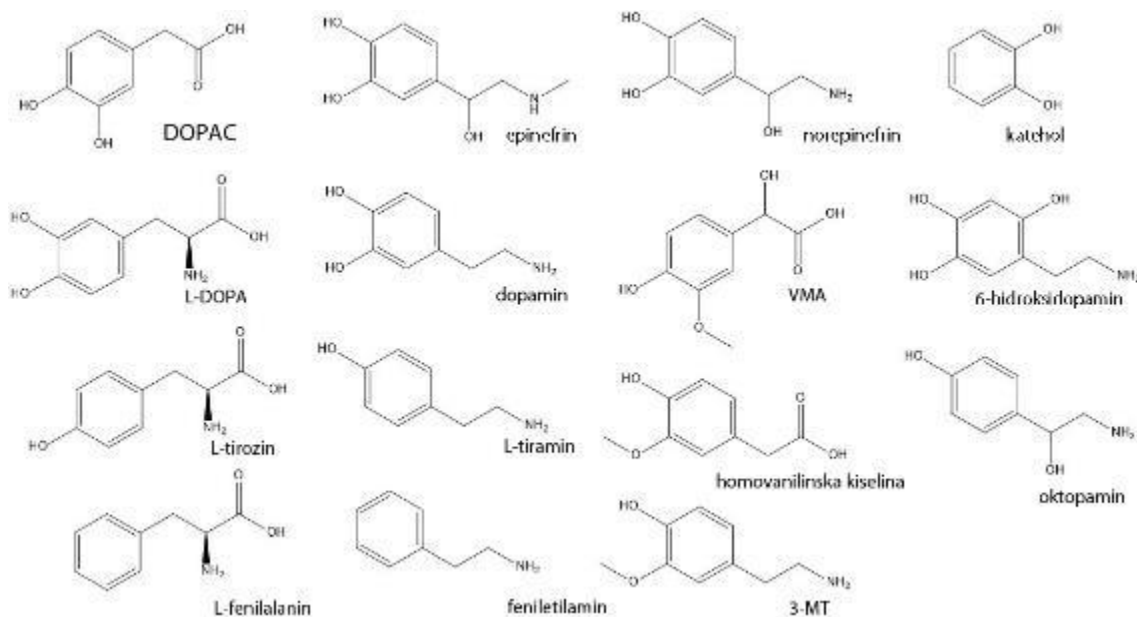
2. Neurotransmiteri, njihovi prekursori i metaboliti

Kateholamini su biološki važni molekuli sa većim brojem funkcija, a koji u strukturi imaju kateholnu jedinicu i primarnu ili sekundarnu amino grupu na alifatičnom nizu. Sintetišu se od tirozina ili fenilalanina. U kateholaminske neurotransmitere spadaju dopamin, epinefrin i norepinefrin. Ovi molekuli su uključeni u procese neuromodulacije u centralnom nervnom sistemu, dok u krvi cirkulišu kao hormoni. Visoke koncentracije ovih molekula su povezane sa stresom (nizak sadržaj šećera, jako svetlo ili zvuk). Stanja organizma sa veoma visokim količinama ovih molekula ukazuju na neuroendokrine tumore, nepravilan rad monoamin oksidaze i traume usled produžene stimulacije centralnog nervnog sistema. Proizvodi razgradnje kateholamina se često koriste kao markeri za neka oboljenja, uključujući i tumore. U nastavku su detaljno opisane funkcije pojedinačnih kateholamina.

Trag amine čine tiramin, feniletilamin, oktopamin i triptamin. Ovi molekuli nastaju u procesu katalizovanom aminokiselinskom dekarboksilazom i za njihove količine u mozgu je odgovorna aktivnost enzima monoamin oksidaze. Jedan od najbolje opisanih efekata trag amina je njihova mogućnost da utiču na otpuštanje kateholamina, na sličan način kao što to čine amfetamini [40]. Rezultati pokazuju i da trag amini mogu imati ulogu u neurotransmisiji nezavisnu od neurotransmitera, posebno nakon otkrića 15 G protein spregnutih receptora koji imaju veliki afinitet prema ovim susptancama [41]. Trag amini su takođe uključeni u kontrolu pokreta i saznanje [42,43]. U slučaju disregulacije njihove koncentracije moguća je pojava većeg broja neuropsihijatrijskih oboljenja koja uključuju depresiju, Parkinsonovu bolest, shizofreniju i hiperaktivnost [44,45]. Iako su strukturno slični sa kateholaminima, čuvaju se na krajevima nerava i mogu biti otpušteni zajedno sa ostalim neurotransmiterima. Prave uloge trag amina nisu u potpunosti objašnjene. Na slici 4 su date strukture kateholamina i njihovih analoga.

Dobro određivanje strukture neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita je osnova razumevanja procesa molekulskog prepoznavanja. Neuronski signali se prenose neurotransmiterima sa jedne neuronske ćelije na drugu. U ovom procesu se molekul koji izlazi iz presinaptičke nervne ćelije vezuje za postsinaptičku ćeliju. Kako bi se ovaj proces ostvario potrebno je da receptor „prepozna“ neurotransmiter. Prvo je sam proces nazvan „ključ i brava“, ali sam naziv nije omogućavao da su i neurotransmiter i receptor

fleksibilni, odnosno da je moguća promena strukture nakon vezivanja. Zbog toga je naziv promenjen u „indukovano uklapanje“ koji ukazuje da se struktura neurotransmitera menja prilikom vezivanja za receptor [46,47]. Receptori kateholamina su jednolančani proteini od 400 jedinica za koje se za kateholamine vezuju vodoničnim vezama. Pretpostavlja se da su serin i aspartanska kiselina osnovne aminokiseline koje grade veze sa kateholaminima [48,49].



Slika 4 Strukturne formule kateholamina i njihovih analoga

U nastavku je dat pregled bioloških funkcija molekula koji su ispitivani u okviru teze.

2.1. L-3,4-dihidroksifenilalanin

L-3,4-dihidroksifenilalanin ((S)-2-amino-3-(3,4-dihidroksifenil)propanska kiselina, L-DOPA) (slika 4) je prekursor dopamina i lek koji se, zbog mogućnosti da prođe krvno-moždanu barijer, koristi u lečenju Parkinsonove bolesti. Od 1993. godine postoji sve više podataka da je ova supstanca i sama neurotransmiter i neuromodulator [50]. L-DOPA nastaje od tirozina u procesu katalizovanom tirozin hidroksilazom (TH), koji i predstavlja korak koji određuje brzinu reakcije sinteze kateholamina, a koja može biti inhibirana α -metil-*p*-tirozinom (α -MPD). Postoje dokazi da određeni neuroni, nađeni u određenim delovima centralnog nervnog sistema kao što je *nucleus tractus solitarii*,

sadrže L-DOPA kao krajni proizvod koji otpuštaju [51,52]. Uočeno je i da L-DOPA može uticati na ćelijsku smrt. Osnovni procesi koji dovode do ovoga su: autoksidacija molekula pri kojoj nastaje hidroksi-radikal [52], autoksidacija koja stvara 3,4,6-trihidroksifenilalanin i njegov hinonski derivat [53] i otpuštanje glutamata [54].

2.2. Dopamin

Dopamin (4-(2-aminoetil)benzen-1,2-diol) (slika 4) je jedan od najvažnijih neurotransmitera čije promene količine u organizmu mogu dovesti do većeg broja oboljenja. Povećana koncentracija dopamina utiče na razvoj šizofrenije, dok smanjena koncentracija ukazuje na razvoj Parkinsonove bolesti [55,56]. U eksperimentima u kojima je dopamin obeležen radioaktivnim izotopom ^{14}C davan pacijentima u urinu su dobijeni norepinefrin i njegovi metaboliti (na primer VMA) i mala količina epinefrina, oko 25% ukupne količine. Preostalih 75% je metabolisano u 3-metoksitiramin, homovanilinsku kiselinu, 3,4-dihidroksifenil sirćetnu kiselinu (DOPAC) i 3,4-dihidroksifeniletanol [57]. Metaboliti dopamina, 3-metoksitiramin (3-MT) i homovanilinska kiselina, se posebno koriste kao tumor-markeri [58–62]. Razgradnja dopamina u organizmu do homovanilinske kiseline katalizovana je enzimom katehol o-metiltransferaza, zajedno sa aldehid dehidrogenazom [63]. U ovaj proces je uključen i enzim monoamin oksidaza B (MAO-B) koji razlaže dopamin do vodonik-peroksida, amonijaka i 3,4-dihidroksifenilacetaldehida. Dobijeni aldehid se aldehid dehidrogenazom prevodi do DOPAC-a i kasnije, uvođenjem metil-grupe umesto jedne hidroksilne uz pomoć katehol o-metiltransferaze, do homovanilinske kiseline. Isti enzim može katalizovati i nastanak 3-MT iz dopamina.

2.3. Norepinefrin

Norepinefrin (4-[(1R)-2-amino-1-hidroksietil]benzen-1,2-diol, noradrenalin) (slika 4) pripada kateholaminima i predstavlja hormon i neurotransmiter u telu. Norepinefrin nastaje od dopamina dejstvom β -hidroksilaze koja uvodi jednu hidroksilnu grupu u strukturu ovog neurotransmitera. Norepinefrin se može prevesti u epinefrin dejstvom enzima feniletanolamin N-metiltransferazom i S-adenozil-L-metionin kofaktora. Degradacijom norepinefrina nastaju VMA i 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol. Ovaj molekul je uključen u održavanje mobilnosti tela u situacijama koje mogu biti

stresne, u takozvanom „bori se ili beži“ (fight-or-flight) odgovoru organizma. Koncentracija norepinefrina je najmanja ujutru i postepeno se povećava u toku dana. U telu ovaj molekul ima višestruku ulogu – održavanje rada srca i krvnog pritiska, stvaranje suza, delovanje na imuni sistem, otpuštanje glukoze tokom stresa, povećanje dotoka krvi u skeletne mišiće, kao i ostale aktivnosti koje mogu biti od značaja tokom opasnosti. U krvotok se norepinefrin otpušta iz adrenalinskih žlezda, a kao neurotransmiter se koristi u simpatičkim ganglijama u blizini kičmenog stuba. Ovaj biološki važan molekul se dodaje u vidu lekova ili se daju lekovi koji imitiraju njegovo delovanje kod stanja organizma koja uključuju nizak pritisak, glaukom, migrene i kardiovaskularne probleme.

2.4. Epinefrin

Epinefrin ((R)-4-(1-hidroksi-2-(metilamino)etil)benzen-1,2-diol, adrenalin) (slika 4) je osnovni kateholaminski neurotransmiter koji se otpušta u centralnom nervnom sistemu usled stresa kako bi se regulisalo funkcionisanje organizma. Ova supstanca aktivira alfa i beta receptore, za razliku od norepinefrina koji aktivira samo alfa receptore. Alfa receptori se nalaze u arterijama dok su beta receptori u srcu, plućima i arterijama skeletnih mišića. Fiziološke funkcije u koje je uključen epinefrin su: srčana stimulacija, regulacija krvnog pritiska, relaksacija glatkih mišića i drugi metabolički procesi. Epinefrin je uključen u proces povećanja krvnog pritiska i prenosa nervnog signala. Centralnu funkciju ovaj molekul ima u kratkotrajnoj reakciji na stres kao i u situacijama koje za posledicu imaju fizički napad na organizam. Epinefrin ima i značajnu kliničku primenu u lečenju hipersenzitivnosti na alergene i respiratornih problema kod astme. Kao osnovni lek epinefrin se koristi kod anafilakse.

2.5. 3,4-Dihidroksifenil sirćetna kiselina

3,4-Dihidroksifenil sirćetna kiselina (2-(3,4-dihidroksifenil) sirćetna kiselina, 3,4-*dihydroxyphenyl acetic acid*, DOPAC) (slika 4), je jedan od najznačajnijih metabolita dopamina [64]. Proces nastanka ove supstance se sastoji od dva koraka oksidacije dopamina koji su katalizovani monoamin oksidazom i aldehid dehidrogenazom, oba na mitohondrijalnom nivou [65]. DOPAC nastaje i prilikom razgradnje flavonoida, na primer kvercetina, zajedno sa 3-hidroksifenil sirćetnom kiselinom [66]. Bakterijski enzimi u debelom crevu razlažu složene strukture do jednostavnih aromatičnih produkata

[67]. U reakciji sa radikalima dobija se semihinonski oblik molekula koji dalje može oksidovati glutation i askorbat [68]. Ovaj metabolit može da dovede, u sinergističkom efektu sa azot-monoksidom, do mitohondrijalne difunkcije [69].

2.6. Homovanilinska kiselina

Homovanilinska kiselina (2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)sirćetna kiselina, *homovanillic acid*, HVA) (slika 4) je metabolit DOPAC-a [57]. Ovaj molekul takođe nastaje kao proizvod razlaganja polifenola usled dejstva bakterijskih enzima [67], kao i akteozida [70], aktivne komponente u kineskom *cistanche* čaju. Ovaj metabolit se često koristi kao biomarker koji se određuje u urinu kako bi se ispitao metabolizam dopamina, a koji može da reflektuje razvoj određenih bolesti [71]. Ukoliko je HVA prisutna u malim koncentracijama moguća je pojava depresije, anksioznosti i nesvestice. Zbog prisustva aromatičnog prstena, karboksilne, hidroksilne i metoksilne grupe, HVA može prolaziti kroz biološke membrane.

2.7. Vanililbademova kiselina

Vanililbademova kiselina (2-hidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)sirćetna kiselina, *vanillylmandelic acid*, VMA) (slika 4) nastaje kao metabolit epinefrina i norepinefrina [72]. Određivanje koncentracije VMA u biološkim uzorcima je od velikog značaja zbog toga što povećana količina može biti indikator poremećaja u metabolizmu neurotransmitera. Ovakvi poremećaji mogu dovesti do acidurije, stanja koje se karakteriše kao urođeni poremećaj metabolizma. Povećane koncentracije ovog metabolita su takođe primećene kod pacijenata sa gagleioneuroblastomom [73], hemodektomom (tumor karotidnog tela) [72], hronične dijareje [74], hipoksije, cistične fibroze pankreasa [75] i poremećaja čuvanja glikogena [74].

2.8. 3-Metoksitiramin

Najvažniji vanćelijski metabolit dopamina, 3-metoksitiramin (4-(2-aminoetil)-2-metoksifenol, 3-MT) (slika 4) nastaje metilacijom dopamina uz korišćenje enzima katehol-O-metiltransferaze (COMT) [76]. Ovo nije neaktivni metabolit, već može biti i neuromodulator [77] koji je u određenim slučajevima uključen u kontrolu pokreta. Delovanjem enzima monoamin oksidaze i aldehid dehidrogenaze 3-MT se razlaže u

HVA. Potpuna karakterizacija 3-MT molekula može biti važna za razumevanje patofiziologije poremećaja u mozgu koji mogu voditi do šizofrenije, Parkinsonove i drugih bolesti [78,79]. Prema literaturskim podacima 3-MT može biti dobar indikator smanjenog otpuštanja dopamina zbog toga se promena u koncentraciji ovog neurotransmitera brzo oslikava u promeni koncentracije metabolita [80]. Povećana koncentracija 3-MT, zajedno sa ostalim kateholaminima, je indikator tumora koji nastaju u adrenalnim i ekstra-adrenalnim hromatinskim ćelijama, feohromocitoma i paraganglioma (PPGL) [81,82]. Laboratorijski testovi su pokazali da je koncentracija ovog metabolita povezana sa veličinom tumora i genetikom PPGL [83–86], mada se precizna korelacija i dalje ispituje.

2.9. Tiramín

Tiramín (4-(2-aminoetil)fenol) (slika 4) je jedan od osnovnih biogenih amina. Ovaj molekul predstavlja intermedijer u sintezi oktopamina i metabolit razgradnje tirozina uz korišćenje tirozin dekarboksilaze. Tiramín biti prisutan u velikim koncentracijama u svežoj i fermentisanoj hrani kao što je meso, voće, sir, ribo i vino [87–89]. Ukoliko su prisutne veće koncentracije ovog jedinjenja aktivira se monoamin oksidaza. Dokaz da je tiramín neurotransmiter dobijen je otkrićem G proteinskog receptora sa velikim afinitetom za tiramín koji je označen kao TA1 i koji se nalazi u mozgu i perifernim organima. Pokazano je da tiramín predstavlja i pokretač migrene ali i da interaguje sa određenim lekovima protiv depresije [90].

2.10. Tirozin

Tirozin (L-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanska kiselina) je jedna od 20 osnovnih aminokiselina polarnog niza koja spada u grupu neesencijalnih aminokiselina. Tirozin je uključen u prenos signala, primanje fosforne grupe u radu proteinskih kinaza ali i kod biljaka u procesu fotosinteze tokom koga predaje elektron u reakciji redukcije oksidovanog oblika hlorofila. Tirozin u organizmu može nastati od fenilalanina delovanjem enzima fenilalanin hidroksilaze, ali se prvenstveno unosi hranom. Proizvodi bogati ovom aminokiselinom su piletina, ćuretina, jogurt i mlečni proizvodi, avokado, banane i drugi. Kod biljaka i drugih mikroorganizama, ova aminokiselina nastaje od prefenata, soli prefenske kiseline. Ostali procesi u koje je uključen tirozin su objašnjeni

kod dobijanja molekula L-DOPA čime se započinje sinteza kateholaminskih neurotransmitera. Takođe, tirozin predstavlja prekursor dobijanja alkaloida, prirodnih fenola, pigmenata i koenzima Q10. Proces degradacije tirozina je složen i završava se acetoacetatom i fumaratom. Kao lek tirozin se koristi kod prehlade, smanjenja stresa i poboljšanje spavanja.

2.11. Fenilalanin

Fenilalanin ((S)-2-amino-3-fenilpropanska kiselina) (slika 4) je takođe esencijalna aminokiselina koja se u organizam unosi hranom. U strukturi molekula se nalazi nepolarni benzenov prsten i alaninski niz. U organizmu fenilalanin je prekursor za neurotransmitere preko tirozina, delovanjem aromatične aminokiselinske hidroksilaze, pri čemu se u strukturu uvodi jedna hidroksilna grupa. Namernice koja sadrži ovu aminokiselinu su jaja, mleko, piletina i govedina. Biljke koriste fenilalanin u procesu sinteze flavonoida. Bolest fenilketonurija označava stanje organizma koji nije u mogućnosti da metaboliše fenilalanin zbog smanjene aktivnosti enzima fenilalanin hidroksilaze.

2.12. Feniletilamin

Feniletilamin (2-feniletan-1-amin) (slika 4) nastaje dekarboksilacijom fenilalanina i u organizmu se ponaša kao neuromodulator i tragaminski neurotransmitter. Pored ovakvog nastanka u organizam se feniletilamin takođe može uneti hranom. Osnovna struktura feniletilamina može biti supstituisana različitim grupama, tako da nastaje klasa supstituisanih feniletilamina, među kojima su i amfetamini. U kliničkim ispitivanjima se feniletilamin može koristiti kao marker hiperaktivnog poremećaja nedostatka pažnje (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder* – ADHD).

2.13. Oktopamin

Oktopamin ((RS)-4-(2-amino-1-hidroksi-etil)fenol) (slika 4) je fenolski analog norepinefrina. Poznato je da ovaj molekul ima funkciju neurotransmitera, neuromodulatora i neurohormona kod beskičmenjaka, kao što je oktopod. Ova supstanca ima sličan put sinteze kao norepinefrin, od koga se razlikuje u jednoj hidroksilnoj grupi. Kod insekata oktopamin ima važnu ulogu kod pokretanja funkcija koje imaju

neurotransmiteri kod drugih vrsta. Kod gastropoda oktopamin učestvuje u gašenju, a kod svitaca u aktiviranju bioluminiscencije. Kod artropoda ovaj molekul je zadužen za razvoj složenih socijalnih interakcija, kognitivne sposobnosti i lokomotorni aparat.

2.14. 6-Hidroksidopamin

6-Hidroksidopamin (5-(2-aminoetil)benzen-1,2,4-triol) (slika 4) je neurotoksin koji se koristi za veštačko izazivanje efekata sličnih onima kod Parkinsonovoj bolesti. Ovaj molekul se ponaša se kao simpatektomički¹ agens za nervne krajeve koji sadrže norepinefrin [91]. Prirodno 6-hidroksidopamin može nastati u toku razvoja šizofrenije, ukoliko postoji smanjena aktivnost enzima dopamin-β-hidroksilaze [92]. U literaturi je poznat mali broj analoga ove supstance koji imaju takvu neurotoksičnost. Formiranje 6-hidroksidopamina *in vitro* je moguće kroz procese koji uključuju formiranje o-hinonskog oblika dopamina ukoliko ne postoji ciklizacija alifatičnog niza, što se postiže protonovanjem ili supsticijom amino grupe u kiselim uslovima. Zaključak velikog broja istraživanja je da specifičnost delovanja 6-hidroksidopamina potiče od mogućnosti ulaska ove supstance u kateholaminske neurone. Lakoća oksidacije i/ili autoksidacije, formiranje vodonik-peroksida, superoksid jona, hinona, 5,6-dihidroksiindola, hidroksi-radikala ili singletskog kiseonika su mogući razlozi za brzo delovanje ove supstance kod ispitivanih životinja [93,94].

2.15. Katehol

Katehol (benzen-1,2-diol) (slika 4) se prirodno nalazi u malim količinama u voću i povrću. Njegovom polimerizacijom dolazi do promene boje jabuka ili krompira prilikom stajanja. Kateholna jedinica je čest strukturni element molekula koji postoje u prirodi kao što su kateholamini, katehin i drugi. Katehol je uključen u ispitivanja u okviru teze kako bi se prokomentarisao odvojeno uticaj kateholne jedinice i uporedila aktivnost sa ostalim molekulima.

¹ Hirurški proces kojim se preseca deo simpatičkog nerva ili uklanjanju ganglije kako bi nestao procesa koji je pod uticajem njegove stimulacije. U ovom značenju se odnosi na veštačko dodavanje supstance kako bi se blokirali nervi koji sadrže norepinefrin.

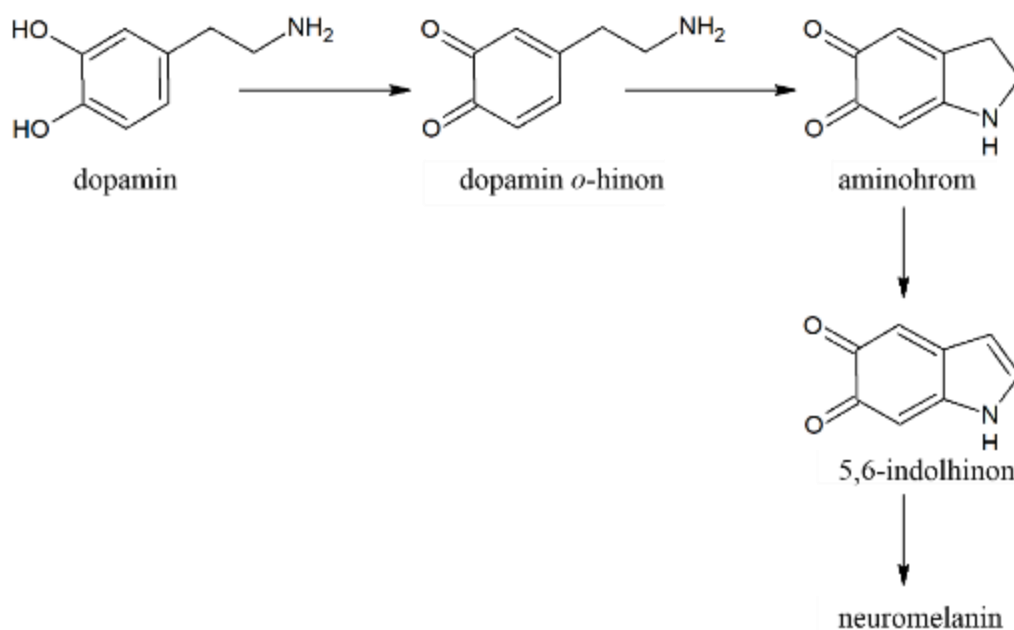
3. Teorije razvoja neurodegenerativnih bolesti, uticaj slobodnih radikala

Dejstvo slobodnih radikala prisutno je u procesu razvoja većeg broja neurodegenerativnih oboljenja. Zbog količine kiseonika koja se koristi u mozgu i centralnom nervnom sistemu (CNS) očekivano je da prisutni molekuli budu pod stalnim dejstvom reaktivnih vrsta, posebno kiseonika i azota. Preko 20% ukupne koncentracije kiseonika se troši u mozgu, iako on čini samo 2% ukupne mase tela [7]. Pored ovoga u mozgu se nalazi relativno manje antioksidanasa nego u drugim delovima tela kao i veća količina nehemskog gvožđa. Neurodegenerativne bolesti (NDB) se mogu opisati kao stanje organizma u kome nervne ćelije mozga i kičmenog stuba gube funkciju (ataksija) ili postoji njihova senzorna disfunkcija (demencija). Mitohondrijalna disfunkcija koja se završava apoptozom je uočena kod većine NDB. Jedan od pratećih efekata je povećanje količine redoks metala što ukazuje na njihov abnormalni metabolizam u ovim bolestima [95]. Neuronu su posebno podložni uticaju reaktivnih vrsta zbog prisustva nezasićenih lipida koji podležu reakcijama peroksidacije na mestima dvostrukih veza. Nakon delovanja ROS i RNS na jedan lanac lipida proizvodi koji nastaju kaskadno napadaju ostale molekule u okruženju i time stvaraju značajne strukturne promene lipidnih slojeva. I pored velikog broja dokaza koji ukazuju na povezanost oksidacionog stresa i neurodegenerativnih bolesti uzročna veza je i dalje diskutabilna [96]. Antioksidansi koji se nalaze u CNS-u na nekoliko načina mogu smanjivati delovanje slobodnih radikala: direktnim uklanjanjem molekulskog kiseonika, kompleksiranjem metala potrebnih za reakcije Fentonovog tipa, reakcijama sa prekursorima i inhibicijom formiranja reaktivnih vrsta. Ukoliko je aktivnost antioksidanasa nedovoljna tokom dužeg vremena su moguće ireverzibilne promene na strukturama koje dovode do razvoja bolesti.

Očekivano bi bilo da se antioksidansi koji se unesu u organizam mogu uključiti u borbu protiv slobodnih radikala. Međutim, postoji niz poteškoća prilikom prelaska sa laboratorijskih na *in vivo* uslove. Sve supstance koje bi se potencijalno mogle koristiti kao antioksidansi u CNS-u moraju da ispunjavaju uslov prolaska kroz krvno-moždanu barijeru [39]. Mali broj molekula može proći ovu barijeru i zbog toga je sve veći značaj molekula koji se prirodno nalaze u ljudskom organizmu.

3.1. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest je jedna od najčešćih neurodegenerativnih bolesti za koju je karakteristično da dolazi do uništavanja dopaminskih neurona, posebno neurona u strukturi bazalnih ganglija koja se naziva *substantia nigra* (*substantia nigra pars compacta*). Među mogućim razlozima koji dovode do degradacije dopaminskih neurona navode se i mitohondrijalna disfunkcija, degradacija lipozomalnog i proteazomalnog sistema, neuroinflamacija, agregacija alfa-sinukleina do toksičnih oligomera i oksidacioni stres. Jedini do sada poznati lek za ovu bolest je L-DOPA preko koga se povećava koncentracija dopamina.



Slika 5 Proces nastanka neuromelanina

Smatra se da je proces oksidacije dopamina do neuromelanina normalan i da ne utiče na aktivnost dopaminskih neurona (strukture prikazane na slici 5). Ovo je složen proces koji se sastoji od oksidacije dopamina do *o*-hinona koji se zatim ciklizacijom lanca prevodi u aminohrom. Dobijeni molekul se zatim protonuje i nastaje leukoaminohrom koji polimerizacijom daje neuromelanin. Kao što je prodiskutovano u nastavku [97,98], dopamin ima veliki afinitet ka kompleksiranju Fe^{3+} i Cu^{2+} jona pri čemu ih redukuje i omogućava nastavak reakcija Fentonovog tipa u kojima nastaju nove količine slobodnih radikala. Ove vrste utiču na α -sinkulein i dodatno stvaraju plakove kod Parkinsonove

bolesti. Uticaj azot-monoksida i njegovih derivata je takođe dokazan u studijama u kojima je praćena inhibicija neuronske azot-oksida sintetaze što je preventivno uticalo na razvoj ove bolesti [99,100].

3.2. Alchajmerova bolest

Alchajmerova bolest se odlikuje progresivnim gubitkom kognitivnih sposobnosti. Pravi uzrok ove bolesti i dalje nije poznat. Dejstvo oksidacionog stresa je posredno uočeno u razvoju ove bolesti kroz lipidnu peroksidaciju, povećanu aktivnost superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze (u hipokampusu i amigdali) [39]. Formiranje plaka kod osoba sa Alchajmerovom bolešću, od β -amiloida, takođe može biti zbog prisustva slobodnih radikala, kao što je pokazano na transgenskim modelima miševa u studiji Papola (*Pappola*) i saradnika [101]. Značaj kateholamina u sprečavanju razvoja Alchajmerove bolesti je pokazan u studiji Sanoa (*Sano*) i saradnika [102], u kojoj je korišćen selegilin, inhibitor monoamine oksidaze, koja prevodi kateholamine u njihove kiselinske parove. Pokazano je da delovanje ovog leka dovodi do usporavanja napretka bolesti kod pacijenata u srednjim stadijumima.

3.3. Šizofrenija

Štein (*Stein*) i Vajs (*Wise*) su 1971. godine predložili teoriju razvoja šizofrenije na osnovu povećane koncentracije 6-hidroksidopamina kod obolelih osoba. Kao što je prethodno pomenuto, do povećanja koncentracije 6-hidroksidopamina je moguće doći zbog smanjene aktivnosti dopamin- β -hidrolaze koja prevodi dopamin u norepinefrin. Ovaj enzim, uz korišćenje askorbinske kiseline i kiseonika, daje norepinefrin, dehidrokisaskorbinsku kiselinu i vodu. Ukoliko je prisutna veća koncentracija dopamina, odnosno hinonskog oblika molekula, može nastatati i pomenuti neurotoksin. Dokazi delovanja reaktivnih vrsta u razvoju ove bolesti su i povećanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije u krvi pacijenata i promenjene koncentracije enzimskih i ne-enzimskih antioksidanasa [103]. Kod muških pacijenata je uočena i smanjena količina mokraćne kiseline, dok je njena količina u plazmi bila obrnuto proporcionalna napretku bolesti [39].

3.4. Amiotrofična lateralna skleroza

U etiologiji razvoja amiotrofične lateralne skleroze (ALS) leži povećanje depozicije proteina sa promenjenim konformacijama na neuronima cerebralnog korteksa i kičmenog stuba. Superoksid dismutaza menja funkciju zbog gubitka aktivnog mesta za Cu/Zn i tako postaje pro-oksidans koji učestvuje u dobijanju reaktivnih vrsta [104]. Kod pacijenata sa ALS uočena je i povećana količina karbonilnih jedinjenja nastalih oksidacijom proteina koji su i markeri proteinske oksidacije. Razvoj bolesti prati i povećanje koncentracije 2-tiobarbiturske kiseline, vitamina E i malonaldehida koji je marker lipidne peroksidacije [39].

4. Značaj neurotransmitera u borbi protiv oksidacionog stresa – pregled literature

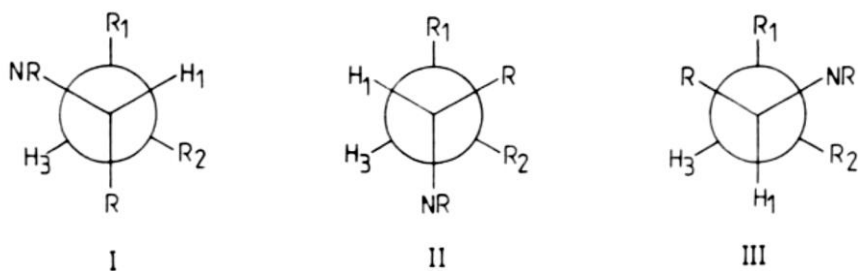
U ovom poglavlju je dat pregled literaturnih podataka o odabranim molekulima koji su eksperimentalno ispitani u okviru teze. Zbog veoma obimne literature koja je dostupna, prikaz je podeljen u nekoliko delova – prvi se odnosi na optimizaciju strukture neurotransmitera i poređenje sa eksperimentalnim podacima, drugi na eksperimentalno ispitivanje antioksidacione aktivnosti molekula, treći na teorijske mehanizme prema različitim radikalima i poslednji na interakcije sa goveđim serum albuminom.

4.1. Optimizacija struktura i poređenje sa eksperimentalnim spektrima

Ispitivanje strukture i konformacije neurotransmitera išlo je uporedo sa razvojem eksperimentalnih i teorijskih metoda. Kao što je pomenuto u prethodnom poglavlju pravilno određivanje strukture je osnov razumevanja biološke aktivnosti ovih molekula. Vrlo važan aspekt ove analize je protonovanje amino grupe kod dopamina, norepinefrina i epinefrina, zbog reakcija u biološkim sistemima koje se najčešće dešavaju na fiziološkoj pH vrednosti, pH=7,4. Eksperimentalno je određeno da se deprotonovanje ovih molekula dešava na pH vrednostima koje su između 8 i 10 [105,106]. Ustanovljeno je postojanje tri stabilna konformera za pomenute neurotransmitere, dve kose (*gauche*) i jedan *trans*, zbog moguće rotacije oko ugljenikovih atoma alifatičnog niza. Kod *trans* konformera amino grupa je na suprotnom kraju od kateholne jedinice, dok je u kosom konformeru iznad ove grupe. Njumanove (*Newman*) projekcije stabilnih konformera su prikazane slici 6. Gubitak protona takođe smanjuje udeo kosog konformera sa 0,87 na 0,6 [106] pri čemu su energetske razlike između konformera male tako da je očekivana njihova interkonverzija u rastvorima. Ovo ukazuje i na moguće interakcije protonovane amino grupe sa kateholnom jedinicom.

Konformacije protonovanog/deprotonovanog dopamina su teorijski bili ispitane u većem broju radova [107–111]. U radu Urbana (*Urban*) i saradnika [108], korišćenjem Ostin (*Austin Model 1*, AM1) semiempirijskog modela, zaključeno je da je za neutralni dopamin najstabilniji konformer I/III sa slike 6, odnosno kosog konformera sa uglom između kateholne jedinice i ostatka alifatičnog niza od 90°. Prilikom ispitivanja strukture protonovanog dopamina mapa energija je bila komplikovanija. Razlika energija između

kosog i *anti* je bila 9 kJ/mol, pri čemu je kosi konformer stabilniji u gasu. Za strukturu u kojoj je deprotonovana hidroksilna grupa, najstabilniji konformer takođe ima pomenutu strukturu. Isti raspored energija konformera je dobijen i u radu Nagija (*Nagy*) i saradnika [107], pri čemu su razlike između kosog konformera bile bliske nuli, dok su između kosog i *trans* konformera bile između 13,4 i 23,4 kJ/mol, zavisno od korišćenog bazisnog skupa i nivoa elektronske korelacije prilikom dobijanja unutrašnje energije. Pokazano je da dve hidroksilne grupe mogu formirati vodoničnu vezu i da su koplanarne su sa aromatičnim prstenom. Stabilizacija kose strukture objašnjena je π -katjon intramolekulskim interakcijama, označenim kao $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$, u kojima je Ar aromatični prsten [112,113]. U gasovitoj fazi je registrovano i sedam različitih konformera dopamina što ukazuje na malu energetska razliku između struktura [114].



Slika 6 Njumanove projekcije tri stabilna konformera za rotaciju oko $\text{C}_\alpha - \text{C}_\beta$ veze alifatičnog niza I-kosa, II-*anti* i III-kosa ($\text{R}=\text{CH}_3$ za epinefrin, H za dopamin i norepinefrin, R_1 = katehol za sva tri, $\text{R}_2=\text{OH}$ za epinefrin i norepinefrin, H za dopamin [106])

Konstatovano je da su u rastvoru ove interakcije delom oslabljene zbog rastvarač-rastvorak interakcija, koje su uporedive jačine, tako da se prilikom rastvaranja povećava udeo *anti*-konformera [113] kao i broj stabilnih struktura [107,115]. Proces deprotonovanja dopamina je, zbog postojanja nekoliko reakcionih puteva, teorijski ispitan u radu Kaleara (*Callear*), Korone-Avedanjoa (*Corona-Avedaño*) i saradnika [116,117]. Konstatovano je da, ukoliko se deprotonovanje prvo vrši preko hidroksilnih grupa, nastaje *zwitter*-jon, a ukoliko se dešava preko amino grupe nastaje neutralni molekul. Između ova dva oblika molekula postoji ravnoteža [118]. Na osnovu energija struktura, optimizovanih na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou, zaključeno je da je prvi korak deprotonovanje sa amino grupe, drugi sa *m*-OH grupe u odnosu na alifatični niz i treći sa *p*-OH grupe, što potvrđuju i vrednosti hemijskih pomeraja u NMR eksperimentima. Poznato je da se „biološki

relevantna“ konformacija često razlikuje od energetskeg minimuma dobijenog kvantno-hemijskim proračunima. Anduhar (*Andujar*) i saradnici [119] su analizirali moguće konformere dopamina u interakciji sa D2-DR receptorom, pri čemu je najveći broj mogućih konformera formirao vezu između protonovane amino grupe i Asp86, kao i hidroksilnih grupa i serina u različitim položajima. Poređenje eksperimentalnih i teorijskih vibracionih spektara dopamina je urađeno u radovima Lagučenkova (*Lagutschenkov*), Misra (*Misra*), Ja (*Jha*) i njihovih saradnika [120–122], pri čemu je dobro slaganje dobijeno za optimizovanu strukturu na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou teorije. Infracrveni i ramanski spektri dopamina i uticaj vodoničnih veza su detaljno ispitani u radu Jidava (*Yidav*) i saradnika [123].

U strukturi epinefrina i norepinefrina postoji mogućnost građena vodonične veze između hidroksilne i amino grupe što utiče na mogućnost ostvarivanja interakcija alifatičnog niza i π -elektronskog sistema [124–129], ali i povećava broj stabilnih konformera. Manja razlika u energijama stabilnih konformera je upravo posledica postojanja dodatnih intramolekulskih interakcija. U studiji Snoeka (*Snoek*) i saradnika [130] ispitivane su moguće konformacije norepinefrina prilikom primene metode optičke spektroskopije u gasnoj fazi [131–133]. Ova metoda se zasniva na principu da supstance u gasovitoj fazi, prethodno laserski desorbovane sa nosača, prolaze kroz otvor u vakuum gde se usled slobodnog širenja hlade. Molekuli koje prelaze iz jednog konformera u drugi se u ovom procesu brzim hlađenjem fiksiraju u najstabilnije geometrije. Ukoliko energetske barijere nisu velike molekuli nakon hlađenja ostaju u malom broju mogućih struktura što ukazuje na njihovu veliku fleksibilnost. Elektronski spektri su snimljeni korišćenjem rezonancijom pojačane multifoton jonizacije (*Resonance enhanced multi photon ionization* – REMPI). Eksperimentalno je potvrđeno da se norepinefrin u gasnoj fazi nalazi u samo jednoj konformaciji. Najstabilnija struktura norepinefrina, označena kao AG1a, ima produžen etanolaminski niz u kome postoji vodonična veza između amino i hidroksilne grupe. Prodiskutovano je i da relativna stabilnost konformera zavisi i od upotrebljenog nivoa teorije, odnosno metoda i baznog skupa [127,134]. Nakon protonovanja uočeno je da je pet konformera prisutno u gasu na niskoj temperaturi, od toga tri u kosom obliku, dok su dva u izduženoj formi koje su za 9-10 kJ/mol manje stabilne u odnosu na kose konformere [135]. Dobijeni rezultat ukazuje na važnost katjon- π -elektronski oblak interakcija između protonovane amino grupe i prstena. U istom tipu

eksperimenta [126], kod epinefrina su uočena dva konformera koji su imali izduženu struktru, sličnu norepinefrinu, sa vodoničnim vezama između hidroksilne i amino grupe alifatičnog niza i između hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu. Uočeno je da dva dobijena konformera imaju različit relativni položaj vodonika i metil-grupe na azotu u odnosu na hidroksilnu grupu alifatičnog niza. Izračunata razlika energija, na MP2/aug-cc-pVDZ sa skaliranim B3LYP/6-31+G* nultim energijama, iznosi 2,18 kJ/mol što ukazuje da je prelaz moguć i na nižim temperaturama. Slično ponašanje norepinefrina i epinefrina je uočeno prilikom poređenja struktura u vakumu i vodi kao i u slučaju dopamina [124,128,129]. Dodatna optimizacija sa molekulom vode dovodi do raskidanja vodonične veze unutar alifatičnog niza što ukazuje da su jače intermolekulske vodonične veze sa rastvaračem [136]. Eksperimentalni spektri ova dva neurotransmitera su upoređeni sa teorijskim u više radova [124,126,128,137].

L-DOPA je ispitivan istom tehnikom kao što je opisano za norepinefrin i epinefrin [138]. Analizom IC spektara i poređenjem sa optimizovanim strukturama, na B3LYP/cc-pVDZ nivou, zaključeno je da je jedna od kateholnih OH grupa slobodna dok je druga vezana vodoničnom vezom. Takođe je pokazano da u alifatičnom nizu postoji vodonična veza u kojoj je hidroksilna grupa donor vodonika a azot amino grupe akceptor. Konstatovano je da obe grupe alifatičnog niza su iznad kateholne jedinice tako da postoje i slabe dipol-dipol interakcije između hidroksilnih grupa prstena i amino i karboksilne grupe lanca. Najstabilnija struktura određena je i kvatno-hemijski korišćenjem većeg broja metoda, sa i bez disperzionih interakcija. Vibracioni spektri su asignirani na osnovu optimizacije strukture na B3LYP/6-311+G* nivou teorije [139]. Takođe je ispitan proces deprotonovanja molekula sa karboksilne grupe [140–142].

DOPAC, važan metabolit dopamina, je analiziran kvatno-hemijskim metodama i IC spektroskopijom, nakon izolovanja iz matrice [143], i ramanskom spektroskopijom u čvrstom stanju [144]. Teorijski je, na B3LYP/6-311++G(d,p) i MP2/6-311++G(d,p) nivoima teorije, pokazano postojanje 13 stabilnih konformera. Eksperimentalno je određen samo najstabilniji konformer molekula. Pokazano je da stabilnost konformera određuju efekat hiperkonjugacije unutar strukture koja sadrži kateholnu jedinicu i karboksilnu grupu, slabe O-H $\cdots\pi$ interakcije i vodonična veza između dve OH grupe.

Ukoliko je u strukturi molekula prisutna jedna hidroksilna grupa manje dolazi do smanjenja rigidnosti strukture i povećanja broja konformera u gasovitoj fazi, kao što je

dobijeno u slučaju tirozina, tiramina i oktopamina. U spektrima tirozina nađeno je do 12 stabilnih konformera, u zavisnosti od primenjene tehnike [145–149]. Detaljnom analizom strukture moglo se zaključiti da je ovo posledica slabijih interakcija hidroksilnih grupa prstena sa grupama na alifatičnom nizu u različitim rotamerima [138]. Spektar oktopamina, analoga norepinefrina, pokazuje prisustvo četiri stabilna konformera u gasovitoj fazi na niskom pritisku i to dve konformacije aaminskog lanca pri čemu svaka od njih ima dva rotamera hidroksilne grupe sa prstena [150]. Detaljna kvantno-hemijska razmatranja ovog metabolita nisu urađena. Vibracioni spektri tiramina su asignirani na osnovu optimizacije strukture na B3LYP/6-311G(d,p) nivou teorije pri čemu je dobijeno dobro slaganje rezultata [121,151]. IC i disperzionom fluorescentnom spektroskopijama je utvrđeno postojanje sedam konformera tiramina u gasu na niskoj temperaturi [152], usled slobodne rotacije hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu i prisustva etilaminskog lanca. Veći broj konformera ovog molekula je dobijen za komplekse sa molekulima vode [153]. Mikrotalasnom apsorpcionom spektroskopijom su eksperimentalno ispitana četiri najstabilnija konformera tiramina. Kao i kod prethodnih molekula sa hidroksilnom grupom u *p*-položaju prisutan je veći broj konformera nego kod analoga sa kateholnom grupom [154]. Interakcije tiramina u čvrstom stanju i rastvoru su takođe teorijski i eksperimentalno ispitane u radovima Kuevedoa (*Quevedo*), Ričardsona (*Richardson*) i njihovih saradnika [155,156].

Iako je katehna jedinica važan parametar u strukturi neurotransmitera, koji ima ulogu u održavanju stabilnosti konformera prilikom interakcije sa receptorima [145], metaboliti češće imaju jednu hidroksilnu i jednu metoksilnu grupu. U radovima Fronera (*Forner*), Samsonoviča (*Samsonowicz*) i njihovih saradnika struktura HVA je optimizovana B3LYP metodom a vibracioni spektri asignirani na osnovu PED analize [144,157]. ¹H i ¹³C NMR spektri HVA su takođe analizirani u radu Samsonoviča i saradnika [157]. U radovima Samsonoviča i saradnika [157,158] su takođe, eksperimentalno i teorijski, ispitane soli ove kiseline sa alkalnim metalima i određena njihova biološka aktivnost.

Feniletilamin i fenilalanin su najjednostavnija jedinjenja korišćena u tezi. Rezultati pokazuju da broj konformera feniletilamina u gasovitoj fazi zavisi od primenjene tehnike, dve kose geometrije su dobijene primenom mikrotalasne spektroskopije [159], četiri dvofotonskom jonizacijom [160], pet fluorescentnom

eksitacijom i disperzionom emisionom spektroskopijom [161] kao i drugim tehnikama i u kompleksima sa različitim molekulima [162–166]. Za fenilalanin je prvo određeno pet konformera primenom laserski indukovane fluorescencije, a zatim i veći broj teorijski i eksperimentalno dobijenih konformera sa različitim intramolekulskim interakcijama: vodoničnom vezom između amino i hidroksilne grupe, elektrostatičkim interakcijama između karboksilnog vodonika i karbonilnog kiseonika, karboksilnog kiseonika i aromatičnog vodonika kao i interakcije polarnih grupa sa π -elektronima [167–170]. Određen je i broj konformera protonovanog fenilalaina [171], monohidratnog kompleksa [172]. Za ostale ispitivane molekule nisu poznata detaljnija strukturna ispitivanja.

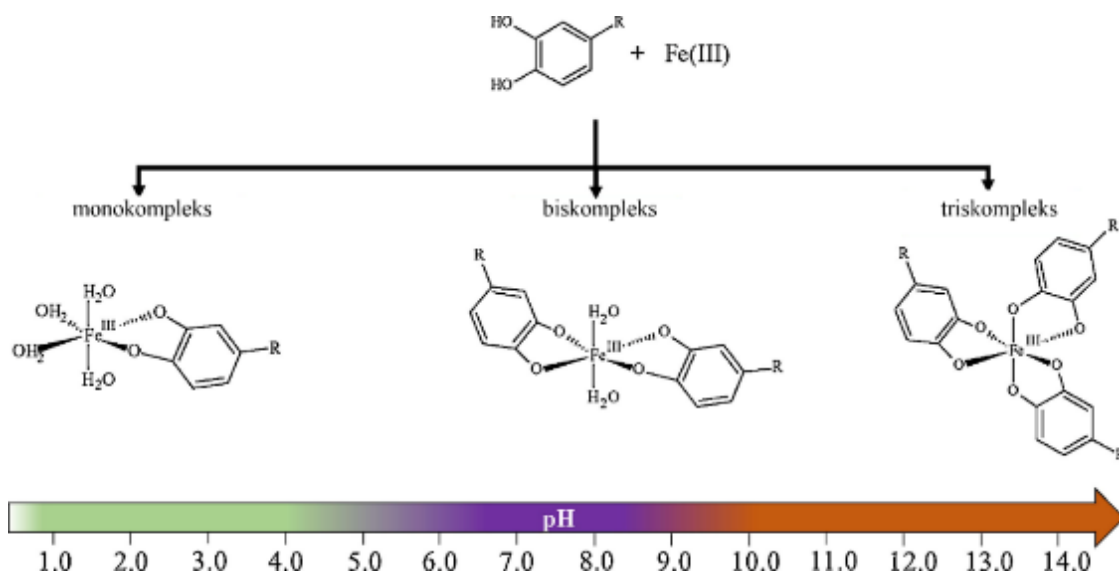
4.2. Antiradikalska aktivnost neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita

Antiradikalska aktivnost odabranih jedinjenja je ispitivana prema većem broju radikala. Većina dostupne literature je ograničena na neurotransmitere, ali ne i na njihove metabolite. Gulčin (*Gülçin*) je ispitivao antioksidacionu aktivnost epinefrina prema 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis(3-etilbeztiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS^{•+}), *N,N'*-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD^{•+}), superoksid radikal-anjonu, vodonik peroksidu, redukcionu sposobnost prema feri i kupri jonima i helirajuću aktivnost prema fero jonima [173]. Rezultati su upoređeni sa standardnim antioksidansima – troloksom, α -tokoferolom, butilovanim hidoksianizolom (BHA) i butilovanim hidroksitoluenom (BHT). Epinefrin je prema DPPH radikalu pokazao aktivnost uporedivu sa aktivnošću standardnih jedinjenja, α -tokoferola i troloksa. Aktivnost epinefrina prema ABTS radikal-katjonu je bila ista kao za standarde, sa razlikom α -tokoferola koji je bio najslabiji. Prema DMPD radikal-katjonu epinefrin je pokazao bolju aktivnost od troloksa. Najveću aktivnost u odnosu na korišćene standarde epinefrin je imao prema superoksid radikal-anjonu. Redukcija metalnih jona je u slučaju epinefrina bila manje izražena dok je sposobnost heliranja bila uporediva sa standardima. Aktivnost istog neurotransmitera prema terc-butoksil-radikalu i benzofenonu u pobuđenom tripletskom stanju je određivana tehnikom laserske fleš fotolize [174]. Rezultati su pokazali da je epinefrin bolji gasilac ovih radikala od fenola, ali slabiji od α -tokoferola.

Antiradikalska aktivnost dopamina, L-DOPA, epinefrina i norepinefrina je ispitana spektrofotometrijski i prema galvanoksil- i kumiloksil-radikalima [175].

Aktivnost prema kumilperoksil-radikalu ispitana je primenom EPR spektroskopije [176]. Dopamin je prema galvanoksil-radikalu pokazao tri puta veću aktivnost nego ostali pomenuti molekuli, dok je aktivnost prema kumiloksil-radikalu bila vrlo slična za sve ispitivane neurotransmitere i uporediva sa standardom, (+)-katehinom. Katehin u strukturi sadrži kateholnu jedinicu i na osnovu ovakvih eksperimenata se moglo pretpostaviti da njegova dobra aktivnost potiče od ovog strukturnog elementa. Dodatak metalnih jona, Mg^{2+} , je dodatno ubrzavao reakciju dopamina sa galvanoksil-radikalom što je navelo na zaključak da je mogući mehanizam delovanja metal-jon spregnuti prenos elektrona (*metal-ion coupled electron transfer* – MICT) praćen prenosom protona. U radu Šimicua (*Shimizu*) i saradnika su, spektrofotometrijski i EPR spektroskopijom, analizirane reaktivnosti dopamina, norepinefrina, epinefrina, L-DOPA, tirozina i (+)-katehina prema DPPH radikalu. Aktivnost istih molekula prema superoksid radikal-anjonu ispitana je primenom EPR spektroskopije [177]. Reaktivnost prema DPPH radikalu za sve neurotransmitere je bila uporediva, pri čemu su dobijene vrednosti bile bolje u odnosu na standard, askorbinsku kiselinu. U ovim eksperimentima tirozin nije pokazao aktivnost. Rezultati su pokazali da reaktivnost prema superoksid radikal-anjonu opada u sledećem nizu: dopamin > L-DOPA > norepinefrin > askorbinska kiselina > epinefrin > tiramin. Isti redosled aktivnosti molekula je dobijen i primenom WST-1 i EPR spektroskopije. Aktivnost norepinefrina i epinefrina prema singletskom kiseoniku je bila uporedljiva dok je aktivnost dopamina i L-DOPA, takođe prema singletskom kiseoniku, bila manja a aktivnost natrijum-azida i katehina, koji su uzeti za standarde, mnogostruko manja. Ovaj rezultat se smatra veoma važnim zbog biološkog uticaja singletskog kiseonika i njegovog radikalskog karaktera. Rezultati pomenute studija su pokazali da je aktivnost kateholamina velika prema reaktivnim vrstama. Isti kateholamini su ispitivani i u reakciji sa hidroksi-radikalom [178]. Dobijene konstante brzina reakcija su reda veličine $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. U radu Sarbua (*Sârbu*) i Kasonija (*Casoni*) takođe je ispitana antiradikalska aktivnost većeg broja biogenih amina prema DPPH radikalu [179]. Molekul L-DOPA je imao vrednost parametara EC_{50} uporedivu sa kvercetinom, dok su dopamin, epinefrin, norepinefrin i katehol ($EC_{50} \approx 10 \times 10^{-6} \text{ M}$) pokazali bolju aktivnost od askorbinske kiseline, troloksa i α -tokoferola i aktivnost istog reda veličine kao i kafeinska kiselina. Metabolit dopamina, 3-metoksitiramin, je imao vrednost EC_{50} parametra $63,16 \times 10^{-6} \text{ M}$, tirozin $44,91 \times 10^{-6} \text{ M}$, dok tiramin nije pokazao merljivu

aktivnost. Ova detaljna studija je ukazala da pored kateholne jedinice i krajnje grupe alifatičnog niza mogu imati uticaja na ukupnu aktivnost molekula. Pored antiradikalске aktivnosti izražene kroz EC_{50} , parametar reaktivnosti je takođe i brzina reakcije sa DPPH radikalom. Na osnovu ovog parametra ispitivani molekuli su podeljeni u tri grupe: u prvoj grupi su molekuli kod kojih reakcija dostiže ustaljeno stanje u toku prvog minuta, kod druge grupe do desetog minuta dok se kod treće grupe ustaljeno stanje ne postiže ni posle 30 minuta. Vreme reakcije dobro reflektuje vrednost EC_{50} . U radu Mukaija (*Mukai*) i saradnika [180] su pored neurotransmitera ispitivani, spektrofotometrijski, i 6-hidroksidopamin i 5-hidroksidopamin i njihova antiradikalска aktivnost prema aroksil- i α -tokoferoksil-radikalima. Konstante brzina reakcija 5-hidroksidopamina i 6-hidroksidopamina su bile veće 4,4 i 98,2 puta od istih parametara dopamina za aroksil-radikal, dok su za α -tokoferoksil-bile veće 40 i 864 puta, respektivno. Efekat dopamina i molekula L-DOPA je ispitan i na peroksidaciju metil-linoleata u Triton X-100 micelama [181]. Zaključeno da ove dve supstance zajedno sa α -tokoferolom uspešno sprečavaju oksidaciju u biološkim sistemima.



Slika 7 Strukture kompleksa gvožđa i kateholamina na različitim pH vrednotima
(modifikovano iz ref. [182])

Zbog kateholne jedinice u strukturi neurotransmitera primećeno je njihovo jako pro-oksidaciono dejstvo u sistemima Fentonovog tipa [97,98,182]. Kateholamini redukuju Fe(III) u Fe(II) i kiseonik do vodonik-peroksida i time stvaraju reaktante za

pomenutu reakciju u kiseloj sredini [182]. Na fiziološkim pH vrednostima ovakvi efekti nisu uočeni [98]. U baznim sredinama ove supstance se ponašaju kao antioksidansi. Pretpostavljeno je da se ovo dešava usled građenja kompleksa koji dodatno aktiviraju/deaktiviraju Fe(II) jone u rastvoru. Strukture kompleksa su date na slici 7.

4.3. Teorijsko ispitivanje mehanizma antiradikalske aktivnosti neurotransmitera

Teorijsko ispitivanje mehanizama aktivnosti je moguće izračunavanjem termodinamičkih parametara (promene entalpije i Gibsove slobodne energije reakcije) i/ili izračunavanjem konstanti brzina procesa. Prema metodologiji razvijenoj od strane Galano i saradnika [11,183] pretpostavljen je veći broj mogućih reakcionih mehanizama, pri čemu se najverovatniji mehanizam određuje na osnovu ukupne konstante brzine i pojedinačnih udela. Važan aspekt ovih proračuna je i kiselinsko-bazna ravnoteža, odnosno postojanje različitih protonovanih i deprotonovanih oblika molekula u određenom opsegu pH. Reakcije dopamina sa hidroksi- i peroksi-radikalima u radu [184] su modelovane na osnovu optimizovanih struktura reaktanata na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou. Teorijski mehanizmi antiradikalske aktivnosti su detaljnije opisani u poglavlju 7.3.14. Na osnovu izračunatih udela konstanti brzina za reakciju sa hidroksi-radikalom, dobijenih korišćenjem teorije prelaznog stanja za procese u kojima dolazi do prenosa vodonika ili protona, i Markusove teorije, za reakcije prenosa elektrona, dobijeni su sledeći rezultati: 36% SPLET, 7,3% HAT i 55,8% RAF. Na osnovu ovakvog udela konstanti brzina bilo je teško odrediti najverovatniji mehanizam reakcije zbog čega je pretpostavljeno da HAT i RAF mehanizmi, zbog različitih mesta koja mogu stupati u reakciju, daju veći broj produkata. Sa druge strane pokazano je da SPLET mehanizam daje deprotonovani produkt koji je zastupljen sa ukupno 36%. Ovaj produkt je najzastupljeniji i nastaje deprotonovanjem *p*-OH grupe u odnosu na alifatični niz. Za reakcije u lipidnoj sredini, modelovanoj u pentiletanoatu, takođe je dobijen niz mogućih proizvoda. Rezultati ukazuju da su reakcije sa peroksi-radikalom su mnogo brže u lipidnoj nego u vodenoj sredini što je posledica tzv. „polarnog paradoksa“ [185,186]. Prema ovom paradoksu polarni antioksidansi su aktivniji u lipidnom okruženju dok su nepolarni aktivniji u rastvorima emulzija, što se povezuje sa granicom faza i njihovim particionim koeficijentima [186]. Prema sličnoj metodologiji ispitane su reakcije

epinefrina i norepinefrina sa peroksil-radikalom [187]. Rezultati su pokazali da je SPLET najverovatniji mehanizam u vodenoj sredini dok je u lipidnoj sredini to HAT mehanizam, koji kreće sa *p*-OH. Proračuni su takođe pokazali da obe supstance brže reaguju sa radikalom od troloksa, što je u skladu sa eksperimentalnim rezultatima prikazanim u prethodnom paragrafu. U preglednom radu Galano je uporedila konstante brzina, za 51 supstancu, prema peroksi-radikalu, u odnosu na troloks kao standard [11]. U nepolarnoj sredini dopamin se našao na vrhu liste sa konstantom brzine reakcije koja je 240 puta veća u odnosu na vrednost za troloks. Vrednosti ukupne konstante brzine za epinefrin i norepinefrin su 49 i 38 puta veće u odnosu na vrednost za troloks, respektivno. Ukoliko se posmatraju reakcije u vodi prema istom radikalnom radikalnom konstante brzina su za norepinefrin, epinefrin i dopamin 24, 17,5 i 2,5 puta veće u odnosu na vrednost za troloks. Rezultati pokazuju da teorijska izračunavanja antioksidacione aktivnosti predviđaju dobru aktivnost, čak i u poređenju sa standardnim antioksidansima.

4.4. Interakcije kateholamina sa goveđim serum albuminom

U radu Čenga (*Zhang*) i saradnika [188,189] su ispitivane, voltametrijski i spektrofлуorimetrijski, interakcije molekula L-DOPA i dopamina sa goveđim serum albuminom (*Bovine Serum Albumin*, BSA). Pokazano je da oba procesa vezivanja prate Štern-Folmerov mehanizam ali da u slučaju molekula L-DOPA konstanta gašenja opada sa temperaturom dok kod kompleksa BSA-dopamin ona raste. Na osnovu toga je zaključeno da je gašenje fluorescencije BSA molekulom dopamina dinamičko. Na osnovu termodinamičkih parametara zaključeno je da se L-DOPA jače vezuje za protein zbog prisustva karboksilne grupe. Nedostatak eksperimentalnih podataka može se smatrati posledicom uskog opsega temperatura, na kojem se reakcija može pratiti, kao i koncentracije molekula. Interakcije ostalih supstanci korišćenih u ovoj tezi i molekula BSA nisu do sada ispitane.

5. Cilj rada

U okviru ove teze definisana su četiri cilja istraživanja:

Prvi cilj je strukturna karakterizacija ispitivanih molekula primenom eksperimentalnih spektroskopskih metoda i teorijskih izračunavanja, a za koje u literaturi ne postoje optimizovane strukture i poređenje sa eksperimentalnim spektrima. Ispitivani molekuli su 3-metoksitiramin, VMA, oktopamin i 6-hidroksidopamin. Poređenjem eksperimentalnih spektara sa teorijskim biće urađena potpuna asignacija traka u vibracionim spektrima (IC i ramanskim), asignacija rezonantnih maksimuma u NMR spektrima (^1H i ^{13}C), definisane orbitale za elektronske prelaze i prodiskutovan uticaj rastvarača na elektronske spektre. Metodama molekulskog dokinga biće dodatno ispitana reaktivnost ovih molekula prema biološki relevantnim makromolekulima.

Drugi cilj je određivanje odnosa struktura–aktivnost neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita prema sledećim vrstama: DPPH radikal, ABTS radikal-katjonu, hidroksi-, superoksid radikal-anjon i askorbil-radikal. Različiti mehanizmi će biti teorijski ispitani i, na osnovu termodinamičkih i kinetičkih parametara, prodiskutovana verovatnoća odigravanja svakog od njih u nekoliko rastvarača. Posebna pažnja biće posvećena razlikovanju HAT i PCET mehanizma.

Treći cilj doktorske disertacije je ispitivanje strukturnih parametara neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita važnih za interakcije sa goveđim serum albuminom. Vezivanje će eksperimentalno biti ispitano spektrofluorimetrijski, a teorijski metodom molekulskog dokinga.

Četvrti cilj je potpuno spektroskopsko, kristalografsko i teorijsko ispitivanje sintetisanog molekula, 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona, derivata kumarina i dopamina, dva molekula od biološke važnosti. Dodatno je ispitana i antitumorska aktivnost novosintetisanog jedinjenja i upoređena sa aktivnošću roditeljskog molekula, 4-hidroksikumarina.

6. Eksperimentalne i teorijske metode

6.1. Hemikalije

Za eksperimente u okviru doktorske teze su korišćeni rastvarači bili „spektroskopskog stepena čistoće“, dok su ostale hemikalije bile *p.a.* stepena čistoće.

Korišćene hemikalije

1. Dopamin hidrohlorid – Sigma Aldrich, SAD
2. Noepinefrin hidrohlorid – Sigma Aldrich, SAD
3. Epinefrin – Sigma Aldrich, SAD
4. Katehol – Sigma Aldrich, SAD
5. 6-Hidroksidopamin hidrohlorid – Sigma Aldrich, SAD
6. 3-Metoksitiramin – Sigma Aldrich, SAD
7. Homovanilinska kiselina – Sigma Aldrich, SAD
8. Oktopamin hidrohlorid – Sigma Aldrich, SAD
9. 3,4-Dihidroksifenilsirćetna kiselina (DOPAC) – Sigma Aldrich, SAD
10. L-3,4-Dihidroksifenilalanin (L-DOPA) – Sigma Aldrich, SAD
11. Tiramin – Sigma Aldrich, SAD
12. Feniletilamin – Sigma Aldrich, SAD
13. Fenilalanin – Sigma Aldrich, SAD
14. Tirozin – Sigma Aldrich, SAD
15. Vodonik peroksid – Sigma Aldrich, SAD
16. Hlorovodonična kiselina – Merck, SAD
17. Metanol – Uvasol, min 99%, Merck, SAD
18. Dimetilsulfoksid (DMSO) – Sigma Aldrich, SAD
19. Gvožđe(II)-sulfat – Sigma Aldrich, SAD
20. 2,2-Difenil-pikrilhidrazil-radikal – DPPH – Sigma Aldrich, SAD
21. Kalijum-persulfat – Sigma Aldrich, SAD
22. 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) – Sigma Aldrich, SAD
23. Goveđi serum albumin (BSA) – Sigma Aldrich, SAD
24. Toluen – Sigma Aldrich, SAD

- 25. Etanol – Sigma Aldrich, SAD
- 26. 4-Hidroksikumarin – Sigma Aldrich, SAD
- 27. Kalijum-hlorid – Sigma Aldrich, SAD
- 28. Natrijum-hlorid – Sigma Aldrich, SAD
- 29. Natrijum-hidrogenfosfat – Sigma Aldrich, SAD
- 30. Kalijum-dihidrogenfosfat – Sigma Aldrich, SAD

6.2. Eksperimentalne metode, instrumenti i uslovi snimanja

U okviru ove doktorske teze korišćene su sledeće eksperimentalne metode: ultraljubičasta-vidljiva (ULj-VID) spektroskopija, elektronska paramagnetska rezonantna spektroskopija (EPR), ciklična voltametrija (CV), infracrvena (IC) i Ramanska spektroskopija i nuklearna magnetska rezonantna (NMR) spektroskopija. U nastavku su prikazane korišćene tehnike, uslovi snimanja i aparati.

6.2.1. Elektronska spektroskopija

Tehnika elektronske spektroskopije (ULj-Vid) se može koristiti i za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Položaj trake u spektru odgovara energiji potrebnoj za prelaz između dva energetska nivoa i posledica je strukture. Širina trake u elektronskim spektrima može ukazati na specifične interakcije sa rastvaračem, kao što su vodonična veza. Svaka promena rasporeda elektronske gustine unutar molekula dovodi do pomeranja traka (batohromno ili hipsohromno) ili promene intenziteta (hiperhromno ili hipohromno). Kvantitativna analiza se zasniva na primeni Lamber-Berovog zakona, odnosno linearne zavisnosti apsorpcije od koncentracije, koja važi ukoliko su ispunjeni određeni uslovi koji se posebno odnose na koncentraciju ispitivane supstance, ali i interakcije sa rastvaračem.

Danas se najčešće koriste dvozračni spektrofotometri koji kao izvor zračenja koriste kontinualne izvore (volframovu nit za vidljivu oblast i vodoničnu lampu za ultraljubičastu). Drugi delovi uključuju monohromator i detektor, koji su povezani sa računarom.

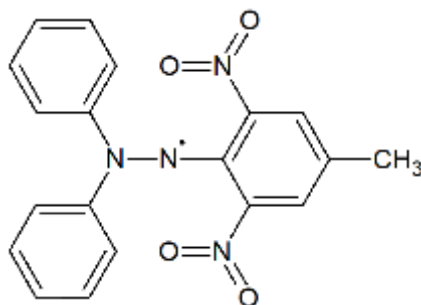
Korišćeni instrument

U ovom radu je ULj-VID spektroskopija korišćena kako bi se odredila aktivnost molekula prema stabilnim dugoživućim radikalima - DPPH i ABTS. U nastavku su opisana oba testa za aktivnost. Elektronski spektri molekula snimani su na ULj-Vid spektrofotometru Thermo Scientific Evolution 220. Za snimanje su upotrebljene kvarcne kivete, dužine optičkog puta od 10 mm. Spektri su snimani u oblasti od 200 do 700 nm.

Antiradikalski test – redukcija 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikala (DPPH)

Jedan od osnovnih spektrofotometrijskih testova za ispitivanje antiradikalske aktivnosti jedinjenja je redukcija 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikala (DPPH^{*}). Ova radikalska vrsta je veoma stabilna i intenzivno obojena, što predstavlja dva osnovna uslova kako bi se mogla koristiti kao standardni spektrofotometrijski test za aktivnost [190]. Korišćenje DPPH radikala je predloženo za ispitivanje antiradikalske aktivnosti još 1958. godine [191] iako je molekul prvi put sintetisan 1922. godine što je predstavljeno u radu Goldšmita (*Goldschmidt*) i Rena (*Renn*) [192]. Od tada se ovaj test koristi za analizu različitih tipova jedinjenja primenom kako elektronske tako i EPR spektroskopije.

Struktura DPPH radikala je prikazana na slici 8. Stabilnost ovog radikala je posledica sternih smetnji oko dvovalentnog atoma azota i tzv. „push-pull“ efekta između difenilamino (elektron donori) i pikril-grupe (elektron akceptor) [193–197]. Usled velike delokalizacije elektronske gustine, radikal intenzivno apsorbuje u vidljivoj oblasti. Apsorpcioni maksimum na 517 nm pripisuje se prvenstveno $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u molekulu. Nakon redukcije radikala nastaje stabilni molekul kod koga je smanjena delokalizacija elektronske gustine, usled čega se apsorpcioni maksimum pomera hipsohromno, na oko 320 nm. Zbog ovih osobina redukcija radikala se može pratiti merenjem pada intenziteta apsorpcije na 517 nm. U rastvoru može postojati i anjon molekula, koji ima maksimum apsorpcije na 450 nm [190]. Rastvorljivost radikala u vodi je mala tako da je potrebno korišćenje polarnih organskih rastvarača, kao što je metanol. Zbog prethodno opisane strukture radikala, prenos vodonika sa molekula sa antiradikalnim osobinama je ograničen veličinom molekula što predstavlja jednu od negativnih strana primene testa.



Slika 8 Struktura DPPH radikala

Za opisivanje reakcija supstanci sa DPPH radikalom koristi se niz kvantitativnih parametara: antiradikalska aktivnost, antiradikalska snaga, reakciona stehiometrija i broj molova DPPH redukovanih jednim molom antioksidansa [198]. Antiradikalska aktivnost, kvantifikovana EC_{50} vrednošću, predstavlja koncentraciju antioksidansa koja može redukovati 50% prisutnog radikala. Ovakva definicija pokazuje da će EC_{50} zavisi od početne koncentracije prisutnog radikala, tako da se ovaj eksperimentalni podatak posebno navodi prilikom opisivanja eksperimenta. Antiradikalska snaga se može definisati kao recipročna vrednost parametra EC_{50} , tako da bolji antioksidansi imaju veću antiradikalnu snagu. Reakciona stehiometrija se izračunava kao dvostruka vrednost parametra EC_{50} i predstavlja teorijsku efektivnu koncentraciju koja redukuje 100% prisutnog radikala. Broj molova DPPH redukovanih jednim molom antioksidansa je recipročna vrednost reakcione stehiometrije. Dodatni parametar koji se koristi prilikom opisivanja reakcija molekula sa DPPH radikalom jeste i brzina reakcije, pri čemu je primećeno da će dobri antioksidansi brzo redukovati radikal. Zbog toga je za određivanje prethodno opisanih parametara potrebno pažljivo praćenje kinetike reakcije kako bi se omogućilo da radikal reaguje sa antioksidansom u određenom vremenskom intervalu.

Kvantno-hemijsko ispitivanje mehanizma redukcije DPPH je opisano u studiji Fotija (*Foti*) i saradnika [199]. Pokazano je da postoji linearna zavisnost između energije aktivacije reakcije DPPH i fenola i energije potrebne za raskidanje O-H veze kod ispitivanih jedinjenja. Detaljna analiza prelaznog stanja za reakciju je pokazala da se mehanizam reakcije ne može jednostavno opisati kao HAT ili PCET mehanizam zbog sternih smetnji i veličine samog radikala. Slični rezultati su dobijeni i u ostalim teorijskim ispitivanjima mehanizma redukcije DPPH radikala [200–203].

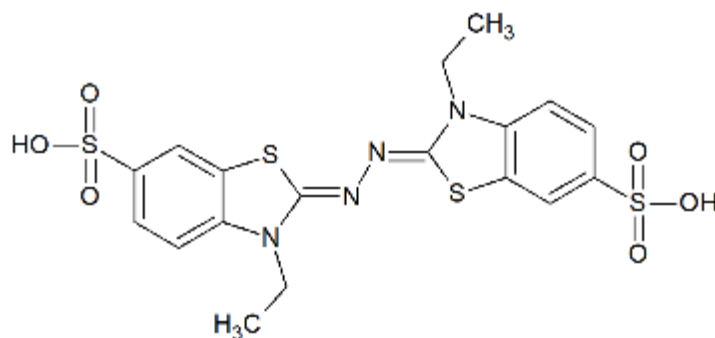
Eksperimentalni uslovi

Eksperimenti u okviru teze su rađeni u metanolu, pri čemu je koncentracija radikala držana konstantnom, 0,1 mM, dok su koncentracije neurotransmitera i njihovih metabolita bile u opsegu od 0,01 do 100 mM [204]. Kinetičke krive su dobijene kao procenat redukcije radikala, preko merenja apsorpcije (517 nm), na početku eksperimenta i nakon dostizanja platoa:

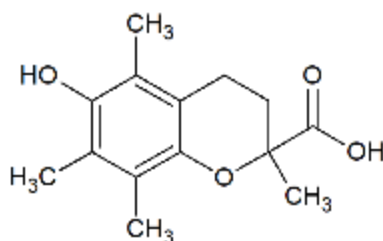
$$\%DPPH^* = \frac{A_{517,t}}{A_{517,t=0}} \quad (5)$$

Antiradikalni test – redukcija 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiseline) (ABTS^{•+})

Redukcija 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiseline) (ABTS^{•+}), slika 9, radikal-katjona jedan je od često korišćenih spektrofotometrijskih antiradikalnih testova koji se koristi za određivanje ukupne antiradikalne aktivnosti, najčešće u biološkim uzorcima. Test se sastoji u praćenju redukcije prethodno generisanog, intenzivno obojenog, ABTS katjona do neutralnog oblika. Procenat redukcije radikala se određuje na osnovu smanjenja apsorpcije jednog od apsorpcionih maksimuma u elektronskom spektru molekula. U početku se radikal dobijao aktivacijom metmioglobina u prisustvu vodonik-peroksida, pri čemu prvo nastaje feril-mioglobin radikal. Ovakav postupak se više ne koristi zbog mogućih interakcija antioksidanasa sa feril-mioglobin radikalom što sprečava nastanak obojenog ABTS radikal-katjona. U literaturi je preporučeno da se dobijanje ABTS^{•+} vrši u reakciji ABTS i kalijum persulfata. Nastali proizvod ima četiri apsorpciona maksimuma, na 415, 645, 734 i 815 nm. Dodatak antioksidansa smanjuje intenzitet traka, pri čemu se aktivnost može dodatno pratiti i preko vremena potrebnog za reakciju. Redukcija ABTS radikal-katjona se obično upoređuje sa standardnim antioksidansom, 2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilnom kiselinom (troloksom, slika 10) i izražava se u troloks-ekvivalentima, koncentraciji antioksidansa koja ima isti procenat readukcije ABTS radikal-katjona kao 1 μM rastvor troloksa (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay* – TEAC). Prednosti ove metode su slične kao kod DPPH radikala, i posebno zato što se test može koristiti i u vodenim i lipidnim sredinama.



Slika 9 Struktura 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiseline) (ABTS)



Slika 10 Struktura troloksa

Redukcija $\text{ABTS}^{•+}$ se zasniva na prenosu elektrona sa antioksidansa na radikal, za razliku od doniranja protona u slučaju redukcije DPPH radikala. Spinska gustina je kod radikala rasprostranjena duž $-\text{S}-\text{C}=\text{N}-\text{N}=\text{C}-\text{S}-$ veza [205,206], ali detaljnija kvantno-hemijska ispitivanja ovog mehanizma nisu nađena u literaturi.

Prednosti ove metode u odnosu na test redukcije DPPH radikala je veća osetljivost i repetabilnost kao i mogućnost ispitivanja, pored lipidnih sistema, i vodenih rastvora antioksidanasa.

Eksperimentalni uslovi

Eksperimenti su rađeni prema postupku predloženom u radu Rea (*Re*) i saradnika [207]. Pripremljeni su 7 mM vodeni rastvor ABTS-a i 2,45 mM rastvor kalijum-persulfata. Smeša rastvora je ostavljena u mraku 12-16 sati kako bi se generisao ABTS radikal-katjon. Potrebno je da kalijum-persulfata bude manje od stehiometrijske količine kako oksidacija ABTS-a ne bi bila potpuna. Radna koncentracija rastvora je određena preko molarnih apsorpcionih koeficijenata, na različitim talasnim dužinama ($\epsilon_{415} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i $\epsilon_{734} = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) za rastvore u kojima je apsorbancija na 734 nm iznosila 0,70. Rastvor je bio stabilan više od dva dana na sobnoj temperaturi i u mraku.

Merenje antiradikalske aktivnosti je rađeno za opseg koncentracija ispitivane supstance i trolaksa od 0 do 15 μM . Nakon jednog minuta mešanja apsorbancija je praćena šest minuta.

6.2.2. Infracrvena i ramanska spektroskopija

Infracrvena i ramanska spektroskopija predstavljaju metode vibracione analize molekula. Po mehanizmu nastanka ove dve metode se razlikuju. Infracrveni spektri nastaju usled apsorpcije zraćenja iz infracrvene oblasti prilikom čega dolazi do promene dipolnog momenta molekula. Spektri se najčešće prikazuju kao zavisnost transparentije od talasnog broja. Sa druge strane, normalni ramanski spektri se opisuju kao spektri rasejanja zraćenja, iz bliske IC, vidljive i ultra-ljubičaste oblasti, na molekulima koji ne apsorbuju korišćeno zračenje. Upadno zračenje se kombinuje sa vibracionim ili rotacionim oblicima kretanja molekula, tako da se izlazno zračenje razlikuje za energiju unutrašnjeg kretanja. Izlazno zračenje može biti veće (anti-Stoksova komponenta) ili manje (Stoksova komponenta) energije od upadnog zraćenja. Razlika između talasnog broja izlaznog zraćenja koje ima istu energiju kao upadno (Rejljeva komponenta) i Stoksove ili anti-Stoksove komponente predstavlja ramanski pomeraj, veličinu koja je osobina ispitivanog molekula. Intenzitet ramanskog rasejanja zavisi od promene polarizabilnosti molekula prilikom vibracije, tako da se u spektru dominantno mogu pratiti vibracije nepolarnih grupa.

Metode vibracione analize se mogu koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Kvalitativna analiza se zasniva na određivanju položaja traka grupnih vibracija i njihovoj korelaciji sa strukturom molekula. Kvantitativna analiza se zasniva na linearnoj zavisnosti transparentije/intenziteta ramanskog rasejanja od koncentracije molekula. U okviru ove teze ove metode su korišćene za ispitivanje strukture molekula i poređenje sa teorijski dobijenim spektrima u cilju potvrde rezultata, o strukturi molekula, dobijenih primenom odabranih teorijskih metoda.

Korišćeni instrumenti i eksperimentalni uslovi

Infracrveni spektri su snimljeni na Avatar 370 – Thermo Nicolet FTIR spektrometru. Oblast snimanja je bila od 4000 do 400 cm^{-1} , sa spektralnom rezolucijom

od 2 cm^{-1} . Sve ispitivane supstance su ispitivane u matrici kalijum-bromida sa odnosom $1 : 200 \text{ mg} = m(\text{supstance}) : m(\text{KBr})$.

Ramanski spektri su snimani na Thermo Scientific DXR ramanskom mikroskopu u oblasti od 3500 do 400 cm^{-1} . Supstance su pobuđivane laserom od 532 nm . Sočivo objektiva je bilo podešeno na $50\times$. Rasejana svetlost je analizirana spektrografom sa rešetkom od 900 linija/mm. Jačina lasera je bila podešena na 10 mW , vreme prikupljanja signala 10 s , a broj skeniranja 10 . Na spektrima je urađena i korekcija fluorescencije. Za analizu i obradu podataka korišćen je Thermo Scientific OMNIC program.

Teorijski intenziteti ramanskih traka, I_i^R , su dobijeni na osnovu izračunatih ramanskih aktivnosti za rasejanje:

$$I_i^R = C(\nu_0 - \nu_i)^4 \nu_i^{-1} B_i^{-1} S_i \quad (6)$$

U prethodnoj jednačini veličine predstavljaju: ν_0 je talasna dužina lasera ($\nu_0 = 18797 \text{ cm}^{-1}$ koja odgovara 532 nm), ν_i je talasni broj normalnog oblika, S_i je ramanska aktivnost za rasejanje, C je konstanta jednaka 10^{-12} , a B_i je temperaturski faktor koji uključuje doprinose pobuđenih vibracionih stanja, shodno Bolcmanovoj raspodeli:

$$B_i = 1 - e^{-\frac{h\nu_i c}{kT}} \quad (7)$$

Temperaturski faktor zavisi od Plankove konstante (h), brzine svetlosti (c), frekvencije normalnog moda (ν_i), Bolcmanove konstante (k) i temperature (T). U simulacijama ramanskih spektara vrednost ovog faktora je 1 zbog pretpostavljenog malog doprinosa rasejanja sa viših vibracionih stanja na temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.2.3. Nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija

Nuklearna magnetska rezonantna (NMR) spektroskopija je metoda zasnovana na rezonantnoj apsorpciji radiofrekventnog (RF) zračenja od strane atoma koji imaju rezultujući spin jezgra različit od nule i koji se nalaze u spoljašnjem polju. Osnovni parametri NMR spektara su: hemijski pomeraj, intenzitet/površina ispod rezonantnog maksimuma i multipletna struktura. Frekvencija zračenja koje jezgro apsorbuje zavisi od hemijskog okruženja, uticaja supstituenata i rastvarača, tako da će različita jezgra u strukturi daju signale na različitim vrednostima hemijskih pomeraja.

Korišćeni instrumenti i eksperimentalni uslovi

U okviru teze su snimani ^1H i ^{13}C spektri, kao najčešće korišćeni za analizu organskih molekula. NMR spektri su snimani na Varian Gemini 200 MHz NMR spektrometru, u DMSO- d_6 kao rastvaraču i sa tetrametilsilanom (TMS) kao internim standardom. Spektri su korišćeni za analizu strukture ispitivanih supstanci kao i za poređenje sa teorijski izračunatim spektrima, a u cilju potvrde rezultata o strukturi molekula dobijenih primenom odabranih kombinacija funkcional/bazisni skup.

6.2.4. Elektronska paramagnetska rezonantna spektroskopija

Elektronska paramagnetska/spinska rezonanca (EPR/ESR) je spektroskopska metoda zasnovana na rezonantnoj apsorpciji mikrotalasnog zračenja (MT) od strane paramagnetnih molekula koje se nalaze u spoljašnjem magnetnom polju. Zbog mogućnosti direktnog praćenja signala radikalskih vrsta ova metoda ima veliku primenu u biologiji, medicini i hemiji. Najčešće korišćene tehnike snimanja EPR spektara su tehnike spinske probe (obeleživača) i spin-trap (spinske zamke). Tehnika spinskog obeležavanja koristi stabilne organske radikale (nitrokside) kojima se postiže paramagnetsko obeležavanje analita koji nisu paramagnetske prirode. Tehnika spinske zamke ima posebno mesto u ispitivanju oksidacionog stresa iz razloga jedinstvene mogućnosti da identifikuje i kvantifikuje kratkoživeće radikale koji su od velikog značaja u biološkim istraživanjima (hidroksi-radikal, superoksid radikal-anjon, itd.). Stabilna, EPR neaktivna, vrsta (nitrozo jedinjenja, nitron, itd.) u reakciji sa radikalskom vrstom daje spinski adukt, jedinjenje koje je EPR aktivno i koje ima tačno definisan EPR spektar. Kao spinske zamke se koriste 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid (DMPO), 5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksid (DEPMPO), 5-karboksil-5-metil-1-pirolin-N-oksid (CMPO), 5-*terc*-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksid (BMPO) i ostali.

Korišćeni instrumenti i eksperimentalni uslovi

Sva merenja su urađena na Bruker Eleksys-II EPR spektrometru, u X oblasti MT zračenja (9,4 GHz). Antiradikalska aktivnost neurotransmitera i njihovih metabolita je ovom metodom ispitivana prema DPPH, askorbil- i hidroksi-radikal. Prva dva radikala su dugoživeća i praćena su direktno EPR spektroskopijom. Zbog svoje reaktivnosti, hidroksi-radikal je bilo potrebno prevesti u stabilniji oblik tako da je za njegovo snimanje

korišćena tehnika spinske zamke (spin trap DEPMPO). Za sve navedene radikale su snimani prvo rezonantni spektri radikala bez dodatka neurotransmitera i njihovih metabolita. Zatim je dodavana supstanca od interesa. Aktivnost je određena kao relativno smanjenje površine ispod rezonantnog maksimuma pre i posle dodavanja supstanci. Uslovi snimanja i koncentracije supstanci su dati u nastavku.

Za ispitivanje reaktivnosti prema DPPH radikalu pripremljeni su rastvori istih koncentracija kao i kod spektrofotometrijskog određivanja. Svi rastvori su snimani sat vremena nakon pravljenja i inkubacije na sobnoj temperaturi, kako bi i supstance sa slabijom antiradikalском aktivnošću mogle da reaguju i dostignu ravnotežu. Urađena je jedna akumulacija spektra. Uslovi snimanja su bili: centar polja na 3511,10 G; širina polja – 200 G; modulaciona amplituda – 2 G; modulaciona frekvenca – 100 kHz; MT snaga – 10,02 mW. Eksperimenti su ponovljeni na isti način i Ulj-vid spektroskopijom. Procenat redukcije je određen preko površine dva najintenzivnija maksimuma u spektru.

Askorbil-radikal je generisan iz rastvora askorbinske kiseline u 0,1 M PBS puferu, pH=7,6. Osnovni rastvor askorbinske kiseline je bio 10 mM. Koncentracije osnovnih rastvora neurotransmitera i njihovih metabolita su takođe bile 10 mM. U ispitivani uzorak je dodavano 11 μ L askorbinske kiseline, 15 μ L ispitivane supstance i 2 μ L pufera. Signal je praćen od 4 do 10 minuta nakon početka reakcije. Uslovi snimanja su bili: centar polja na 3509,7 G; širina polja – 200 G; modulaciona amplituda – 2 G; Modulaciona frekvenca – 100 kHz; MT snaga – 10,2 mW.

Generisanje hidroksi-radikala je vršeno u Fentonovom reakcionom sistemu. Rastvor je sadržao 0,5 mM vodeni rastvor H_2O_2 i 0,075 mM rastvor gvožđe(II)-sulfata. Spin trap korišćen u ovim eksperimentima je bio DEPMPO molekul, koji je pre upotrebe prečišćen kako bi se oksidacijom $K_3[Fe(CN)_6]$ uklonio hidroksiamin. Koncentracija spin trapa je bila 50 mM. Uslovi snimanja su bili: centar polja na 3503,70 G; širina polja – 200 G; modulaciona amplituda – 1 G; modulaciona frekvenca – 100 kHz; MT snaga – 10,02 mW.

6.2.5. Cikična voltametrija

Ciklična voltametrija (CV) je elektrohemijska metoda zasnovana na praćenju promene struje ispitivanog sistema između radne i pomoćne elektrode usled promene potencijala između radne i referentne elektrode. Potencijal se tokom merenja menja

ciklično, od početne do krajnje vrednosti. Za merenja je potrebno imati troelektrodni sistem koji uključuje radnu, referentnu i pomoćnu elektrodu. Izmereni signal se predstavlja kao zavisnost struje od primenjenog potencijala, odnosno kao I-E kriva ili ciklo-voltamogram.

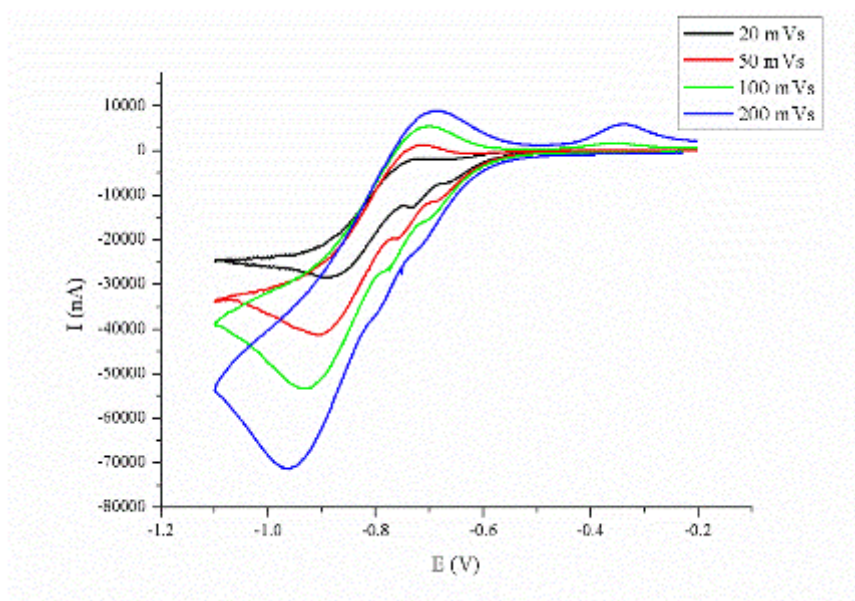
U prvom delu merenja, potencijal se menja od početne do krajnje vrednosti, pri čemu se dešava proces redukcije. Nakon dostizanja maksimalnog potencijala sistem se istom brzinom vraća u početnu vrednost potencijala pri čemu se supstanca oksiduje. Karakteristični parametri ciklovoltamograma su: struja maksimuma struje (anodnog i katodnog), potencijal maksimuma struje, poluširina maksimuma i razlika potencijala anodnog i katodnog maksimuma.

Korišćeni instrument i eksperimentalni uslovi

Za ciklovoltametrijska merenja korišćen je Ivium V01107 potenciostat/galvanostat u opsegu potencijala od -0,3 do 1 V SCE (*Saturated Calomel Electrode* – SCE) .

Cikličnom voltametrijom je u doktorskoj disertaciji ispitivana antiradikalska aktivnost odabranih supstanci prema superoksid radikal-anjonu ($O_2^{\bullet-}$) praćenjem smanjenja površine ispod anodnog maksimuma struje. Radna elektroda je bila disk elektroda od staklastog ugljenika, dok su pomoćna i referentna bile platinska i zasićena kalomelova elektroda. Pre korišćenja radna elektroda je polirana Al_2O_3 pastom, zatim isprana acetonom i vodom. Svi eksperimenti su rađeni u kiseonikom zasićenom dimetil-sulfoksidu (DMSO), koji je prethodno osušen korišćenjem zeolita sa veličinom pora 3 Å. Kao elektrolit je korišćen 0,1 M tetraamonijmheksafluorofosfat (Bu_4NPF_6). Antiradikalska aktivnost ispitivanih jedinjenja je određena preko nagiba krive odnosa površina anodnog maksimuma i koncentracije ispitivanog molekula (mM).

Važno je napomenuti da izgled ciklovoltamograma zavisi od većeg broja eksperimentalnih parametara. Na slici 11 prikazan je CV za različite brzine snimanja, za 2,5 mM rastvor norepinefrina, u zasićenom rastvoru kiseonika u DMSO. Na osnovu izgleda ciklo-voltamograma i na osnovu pregleda literature [208,209], zaključeno je da je brzina snimanja od 100 mV/s optimalna za dati sistem.



Slika 11 Ciklovoltamogrami dobijeni za različite brzine snimanja za 2,5 mM rastvor norepinefrina u zasićenom rastvoru O_2 u DMSO i 0,1 M Bu_4NPF_4

6.2.6. Spektrofluorimetrija

Spektrofluorimetrija je analitička metoda zasnovana na analizi fluorescentnih spektara jedinjenja. Fluorescencija je jedan od mogućih puteva dezaktivacije molekula nakon apsorpcije zračenja talasne dužine dovoljne da pobudi elektronski prelaz. Nakon pobuđivanja i vibracione relaksacije na osnovni vibracioni nivo pobuđenog elektronskog stanja molekul se može radijaciono dezaktivirati. Pored ovog postoji mogućnost i neradijacionih prelaza u vidu intersistemskog prelaza na tripletsko stanje i unutrašnje konverzije. Favorizovanje jednog od načina dezaktivacije zavisi od većeg broja faktora: strukture, rastvarača, pH vrednosti i temperature. Spektrofluorimetrija se često koristi za ispitivanje interakcija molekula sa proteinima i DNK iz razloga što ovi molekuli poseduju tzv. Unutrašnju fluorescenciju. U okviru teze spektrofluorimetrija je korišćena za ispitivanje vezivanja neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita za goveđi serum albumin (BSA), protein koji spada u važne transportne molekule u organizmu.

BSA je model sistem za ispitivanje interakcija supstanci sa proteinima. Ovakav tip eksperimenta daje informacije o strukturnim parametrima važnim za vezivanje ali i konformacionim promenama proteina koje se dešavaju prilikom interakcija [210]. BSA ima važnu biološku funkciju i nalazi se u plazmi. Sastoji se od jednolančanog niza 582 aminokiseline, globularne strukture je i sadrži 17 cisteinskih ostataka, od čega osam gradi

disulfidne mostove pri čemu je jedna tiolna grupa slobodna. Struktura BSA je organizovana u tri domena (I-III) od čega se svaki sastoji od dva poddomena (A i B) [211–213]. Dva triptofanska ostatka predstavljaju aktivna mesta vezivanja supstanci i označavaju se kao Trip-134, koji je blizu površine proteina i nalazi se u hidrofobnom delu domena I, i Trip-214, koji je u unutrašnjosti domena II [214]. U organizmu BSA je odgovoran za prenos, vezivanje i dostavljanje masnih kiselina, porfirina, triptofana, bilirubina i steroida.

Korišćeni instrument i eksperimentalni uslovi

Spektrofluorimetrijska merenja su vršena na Horiba Scientific Fluorolog TCSPC spektrofluorimetru sa dodatkom za mešanje. Ekscitaciona talasna dužina je bila 280 nm. Emisija je praćena u oblasti od 300 do 450 nm. Prikazani opseg koncentracija je davao optimalnu mogućnost praćena procesa vezivanja. Veće koncentracije neurotransmitera i njihovih metabolita su dodatno povećavale intenzitet fluorescencije zbog osobine ovih supstanci da fluoresciraju kada se na njih deluje zračenjem talasne dužine od 280 nm (što se može videti i na osnovu apsorpcionog spektra ovih supstanci). Fluorescentni 3D spektri su snimani u opsegu ekscitacionih talasnih dužina od 240 do 290 nm dok je emisija praćena od 305 do 450 nm. Ovakva vrsta analize omogućila je određivanje broja vrsta koje fluoresciraju kao i promene u fluoroforima usled promene okruženja, u kome su se nalazile, ili strukturnih promena.

Sva spektrofluorimetrijska merenja su urađena u PBS puferu na pH=7,4. Pufer je dobijen rastvaranjem 0,8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ i 0,24 g KH₂PO₄ u 100 mL vode. pH vrednost rastvora je podešena 1 M rastvorom NaOH. Rastvor BSA je dobijen rastvaranjem 2 mg BSA u 1 mL vode. Koncentracija početnog rastvora je dodatno proverena spektrofotometrijski, merenjem apsorpcije rastvora na 278 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent BSA je dobijen na osnovu sledeće formule:

$$\epsilon_{280}=5500 \cdot X+1490 \cdot Y+125 \cdot C \quad (8)$$

u kojoj vrednosti X, Y i C predstavljaju broj jedinica triptofana, tirozina i disulfidnih mostova koji apsorbuju u datoj oblasti. Ostale aminokiseline imaju zanemarljivo malu apsorpciju u datoj oblasti. Vrednost molarnog apsorpcionog koeficijenta na 278 nm iznosi 43824 M⁻¹cm⁻¹. Ovako određena koncentracija osnovnog rastvora BSA je iznosila 3×10⁻⁵

⁵ M. Kako bi se pratilo smanjenje intenziteta fluorescentne emisije eksperimenti su rađeni pri konstantnoj koncentraciji BSA od 6×10^{-8} M uz sukcesivno dodavanje ispitivane supstance u opsegu koncentracija $2-7 \times 10^{-8}$ M.

6.2.7. Kristalografija X-zraka

Dobijanje kristalografske strukture je urađeno na Oxford Diffraction Xcalibur Gemini ultra-difraktometru sa AtlasS2 CCD detektorom sa $\text{CuK}\alpha$ zračenjem. CrysAlis PRO 1.171.39.35c [215] program je korišćen za dobijanje podataka, prečišćavanje jedinične ćelije i korekciju apsorbancije. Kristalna struktura je rešena SHELXT programom [216] i daljom Furijeovom sintezom SHELXL [217], u okviru WinGX programskog paketa [218]. Anizotropni parametri su izračunati za sve atome različite od vodonika. Vodonikovi atomi vezani za atome azota i kisenika su nađeni u Furijeovim mapama, dok su vodonikovi atomi u aromatični i alifatični strukturama stavljeni u izračunati položaji i prerađeni tako da odgovaraju C-H rastojanjima i $U_{\text{iso}}(\text{H})=1,2$ ili $1,5 U_{\text{eq}}(\text{C})$, respektivno. Analiza dužina veza i uglova je urađena u SHELXL i PLATON programima [219], dok je DIAMOND program [220] korišćen za dobijanje slike molekula.

6.2.8. Antitumorska aktivnost

Ispitivanje antitumorske aktivnosti 4-hidroksikumarina i 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona je rađeno na sledećim ćelijskim linijama: zdravi keratinociti HaCaT (AddexBio T0020001), cervikalni karcinom SiHa (ATCC[®], HTB-35TM), kacinom dojke MCF7 (ATCC[®], HTB-22TM) i hepatocelularni karcinom HepG2 (ATCC[®], HTB-8065TM). Sve vrste ćelija su uzgajane u DMEM hranljivom medijumu (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) sa 10% fetalnim goveđim serumom (FBS), 4500 mg/L glukoze, i 1x antimikotikom/antibiotikom (svi od InvitrogenTM, USA). Ćelije su odgajane u inkubatoru na 37 °C i u atmosferi 5% CO_2 .

Kako bi se ispitao uticaj odabranih molekula na vijabilnost ćelija, primenjen je MTT proliferacioni test (*MTT Cell Proliferation Assay*), kolorimetrijski test za kvantitativno prebrojavanje živih ćelija. Metod se zasniva na redukciji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltrazolium bromida (MTS) od strane samo živih ćelija pri čemu nastaje nerastvorni, obojeni, proizvod formazan. Pretpostavlja se da se ova promena

dešava zbog prisustva NAD(P)H-zavisnog enzima dehidrogenaze u metabolički aktivnim ćelijama. Merenjem apsorbancije u oblasti od 490 do 500 nm moguće je kvantitativno određivanje broja živih ćelija, s obzirom da mrtve ćelije ne učestvuju u redukciji.

Ćelije (5×10^3 za SiHa i MCF7 i 1×10^4 za HaCaT i HepG2) su posejane dan pre korišćenja a potom tretirane različitim koncentracijama ispitivanih molekula (100, 300 i 500 μM) u roku od 48 časova. Nakon 48 časova, uticaj supstanci je praćen korišćenjem pomenute metode na čitaču (Plate Reader Infinite 200 pro, Tecan).

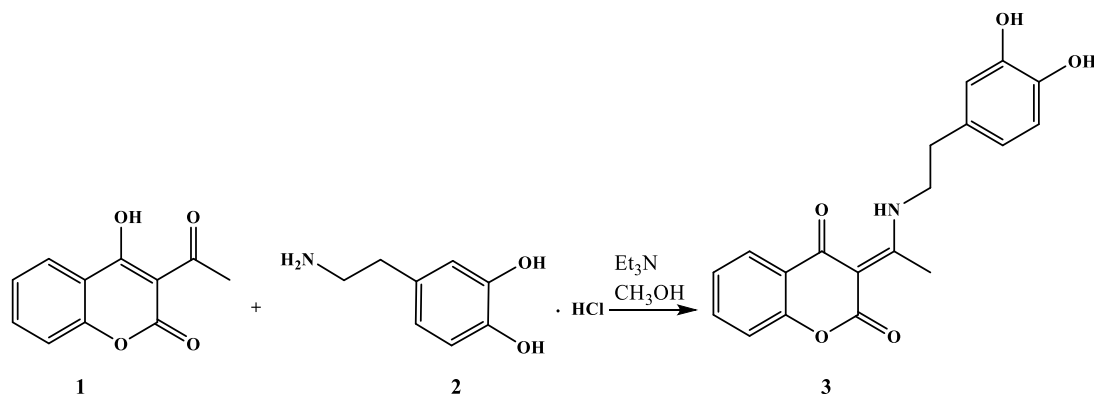
Statističke analize su urađene primenom SPSS statističkog softvera (verzija 20). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost $\pm$ standardna greška srednje vrednosti (*Standard Error of the Mean*, SEM). Statističke analize su uključivale Studentovu *t*-raspodelu i *p* vrednost $\leq 0,05$ koja je smatrana značajnom.

6.2.9. Sinteza kumarin-dopamin derivata

U okviru ove teze ispitana je i kondenzacija acetilovanog 4-hidroksikumarina sa dopaminom, u cilju dobijanja novog proizvoda, za koji se na osnovu poznatih podataka o polaznim jedinjenjima može očekivati da će imati izraženu biološku aktivnost. Kumarini se nalaze u mnogim biljkama, kao što su tonka semenke, bizonska trava, jagode, višnje, slatka detelina i cimet [221–225]. Kumarini imaju i važne biološke funkcije, kao što su regulacija rasta, kontrola disanja [226], zaštita od grabljivaca i mikroorganizama, kao i ulogu hormona i signalnih molekula [227]. Kumarin ili 2*H*-hromen-2-on je prirodni derivat benzopirona koji se sastoji od benzena i α -pironskog prstena. Po strukturi ovo su delokalizovani sistemi koji su bogati elektronima, što im omogućava dobar prenos naelektrisanja. Ova jedinjenja su veoma rasprostranjena u prirodi pa zbog toga predstavljaju važnu klasu prirodnih i/ili sintetičkih heterocikličnih jedinjenja koja u sebi sadrže kiseonik. Strukturna raznolikost omogućava različite farmakološke aktivnosti: antibakterijsku, antifungalnu, antioksidacionu i citotoksičnu [228,229]. Sintetički kumarini imaju takođe veliki potencijal kao lekovi za tretiranje neurodegenerativnih oboljenja [230], bolesti izazvanih različitim mikroorganizmima [231], HIV-a [232], tumora [233,234] i regulaciju reaktivnih radikalskih vrsta [235,236].

Derivat kumarina i dopamina, označen kao molekul **3**, je sintetisan od 3-acetil-4-hidroksikumarina, prema postupku iz reference [237], a prema slici 12. Derivat je dobijen nakon reakcije u smeši koja je sadržala 3-acetil-4-hidroksikumarina (0,0014 mol, 3 g),

dopamin hidroklorida (0,0014 mol, 0,23 g) i trietilamina (0,0014 mol, 0,15 g) u 50 mL metanola. Vreme trajanja reakcije je bilo 3 časa. Napredak reakcije je praćen TLC-om (toluen : aceton = 7 : 3). Kada je reakcija završena, smeša je ohlađena na sobnu temperaturu. Dobijeni beli kristali su isfiltrirani, osušeni na vazduhu i rekristalizovani iz metanola.



Slika 12 Sintaza 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona

Reakcioni prinos je bio 64,65% (0,321 g). Na osnovu rezultata mikroanalize dobijeni su sledeći procenti prisutnih elemenata: 67,00% ugljenika, 5,10% vodonika i 4,16% azota. Teorijski procenti iznose 67,25% ugljenika, 5,05% vodonika i 4,12% azota. Molarna masa jedinjenja je 339,32 g/mol.

6.3. Teorijske metode

Metode računarske hemije se danas uspešno koriste za opisivanje strukture molekula, predviđanje vibracionih spektara, reaktivnosti, energetske barijere za različite tipove reakcija, elektronskih spektara i drugo. Metode se mogu se podeliti na kvantno-mehaničke i molekulske mehaničke. U okviru teze su korišćene obe.

6.3.1. Metode molekulske mehanike

U molekulskoj mehanici se zakoni klasične fizike primenjuju na molekulske sisteme. Molekuli se opisuju kao sistemi od povezanih atoma, pri čemu se elektroni ne posmatraju nezavisno. Hemijska veza se aproksimira oprugom čija elastičnost zavisi od masa atoma, ali i tipa veze [238,239].

Metodologija za sva molekulske-mehanička ispitivanja je ista u okviru teze. Strukture proteina su preuzete iz Proteinske banke podataka (*Protein Data Bank*) dok su strukture liganada dobijene prethodnom optimizacijom kvantno-hemijskim metodama. Za pripremu strukture proteina korišćen je program Discovery Studio 4.0 [240] i ovaj proces je uključivao uklanjanje ko-kristalisanog liganda, vode i ko-faktora. AutoDockTools (ADT) grafički interfejs je upotrebljen za izračunavanje Kolmanovih (*Kollman*) naelektrisanja i dodavanje polarnih atoma vodonika. Struktura liganda je bila fleksibilna uz omogućenu rotaciju oko veza dok je struktura proteina ostala nepromenjena. Upotrebljen je i Gajštengerov (*Geistenger*) metod za izračunavanje naelektrisanja. Metod Lamarkijanskog Genetičkog Algoritma (*Lamarckian Genetic Algorithm – LGA*) je korišćen za izračunavanja energija protein-ligand. Veličina kutije u kojoj se nalazi protein je postavljena tako da ceo protein bude uključen kako bi se ispitala i interakcije na površini. Na osnovu dobijenih modela računata su energije vezivanja, energije pojedinačnih interakcija i konstanta inhibicije.

6.3.2. Osnove kvantne hemije i Šredingerova jednačina

Osnovna kvantno-hemijskih izračunavanja je vremenski nezavisna Šredingerova (*Schrödinger*) jednačina, postulirana početkom 20. veka [241]. Kretanje elektrona se u ovoj jednačini posmatra samo preko njegovih talasnih osobina, pri čemu je verovatnoća nalaženja elektrona u nekoj tački prostora srazmerna kvadratu apsolutne vrednosti talasne funkcije. Egzaktno rešenje jednačine je moguće za jedno-elektronske sisteme koji

uključuju atom vodonika, vodoniku-slični jone i pozitivno naelektrisani molekul vodonika. Operator ukupne energije uključuje nekoliko članova koji opisuju moguće interakcije i kretanje čestica: kinetičku energiju jezgra i elektrona, potencijalnu energiju interakcija jezgro-jezgro, elektron-jezgro i elektron-elektron. Prilikom korišćenja vremenski nezavisne Šredingerove jednačine elektroni se posmatraju pojedinačno, dok su jezgra predstavljena kao skup čestica.

Šredingerovu jednačinu je moguće postaviti za svaku molekulsku vrstu. Tokom godina od razvoja kvantne mehanike se pojavio niz aproksimacija koje omogućavaju približno rešavanje Šredingerove jednačione za višeelektronske sisteme. Born-Openhajmerova (*Born-Openheimer*) aproksimacija je jedna od osnovnih [238,239]. Prema ovoj aproksimaciji, kretanje elektrona se može razdvojiti od kretanja jezgara, koji se zbog mnogo veće mase sporije kreću. Elektroni se lakše prilagođavaju kretanju jezgara, tako da se jednačina modifikuje i rešava za fiksirani položaj jezgara. Druga, često korišćena aproksimacija, je Hartri-Fokova aproksimacija koja komplikovane probleme višeelektronskih sistema svodi na probleme jednoelektronskih sistema, predstavljanjem odbijanja između elektrona kao prosečan efekat.

Dobijene Hartri-Fokove (*Hartree-Fock*) jednačine se moraju iterativno rešavati. Ovaj postupak se naziva metoda samousaglašenog polja (*self-consistent field*, SCF). Suština postupka je da se na osnovu probnih spin-orbitala izračuna usrednjeno polje i reši svojstveni problem, a zatim dobiju nove spin-orbitale i zatim ceo postupak ponovi sve dok ne dođe do poklapanja Fokovog operatora sa svojstvenim funkcijama. Ovako dobijene orbitale, $\{\chi_k\}$, su ortonormirane. N orbitala sa najnižom energijom su zauzete spin orbitale dok su ostali članovi $\{\chi_k\}$ neokupirane orbitale. Za sisteme koji imaju paran broj elektrona koristi se ograničena Hartri-Fokova metoda (*Restricted Hartree-Fock*, RHF), a za sisteme sa otvorenom ljuskom neograničena Harti-Fokova metoda (*Unrestricted Hartree-Fock*, UHF).

Danas se za konstrukciju molekulskih orbitala koriste matematičke funkcije koje se nazivaju bazisne funkcije. Bazisni skup je skup svih bazisni funkcija. Rešavanje jednačina pomoću različitih bazisnih skupova dobijaju se različita rešenja. Primenom metode sa kompletnim bazisnim skupom dobija se energija koja se naziva Hartri-Fokova granica, koja ne odgovara egzaktnoj energiji molekula zbog pojednostavljenog posmatranja elektron-elektron interakcija. Razlika ove dve energije se naziva korelaciona

energija i negativna je veličina. U teoriji funkcionala gustine korelacioni član se uvodi eksplicitno pri čemu kvalitet modela zavisi od korelacione energije.

6.3.3. Teorija funkcionala gustine

Teorija funkcionala gustine (*Density Functional Theory*, DFT) se zasniva na gustini elektrona, $\rho(r)$, veličini koja se može eksplicitno meriti. Gustina elektrona zavisi od tri prostorne koordinate, dok talasna funkcija zavisi od x , y i z koordinata svih elektrona.

Teorija funkcionala gustine ima u osnovi dve teoreme koje su postavili Hohenberg (*Hohenberg*) i Kon (*Kohn*) [242]:

Teorema 1. Za bilo koji sistem interagujućih čestica u spoljašnjem potencijalu elektronska gustina, $\rho(r)$, je jednoznačno određena (odnosno – spoljašnji potencijal je jedinstveni funkcional gustine).

Teorema 2. Funkcional energije, $E(\rho)$, može biti definisan kroz elektronsku gustinu. Osnovno stanje sistema odnosi se na minimalnu vrednost ovog funkcionala i može se izračunati primenom varijacione metode.

Nedostatak teoreme 2 je taj što ne daje oblik funkcionala zbog toga se primenjuje niz aproksimativnih funkcionala. Oblik koji su predložili Kon i Šam (*Sham*) je sledeći:

$$E[\rho(r)] = T_e(\rho) + V_{Ne}(\rho) + V_{ee}(\rho) + E_{XC}(\rho) \quad (9)$$

Prvi član jednačine 9 predstavlja kinetičku energiju elektrona među kojima ne postoje interakcije dok je gustina jednaka gustini elektrona između kojih postoje interakcije. Član $V_{Ne}(\rho)$ daje energiju interakcije jezgra i elektrona a član $V_{ee}(\rho)$ je energija odbijanja elektrona. Poslednji član, $E_{XC}(\rho)$, se naziva funkcional izmene/korelacije. Dati član sadrži energiju izmene koja nastaje usled asimetričnosti talasne funkcije, korelacionu energiju kretanja elektrona, dodatni doprinos kinetičkoj energiji, odnosno sve ono što je nepoznato o ispitivanom sistemu a predstavlja funkcional gustine. Praktičnu primenu DFT-a omogućavaju Kon-Šamove jednačine, na osnovu kojih se dobija elektronska gustina osnovnog stanja. Kon-Šamova jednačina za jednoelektronski sistem je oblika:

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + \left[\sum_{i=1}^N \int \frac{|\varphi_i(r_2)|^2}{r_{12}} dr_{12} + V_{XC}(r_1) - \sum_I^M \frac{Z_I}{r_{1I}} \right] \right) \varphi_i = \epsilon_i \varphi_i \quad (10)$$

U ovoj jednačini član V_{XC} predstavlja potencijal koji zavisi od energije izmene/korelacije, E_{XC} , i izračunava se kao prvi izvod energije po elektronskoj gustini.

Članovi $\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + \left[\sum_{i=1}^N \int \frac{|\phi_j(r_2)|^2}{r_{12}} dr_{12} + V_{XC}(r_1) - \sum_I^M \frac{Z_I}{r_{I1}} \right] \right)$ u jednačini 10 označavaju tzv.

Kon-Šamov operator. Definisane veličine V_{HC} je od presudne važnosti i mora se eksplicitno uvesti. Razvijen je veliki broj metoda zasnovan na funkcionalima izmene/korelacije, koje se mogu podeliti u tri klase: funkcionali zasnovani na aproksimaciji lokalne i lokalne spinske gustine, funkcionali zasnovani na aproksimaciji gradijenta elektronske gustine i hibridni funkcionali.

6.3.4. Hibridni funkcionali

Kao što je prethodno objašnjeno, za opisivanje sistema je potrebno poznavanje funkcionala izmene. Beke (*Becke*) je formulisao funkcionalne kod kojih se doprinos od korelacije zasniva na DFT teoriji, a doprinos od izmene na mešavini Hartree-Fockove i DFT teorije:

$$E_{XC}^{hibrid} = c_{HF}E_X^{HF} + c_{DFT}E_{XC}^{DFT} \quad (11)$$

U jednačini 11 članovi c_{HF} i c_{DFT} su konstante. Ovakav način definisanja dovodi do delimično semi-empirijskog karaktera funkcionala.

Jedan od korišćenih funkcionala u okviru doktorske teze je troparametarski funkcional **B3LYP** [243,244]. Energija izmene/korelacije za ovaj funkcional se može dati jednačinom:

$$E_{XC}^{B3LYP} = E_{XC}^{LDA} + a_0(E_X^{HF} - E_X^{LDA}) + a_x(E_X^{B88} - E_X^{LDA}) + a_c(E_C^{LYP} - E_C^{VWN}) \quad (12)$$

U nazvu funkcionala B se odnosi na Bekeov funkcional izmene, 3 na broj empirijskih parametara (a_0 , a_x i a_c), a LYP na funkcional Lija (*Li*), Janga (*Yang*) i Para (*Parr*). Uvedeni parametri su određeni na osnovu eksperimentalnih veličina kao što su: energije atomizacije, potencijal jonizacije, afinitet prema elektronu i atomska energija određenog skupa molekula. Ovako su dobijene sledeće vrednosti parametara: $a_0=0,20$, $a_x=0,72$ i $a_c=0,81$. Tokom godina se ovaj funkcional koristio za određivanje entalpija disocijacija veze, energije jonizacije i elektronske energije različitih molekulskih sistema. Nedostaci

su uočeni kod ispitivanja kompleksa prelaznih metala i kinetike reakcija. Ukoliko se uključi ne-lokalna korelacija Perdua (*Perdew*) i Vanga (*Wang*) dobija se **B3PW91** funkcional [245].

Dodatak disperzionih korekcija kod **B3LYP-D3BJ** funkcionala omogućava bolje opisivanje odbojnih međuatomskih interakcija na kraćim rastojanjim, što poboljšava vrednosti energija nekovalentnih interakcija i međuatomskih rastojanja [246]. Ove korekcije ne menjaju talasnu funkciju, ali utiču na sile koje deluju na atome, tako da se dobija drugačija geometrija. Beke-Džons (*Becke-Jons*) prigušenje uvodi i parametre koji se podešavaju prilikom opisivanja disperzionih interakcija.

Jedno od predloženih poboljšanja funkcionala je sadržano je i u funkcionalu **CAM-B3LYP** [247]. Ovaj funkcional uključuje sve kvalitete funkcionala B3LYP uz dodatak korekcija za interakcije dugog dometa [248]. Poboljšanja su uočena kod opisivanja reakcija prenosa elektrona kod dipeptida [247].

Izačunavanja termodinamičkih i kinetičkih parametara značajno su poboljšana funkcionalima iz Trularove (*Truhlar*) grupe. U funkcional je uključena i gustina kinetičke energije. Funkcional **M05** je predložen za opisivanje interakcija u jedinjenjima prelaznih metala i nekovalentnih interakcija, termohemijskih i kinetičkih izračunavanja [249]. Poboljšanje ovog funkcionala u vidu **M05-2X**, dobijenog povećanjem udela funkcionala izmene, je pokazalo dobre rezultate u termohemijskim i u kinetičkim proračunima kao i opisivanju nekovalentnih interakcija nemetala [250]. Hibridna energija izmene/korelacije za ovaj funkcional se može dati jednačinom:

$$E_{XC}^{hibrid} = E_X^{HF} + \left(1 - \frac{X}{100}\right) (E_X^{DFT} - E_X^{HF}) + E_C^{DFT} \quad (13)$$

E_X^{HF} je ne-lokalna Hartri-Fokova energija izmene, X je udeo Hartri-Fokove izmene u hidrbridnom funkcionalu, E_X^{DFT} je lokalna DFT energija izmene i E_C^{DFT} je lokalna DFT energija korelacije. Energija korelacije je predstavljena sumom dinamičke korelacione energije, E_C^{DFT} , i nedinamičke korelacione energije date članom $\left(1 - \frac{X}{100}\right) (E_X^{DFT} - E_X^{HF})$. Parametar X je dobijen na osnovu većeg broja baza podataka koje uključuju energije atomizacije, potencijal jonizacije, afinitet prema elektronu, visine barijera za prenos atoma vodnika, nekovalentne interakcije, metal-metal interakcije, energiju disocijacije alkana i etara, dipolne momente. Zao i Trular su 2008. godine predstavili i novi funkcional

M06-2X koji se može koristiti za opisivanje termohemije reakcija, kinetike reakcija i nekovalentnih interakcija elementata glavnih grupa periodnog sistema [251].

Svi teorijski proračuni u okviru teze su urađeni u programskom paketu Gausijan 09 (*Gaussian Program Package*) [252]. Pomenuti funkcionali su korišćeni i spregnuti sa 6-311++G(d,p) bazisnim skupom [253]. Pomenuti bazni skup spada u bazne skupove podeljene valentnosti. Unutrašnji elektroni se prikazuju jednom kontrahovanom funkcijom koju čini šest primitivnih funkcija, dok se valentni elektroni prikazuju pomoću tri kontrahovane funkcije. Uvedene su i polarizacione funkcije koje predstavljaju funkcije sa većim kvantnim brojem od onog koji odgovara valentnim elektornima, označeno kao (d,p). Polarizacione funkcije (oznaka ++) su uvedene u okviru ovog bazisnog skupa, pri čemu se orbitalama određenog tipa dodeljuju orbitale istog tipa sa manjim vrednostima eksponenata [254].

6.3.5. Korišćeni modeli rastvarača

U okviru teze korišćen je SMD model rastvarača kako bi se što bolje opisali eksperimentalni rezultati [255]. Naziv modela se sastoji od sledećih skraćenica: S označava rastvorak (*solute*) i D se odnosi na elektronsku gustinu rastvorka koji se nalazi u rastvaraču prikazanom kao dielektrični medijum. Model je univerzalan i može se koristiti za naelektrisane i nenalektrisane čestice koje su rastvorene u supstancama za koje su poznati dielektrična konstanta, indeks prelamanja, površinski napon i parametri kao što su kiselosti/baznosti. Parametri modela su dobijeni na osnovu 2821 eksperimentalnog podatka koji uključuju slobodne energije rastvaranja i jonske slobodne energije rastvaranja za veći broj vrsta rastvorenih u više rastvarača. Greška određivanja slobodnih energija rastvaranja za neutralne vrste je do 4,18 kJ/mol a za jonske oko 16 kJ/mol. SMD model je predložen za računanje promene Gibsove slobodne energije prilikom rastvaranja.

6.3.6. Teorija prirodnih vezivnih orbitala (Natural Bond Orbital Analysis - NBO)

Dijagonalizacijom matrica gustine prvog reda dobijaju se prirodne orbitale (*natural orbitals*), a njihovi okupacioni brojevi predstavljaju svojstvene vrednosti. Analiza vezivnih prirodnih orbitala (*Natural Bond Orbital*, NBO) je urađena na osnovu

programa koji su razvili Veinhold (*Weinhold*) i saradnici [256–258]. NBO orbitale omogućavaju precizno opisivanje elektronske gustine i predstavljaju ortonormirani skup lokalizovanih prirodnih orbitala [259]. Način prikazivanja je intuitivno sličan standardnom hemijskom, Luisovom, modelu sa slobodnim i vezivnim parovima. Prilikom crtanja orbitala u NBO analizi varijacionom metodom se traži optimalni način prikazivanja dvocentričnih veza i usamljenih elektronskih parova, pri čemu je osnovni uslov da N prirodnih vezivnih orbitala bude okupirano.

6.3.7. Teorijski mehanizmi antioksidacione aktivnosti

U literaturi se obično navodi nekoliko mehanizama kojima jedinjenja sa jednom ili više hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu, u koja spadaju i ispitivani neurotransmiteri, njihovi prekursori i metaboliti, mogu redukovati različite radikalske vrste. Mehanizmi se mogu podeliti u dve grupe: oni koji uključuju reakcije prenosa vodonika (*Hydrogen Transfer*, HT) i reakcije građenja radikalskog adukta (*Radical Adduct Formation*, RAF) [260,261]. Prvu grupu čine tri mehanizma koji se razlikuju u broju koraka i vrstama koje učestvuju u reakciji, ali su krajnji produkti isti – radikal antioksidansa i redukovani oblik radikalske vrste.

1) Prenos atoma vodonika (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) predstavlja mehanizma uz kome se vodonikov atom prenosi sa antioksidansa (AOH) na radikal ($R\bullet$), pri čemu nastaju molekul redukovanog radikala (RH) i radikal antioksidansa ($AO\bullet$) koji je manje reaktivan od početne radikalske vrste.



Mehanizam koji se često poistovećuje sa HAT-om, ali se zbog svog biološkog značaja ovde izdvaja kao poseban, je spregnuti prenos protona i elektrona (*Proton Coupled Electron Transfer* – PCET). Pretpostavlja se da je ovaj mehanizam prisutan u mnogim biološkim i biohemijskim procesima i da je od velike važnosti [262,263]. Razlika između ova dva mehanizma će detaljnije biti ispitana u rezultatima koji se odnose na reakciju dopamina, epinefrina, norepinefrina i L-DOPA sa DPPH radikalom.

2) Prenos jednog elektrona i prenos protona (*Single Electron Transfer-Proton Transfer*, SET-PT) je mehanizma koji se odvija u dva koraka. U prvom se prenosi elektron usled čega su proizvodi prve reakcije radikal-katjon ($AOH^{+\bullet}$) nastao od

antioksidansa i anjon (R^-) nastao od radikalske vrste. U drugom koraku se razmenjuje proton sa pomenutih proizvoda reakcije.



3) Gubitak protona praćen prenosom elektrona (*Sequential Proton Loss Electron Transfer*, SPLET) je takođe mehanizam u koji su uključena dva procesa, odvajanje protona sa antioksidansa što dovodi do nastanka anjona (AO^-), i prenos elektrona.



Na osnovu pomenutih mehanizama definisan je niz deskriptora sa fizičko-hemijskim značenjem kojima se može upoređivati i predviđati antiradikalna aktivnost jedinjenja.

1) Entalpija raskidanja veze (*Bond Dissociation Enthalpy*, BDE) je veličina koja kvantifikuje reakcije opisane HAT mehanizmom. Ova vrednost se dobija kada se veza O–H homolitički raskine.

$$BDE = H(AO^\bullet) + H(H^\bullet) - H(AOH) \quad (20)$$

Veličine $H(ArOH)$, $H(ArO^\bullet)$ i $H(H^\bullet)$ predstavljaju entalpiju molekula, nastalog radikala i atoma vodonika.

2) Potencijal jonizacije (*Ionization Potential*, IP) je veličina koja opisuje otpuštanja elektrona i nastanak radikal-katjona antioksidansa u prvom koraku SET-PT mehanizma.

$$IP = H(ArOH^{\bullet+}) + H(e^-) - H(AOH) \quad (21)$$

Entalpije radikal-katjona i elektrona su u prethodnoj jednačini označeni sa $H(ArOH^{\bullet+})$ i $H(e^-)$.

3) Entalpija disocijacije protona (*Proton Dissociation Enthalpy*, PDE) je veličina koja definiše drugi korak SET-PT mehanizma u kome nastaje radikal polaznog molekula koji se ponaša kao antioksidans.

$$\text{PDE} = \text{H}(\text{AO}^\bullet) + \text{H}(\text{H}^+) - \text{H}(\text{AOH}^{++}) \quad (22)$$

4) Afinitet prema protonu (*Proton Afinity*, PA) je veličina koja definiše lakoću otpuštanja protona u prvom koraku SPLET mehanizma.

$$\text{PA} = \text{H}(\text{AO}^-) + \text{H}(\text{H}^+) - \text{H}(\text{AOH}) \quad (23)$$

Veličina $\text{H}(\text{H}^+)$ se prvi put pojavljuje u ovom mehanizmu i označava entalpiju protona.

5) Entalpija prenosa elektrona (*Electron Transfer Enthalpy*, ETE) opisuje drugi korak SPLET mehanizma i dobijanje radikala od anjona prenosom elektrona.

$$\text{ETE} = \text{H}(\text{AO}^\bullet) + \text{H}(\text{e}^-) - \text{H}(\text{AO}^-) \quad (24)$$

Entalpije protona i elektrona su preuzete iz literature za ispitivanu kombinaciju funkcionala i baznog skupa [264].

Ukoliko se ispituju reakcije prema opisanim mehanizmima sa konkretnim radikalima, mogu se izračunati i promene entalpije reakcija. Na osnovu njih se može prodiskutovati spontanost reakcija izražena kroz pojmove endotermnost/egzotermnost. U nastavku, kroz jednačine 25-29, veličine $\text{H}(\text{R}^\bullet)$, $\text{H}(\text{RH})$ i $\text{H}(\text{R}^-)$ predstavljaju entalpije ispitivanog radikala, njegovog molekula i anjona nastalih u reakcijama.

$$\Delta\text{H}_{\text{HAT}} = \text{H}(\text{AO}^\bullet) + \text{H}(\text{RH}) - \text{H}(\text{AOH}) - \text{H}(\text{R}^\bullet) \quad (25)$$

$$\Delta\text{H}_{\text{IP}} = \text{H}(\text{AOH}^{++}) + \text{H}(\text{R}^-) - \text{H}(\text{AOH}) - \text{H}(\text{R}^\bullet) \quad (26)$$

$$\Delta\text{H}_{\text{PDE}} = \text{H}(\text{AO}^\bullet) + \text{H}(\text{RH}) - \text{H}(\text{AOH}^{++}) - \text{H}(\text{R}^-) \quad (27)$$

$$\Delta\text{H}_{\text{PA}} = \text{H}(\text{AO}^-) + \text{H}(\text{RH}) - \text{H}(\text{AOH}) - \text{H}(\text{R}^-) \quad (28)$$

$$\Delta\text{H}_{\text{ETE}} = \text{H}(\text{AO}^\bullet) + \text{H}(\text{R}^-) - \text{H}(\text{ArO}^-) - \text{H}(\text{R}^\bullet) \quad (29)$$

RAF mehanizam karakteriše nastanak adukta između radikalske vrste i ispitivanog molekula, pri čemu je novonastala vrsta manje reaktivna. Ovaj mehanizam je od značaja kod vrsta koje poseduju dvostruke i trostruke veze. Elektrofilitnost reaktivne

vrste je važan parametar, kao i njena veličina, zbog sternih efekata koji mogu uticati na formiranje adukta [11]. Ovaj mehanizam je određen kao dominantan u reakcijama karotenoida sa alkil, alkoksil, benzilperoksil-radikalima kao i sa glutationom. Ovaj mehanizam je takođe karakterističan za reakciju različitih antioksidanasa sa hidroksi-radikalom [183].



$$\Delta H = H([\text{ArOH-R}]^\bullet) - H(\text{ArOH}) - H(\text{R}^\bullet) \quad (31)$$

Endotermnost/egzotermnost reakcije izračunava se na osnovu entalpija adukta, molekula i radikala, označenih sa $H([\text{ArOH-R}]^\bullet)$, $H(\text{ArOH})$ i $H(\text{R}^\bullet)$.

6.3.8. Izračunavanje konstante brzine prema teoriji prelaznog stanja

Reakcije u kojima dolazi do prenosa atoma vodonika ili protona se mogu opisati dodatno i Teorijom prelaznog stanja (*Transition State Theory*, TST). Ovakav postupak uključuje optimizaciju prelaznog stanja (*Transition State*, TS). Najčešće se primenjuje tzv. *synchronous transit guided quasi-Newton method* (STQN) metod na odabranom nivou teorije. Praćenjem unutrašnje reakcione koordinate (*Intrinsic Reaction Coordinate*, IRC) dolazi se do reakcionog kompleksa (*Reactant Complex*, RC) i proizvodnog kompleksa (*Product Complex*, PC). Prilikom optimizacije TS, RC i PC su spin i naelektrisanje su očuvani. Prilikom analize normalnih oblika vibracija prelazno stanje karakteriše jedna imaginarna frekvencija, dok RC i PC nemaju ni jednu imaginarnu frekvenciju.

Konstanta brzine, na osnovu TST, se izračunava za 1 M standardno stanje vrsta, primenom sledeće jednačine:

$$k_{\text{proces}} = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (32)$$

U prethodnoj jednačini, k_B i h su Bolcmanova i Plankova konstanta, $\Delta G^\ddagger$ je Gibsova slobodna energija aktivacije, R je univerzalna gasna konstanta, T je temperatura, σ je degeneracija reakcione putanje, koja opisuje broj mogućih reakcionih puteva, dok je κ korekcija za efekat tunelovanja. Termodinamički podaci i particione funkcije se preuzimaju iz kvatno-hemijskih proračuna. U ovoj disertaciji su konstante brzina svih reakcija izračunate na temperaturi od 298 K.

6.3.9. Izračunavanje konstante brzine reakcije prenosa elektrona prema Markusovoj teoriji

Reakcije u kojima se prenosi elektron (*Electron Transfer*, ET) se ne mogu opisati klasičnom teorijom prelaznog stanja. Za izračunavanje brzina ovih reakcija se koristi Markusova (*Marcus*) teorija [265]. Aktivaciona barijera za ovaj proces zavisi od dva termodinamička parametra – slobodne energije aktivacije, ΔG_{ET}^0 , i energije nuklearne reorganizacije, λ . Energija nuklearne reorganizacije, λ , se može izračunati kao razlika dva člana, razlike neadijabatskih energija proizvoda i reaktanata i razlike slobodnih energija proizvoda i reaktanata:

$$\Delta G_{ET}^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{ET}^0}{\lambda} \right)^2 \quad (33)$$

$$\lambda \approx \Delta E_{ET} - \Delta G_{ET}^0$$

Prema Markusovoj teoriji izraz za konstantu brzine je:

$$k_{ET} = \frac{k_B T}{h} \exp \left(\frac{-\Delta G_{ET}^\ddagger}{RT} \right) \quad (34)$$

Teorijska ispitivanja za različite reakcija su pokazala da su konstante brzina za ovaj tip procesa uporedive sa konstantama difuziono-kontrolisanih reakcija. Prema tome, prividna konstanta reakcije, k_{app} , se može izračunati po Kolins-Kimbalovoj (*Collins-Kimball*) teoriji [266]:

$$k_{app} = \frac{k_D k_{ET}}{k_D + k} \quad (35)$$

Kako bi se dobila konstanta brzine uravnoteženog stanja po Smolučovskom (*steady-state Smoluchowski rate constant*) [184], k_D , može se pretpostaviti slučaj ireverzibilne bimolekulske difuziono-kontrolisane reakcije:

$$k_D = 4\pi R D_{AB} N_A \quad (36)$$

U jednačini 36, R je univerzalna gasna konstanta, D_{AB} je difuzioni koeficijent reaktanta (zbir pojedinačnih difuzionih koeficijenata), slobodnog radikala i molekula sa antiradikalnim svojstima, N_A je Avogadrova konstanta. Vrednosti difuzionih

koeficijenta se mogu proceniti korišćenjem Stoks-Ajnštajnovog (*Stokes, Einstein*) pristupa:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (37)$$

Parametri u jednačini 37 koji se odnose na rastvarač su: viskoznost, η , i radijus, a .

6.3.10. Kvantna teorija atoma u molekulu (*Quantum Theory of Atoms in Molecules, QTAIM*)

Kvantna teorija atoma u molekulu (*Quantum theory of atoms in molecules – QTAIM*) je razvijena od strane Badera (*Bader*) [267–269] tokom druge polovine 20. veka. On je pretpostavio da elektronska gustina ima značajnu ulogu za razumevanje i objašnjavanje eksperimentalnih rezultata u hemiji. Ova teorija povezuje koncepte iz hemije, hemijsku strukturu, hemijsku vezu, hemijsku reaktivnost, prenosivost osobina jedne grupe u različitim molekulima sa topologijom rasporeda elektronske gustine [270].

Topologija elektronske gustine u molekulu će imati svoje maksimume na položajima jezgra zbog privlačne sile koja postoji između suprotno naelektrisanih čestica. Ovakvo stanovište povezano je sa definicijom atoma koja pretpostavlja da se granice atoma mogu definisati na mestima gde postoji ravnoteža sila koje osećaju elektroni. Kritična tačka se može definisati kao mesto na kome je prvi izvod elektronske gustine jednak nuli i to u sve tri koordinate. Gradijent skalarne funkcije, kao što je elektronska gustina, je u tački prostora vektor koji je usmeren u pravcu najveće promene, sa intenzitetom jednakim toj promeni [270]. Kritične tačke u molekulu se mogu klasifikovati na osnovu vrednosti ranga (*rank*, w) i zakrivljenosti (*curvature*, σ), i kraće se označavaju sa (w, σ) . Rang predstavlja broj ne-nultih vrednosti izvoda ρ u kritičnoj tački. Kritične tačke kod kojih je ova vrednost manja od 3 su matematički nestabilne i najčešće ne postoje kod molekula u osnovnom stanju. Zakrivljenost je definisana kao algebarski zbir znakova zakrivljenosti. Prema ovoj podeli postoji četiri tipa stabilnih kritičnih tačaka:

1. Nuklearne kritične tačke (*nuclear critical points – NCP*) (3,-3) kod kojih postoje tri negativne zakrivljenosti i kod kojih je ρ u lokalnom maksimumu.
2. Kritične tačke veze (*bond critical points – BCP*) (3,-1) kod kojih postoje dve negativne zakrivljenosti.

3. Kritične tačke prstena (*ring critical points* – RCP) (3,+1) kod kojih postoje dve pozitivne zakrivljenosti.
4. Kritične tačke kaveza (*cage critical points* – CCP) (3,3) kod kojih postoje tri pozitivne zakrivljenosti.

Između kritičnih tačaka postoji vrlo striktna topološka veza koja u slučaju izolovanih molekula potiče od Poenkar-Hopfove (*Poincare-Hopf*) veze:

$$n_{\text{NCP}} + n_{\text{BCP}} + n_{\text{RCP}} + n_{\text{CCP}} = 1 \quad (38)$$

RCP se uvek može naći u prostoru koji je ograničen hemijski povezanim atomima dok se CCP javlja kod struktura kod kojih je više prstenova povezano tako da zatvara određenu zapreminu prostora. Kritična tačka veze postoji između dva hemijski vezana atoma i predstavlja maksimum elektronske gustine na liniji koja spaja dva atoma.

Na osnovu vrednosti elektronske gustine i laplasijana interakcije se mogu podeliti na dve grupe: podeljene interakcije (*shared interactions*) i tzv. *closed shell* interakcije. Podeljene interakcije predstavljaju kovalentne veze koje karakteriše vrednost elektronske gustine u BCP od 0,1 au (*atomic units* – atomske jedinice) i velika negativna vrednost laplasijana. Drugi tip interakcija, *closed shell* interakcije, obuhvataju jonske, vodonične veze i Van der Valsove interakcije. Za njih je karakteristična vrednost elektronske gustine između 0,001 i 0,04 au i mala pozitivna vrednost laplasijana.

QTAIM analiza je u okviru teze korišćena za ispitivanje veza u molekulu, posebno vodoničnih veza i nekovalentnih interakcija sa ciljem da se dodatno objasni stabilnost određenih konformera. Korišćen je program AIMAll [271].

6.3.11. Fukui funkcije

Fukui funkcije, predložene od strane Para (*Parr*) i Janga (*Yang*) 1984. godine [272–274], predstavljaju diferencijalnu promenu elektronske gustine usled promene ukupnog broja elektrona:

$$f(r) = \left[\frac{\delta \mu}{\delta v(r)} \right]_N = \left[\frac{\delta \rho(r)}{\delta N} \right]_{v(r)} \quad (39)$$

U jednačini 39 μ i N su hemijski potencijal i broj elektrona, a $v(r)$ je spoljašnji potencijal. Kondenzovane Fukui funkcije (*Condensed Fukui Functions*, CFF) [275] olakšavaju

predviđanje reaktivnih mesta u molekulu. Kondenzovane Fukui funkcije za atom, označen kao A, se mogu prikazati sledećim jednačinama:

$$\begin{aligned} f_A &= q_{N-1}^A - q_N^A \\ f_A^+ &= q_N^A - q_{N+1}^A \\ f_A^0 &= \frac{|f_A^+ + f_A|}{2} = \frac{|q_{N-1}^A + q_{N+1}^A|}{2} \end{aligned} \quad (40)$$

Naelektrisanja atoma A u neutralnom molekulu, radikal-katjonu i radikal-anjonu su označena sa q_N^A , q_{N-1}^A i q_{N+1}^A [275]. Prvom jednačinom se mogu odrediti reaktivna mesta za elektrofilni, drugom za nukleofini i trećom za radikalski napad. Generalno, veće vrednosti kondenzovanih Fukui funkcija za određeni atom daju veću verovatnoću za dati tip reakcija. U literaturi je opisano nekoliko načina za izračunavanje naelektrisanja atoma A [275–277]. U tezi su iskorišćena naelektrisanja dobijena iz NBO i QTAIM analiza.

7. Rezultati i diskusija

7.1. Eksperimentalno i teorijsko ispitivanje strukture metabolita neurotransmitera

Oktopamin, 3-metoksitramin, 6-hidroksidopamin i VMA su četiri metabolita neurotransmitera za koje u literaturi nije data spektroskopska i teorijska analiza strukture. Zbog važnosti dobrog određivanja najstabilnijeg konformera za izračunavanje termodinamičkih i kinetičkih parametara reakcija sa slobodnim radikalima, ovi metaboliti su detaljno ispitani. Najstabilniji konformeri su optimizovani za sva četiri metabolita, analizirane su intramolekulske interakcije koje dovode do stabilizacije strukture, upoređeni su vibracioni (IC i ramanski), NMR i elektronski spektri sa predviđenim. Prvo je opisan 3-metoksitiramin kao najvažniji metabolit dopamina. Nakon toga su prikazani oktopamin i 6-hidroksitiramin koji takođe imaju amino grupu na alifatičnom nizu, ali različit broj hidroksilnih grupa u odnosu na 3-metoksitiramin. Ova tri metabolita su optimizovana u protonovanom obliku zbog toga što je to dominantni oblik na fiziološkim pH vrednostima. Eksperimentalno su ispitani njihovi hidrohloridi. Analiziran je uticaj karboksilne grupe alifatičnog niza na spektralne karakteristike i stabilnost konformera VMA. Koeficijent korelacije (R) i vrednost srednje apsolutne greške (*Mean Absolute Error*, MAE) su korišćeni za potvrdu kvaliteta teorijskih vrednosti.

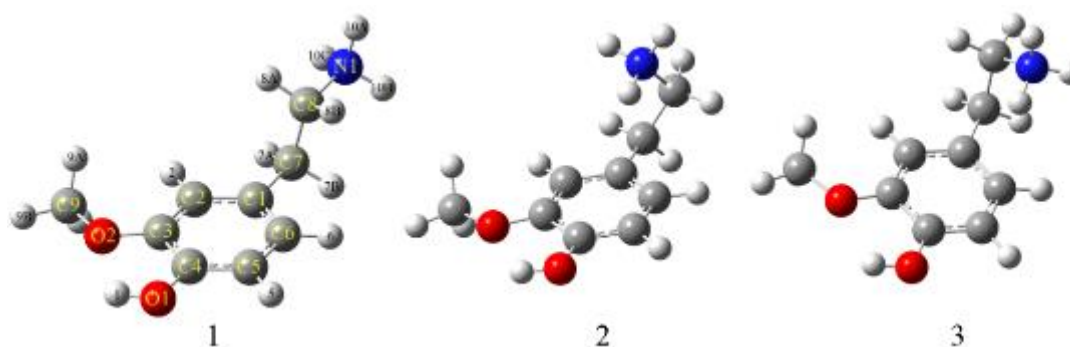
7.1.1. 3-Metoksitiramin

Ukoliko se uporede strukture dopamina i 3-metoksitiramina (3-MT) može se zaključiti da je jedna od hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu zamenjena metoksi grupom (slika 4). Ovakav raspored supstituenata na aromatičnom prstenu dovodi do promene geometrija mogućih konformera, posebno zbog voluminoznosti metoksilne grupe, ali i formiranja vodonične veze između metoksilne i hidroksilne grupe. Struktura 3-MT je optimizovana korišćenjem funkcionala: B3LYP, B3LYP-D3BJ, M05-2X i M06-2X, sa 6-311++G(d,p) bazisnim skupom. Kao polazna struktura korišćena je kristalografska struktura [278]. Vrednosti eksperimentalnih i teorijskih dužina i uglova veza su date u tabeli S1, dok su parametri R i MAE prikazani u tabeli 1.

Tabela 1 Parametri korelacije između eksperimentalnih i teorijskih dužina i uglova veza 3-MT (bazisni skup 6-311++G(d,p))

Funkcional	Dužine veza		Uglovi veza	
	R	MAE [Å]	R	MAE [°]
B3LYP	0,949	0,094	0,822	1,854
CAM-B3LYP	0,949	0,094	0,821	1,896
B3LYP-D3BJ	0,942	0,078	0,810	1,889
M05-2X	0,949	0,025	0,805	1,947
M06-2X	0,944	0,028	0,809	1,917

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1 može se zaključiti da odabrani funkcionali dobro reprodukuju dužine i uglove veza. Najveće vrednosti koeficijenta korelacije za dužine veza su kod struktura optimizovanih B3LYP, CAM-B3LYP i M05-2X funkcionalima, pri čemu je najniža vrednost apsolutne greške kod trećeg pomentuog funkcionala. U strukturi optimizovanoj na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou postoji najveća vrednost parametra R za uglove veza. Pretpostavka je da kod uglova veza teorijskih struktura postoji značajna razlika u odnosu na eksperimentalne vrednosti zbog optimizacije u vakuumu, koja ne uzima u obzir intermolekulske interakcije. Poređenjem svih prikazanih parametara, funkcional B3LYP je odabran za optimizaciju strukture i poređenje sa eksperimentalnim spektrima. Daljom analizom strukture 3-MT dobijena su tri stabilna konformera, a na osnovu kristalografske strukture. Konformeri su prikazani na slici 13.



Slika 13 Najstabilniji konformeri molekula 3-MT (strukture optimizovane na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Dobijene strukture se međusobno razlikuju u položaju alifatičnog niza u odnosu na aromatični prsten. Relativne vrednosti Gibsove slobodne energije u odnosu na

najstabilniji konformer su izračunate kako bi se ispitaio uticaj intramolekulskih interakcija. Najstabilniji konformer je označen brojem 3 na slici 13, dok najmanje stabilan odgovara kristalografskoj strukturi. Razlika u stabilnosti ova dva konformera je 18 kJ/mol. Struktura 2, kod koje je alifatični niz iznad aromatičnog prstena, ima Gibsovu slobodnu energiju veću za 2,3 kJ/mol od konformera 3. Na osnovu rezultata perturbacione teorije drugog reda detaljnije je analizirana stabilnost konformera. Najjače interakcije prisutne u molekulu, sa energijama od 14 do 74 kJ/mol, su hiperkonjugacija i rezonancija prilikom preklapanja $\pi(\text{C}-\text{C})$ i $\pi^*(\text{C}-\text{C})$ orbitala, usled kojih slabe pomenute veze. Rotacija oko diedarskog ugla C1–C7–C8–N1 nema uticaja na ove interakcije. Druga značajna interakcija je između slobodnog para na kiseoniku i nevezivnih orbitala u aromatičnom prstenu koje su prostorno bliske tom atomu. Ove interakcije imaju energiju između 26 i 128 kJ/mol, i ostvaruju se između kiseonikovog atoma na poziciji 1 i $\pi^*(\text{C4}-\text{C5})$ i kiseonikovog atoma na poziciji 2 i $\pi^*(\text{C2}-\text{C3})$. Slaba vodonična veza koja se formira između O1–H i O2 je jačine oko 5 kJ/mol. Kod konformera 1 alifatični niz je postavljen tako da je amino grupa daleko od prstena što onemogućava uspostavljanje interakcije. U slučaju strukture 2 postoji interakcija između $\pi(\text{C2}-\text{C3})$ i $\sigma^*(\text{N1}-\text{H10})$ jačine oko 9 kJ/mol. Za poslednji konformer energija stabilizacije iznosi 16,7 kJ/mol što ukazuje da je ova struktura stabilnija od preostale dve. Ovakav tip interakcija se naziva katjon $\rightarrow\pi$ interakcija. Slične stabilizacione interakcije su uočene i prilikom analize strukture dopamina [120], 2-fenilamina [113] i histimina [279].

Analiza vibracionih spektara

Ramanski i IC spektri molekula 3-MT su snimljeni za supstancu u čvrstom stanju. Teorijski spektri su predviđeni na osnovu optimizovane strukture 1 iz razloga što ona pokazuje najveću sličnost sa eksperimentalno dobijenom kristalografskom strukturom. Pretpostavljeno je da su u kristalnoj strukturi slabe intermolekulske interakcije između N–H i π -elektronskog sistema nadjačane interakcijama između polarnih grupa različitih molekula. Računom su dobijena 72 normalna oblika vibracija. Zbog niske simetrije molekula ramanski i IC spektri molekula imaju maksimume na sličnim talasnim brojevima. Faktori skaliranja za teorijske vibracione spektre su određeni metodom najmanjih kvadrata i iznose 0,980 za oba tipa vibracionih spektara. Skalirane vrednosti talasnih brojeva, asignirane trake i vrednosti i PED analize su date u tabeli S2. Skalirane

vrednosti su iskorišćene za dalju diskusiju. Vibracione trake su asignirane primenom VEDA programa [280].

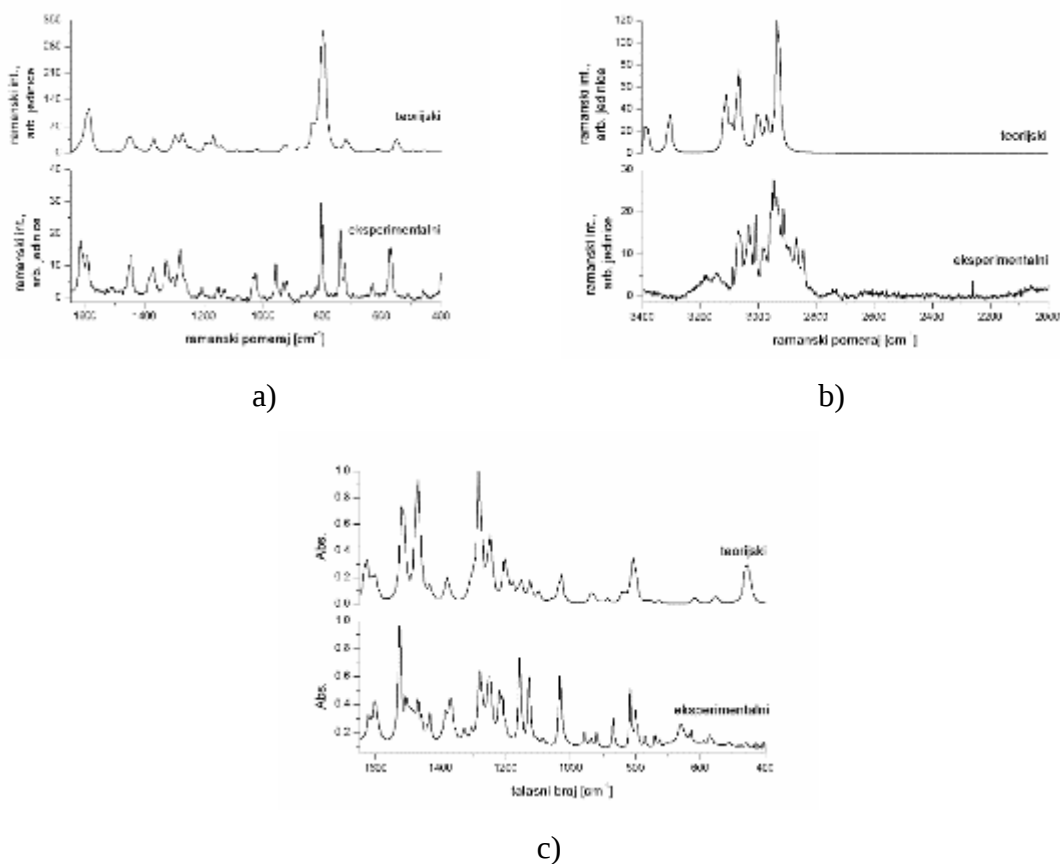
Vrednosti iz Tabele S2 pokazuju linearnu korelaciju između eksperimentalnih i teorijskih talasnih brojeva. Kvalitativni parametar iskorišćen za ovo poređenje je koeficijent korelacije, koji je veći od 0,99 i za IC i za ramanski spektar. Uporedni eksperimentalni i teorijski spektri 3-MT-a su prikazani na slici 14. Na osnovu ovog prikaza može se zaključiti da su talasni brojevi dobro reprodukovani ali da su zbog optimizacije u gasnoj fazi prisutne određene razlike. Ovo je posebno prisutno kod vibracija grupa koje su pod uticajem građenja vodonične veze, a koja je značajan parametar za supstance u čvrstom stanju. U nastavku su prodiskutovane karakteristične trake u spektrima.

Traka koja se izdvaja u oblasti između 4000 i 2000 cm^{-1} asignirana je N-H i O-H istežućim vibracijama (Tabela S2). Širina trake u eksperimentalnom spektru je posledica građenja vodonične veze u čvrstom uzroku. U oblasti visokih vrednosti talasnih brojeva uočene su trake koje potiču od C-H istežućih vibracija, i to od grupa na alifatičnom nizu i aromatičnom prstenu. Vrednosti iz PED analize ukazuju da se normalni oblici u oblasti od 3440 do 2940 cm^{-1} skoro isključivo asigniraju jednom tipu vibracija (98-100%), dok u ostalim oblastima normalni oblici uključuju doprinose većeg broja grupa i različitih tipova vibracija.

Srednju oblast vrednost frekvencija (1700-1000 cm^{-1}) u IC i ramanskom spektru takođe karakteriše nekoliko intenzivnih traka. Vrednosti talasnih brojeva traka, srednjih do veoma intenzivnih, su 1616 (R), 1603 (IC), 1593 (R), 1279 (IC i R), 1249 (IC), 1160 (IR), 1032 (IC) i 1025 cm^{-1} (R). Ove trake su asignirane C-C i C-O istežućim vibracijama. Savijajućim vibracionim oblicima (H-C-C, C-C-C, H-C-H, H-C-N i H-O-C) odgovaraju trake na 1526, 1369, 1326, 12010, 1127 i 1032 cm^{-1} u IC spektru i 1445, 1371, 1327, 1035 i 1025 cm^{-1} u ramanskom spektru. U pomenutoj oblasti se pojavljuju i trake malog intenziteta koje se takođe mogu pripisati istežućim (C-C i C-O) kao i savijajućim (H-C-C, C-C-C, H-C-H, H-C-N i H-O-C) oblicima. Trake istežućih oblika se takođe nalaze na 1433 (IC), 1385 (IC), 1150 (R), 1085 (IC), 1083 (R), a trake savijajućih oblika na 1623 (IC), 1508 (R), 1506 (IC), 1471 (IC), 1458 (IC), 1304 (IC i R), 1206 (R) i 1131 cm^{-1} (R).

U oblasti niskih frekvencija (ispod 1000 cm^{-1}) intenzivne i trake srednjeg intenziteta, asignirane C-C, C-O i N-C istežućim oblicima vibracija aromatičnog

prstena i alifatičnog niza, se nalaze na 803 (R) i 799 (IC). Trake niskog intenziteta, koje se nalaze na 957 (IC i R), 929 (R) i 919 (IC), 868 (IC), 772 (IC), 725 (R), 739 (IC), 630 (R) i 327 cm^{-1} (IC), odgovaraju već pomenutim istežućim i savijajućim vibracijama. Trake torzionih, C–C–C–C, H–C–C–C, C–C–C–O, H–O–C–C i C–C–O–C, vibracija benzenovog prstena se nalaze na 821 (R), 816 (IC), 724 (IC i R), 571 (IC i R), 460 (IC), 457 (IC i R).



Slika 14 Uporedni prikaz eksperimentalnih i teorijskih spektara 3-MT a) ramanski od 1600 do 400 cm^{-1} , b) ramanski od 4000 do 2000 cm^{-1} i c) IC u oblasti od 1600 do 400 cm^{-1}

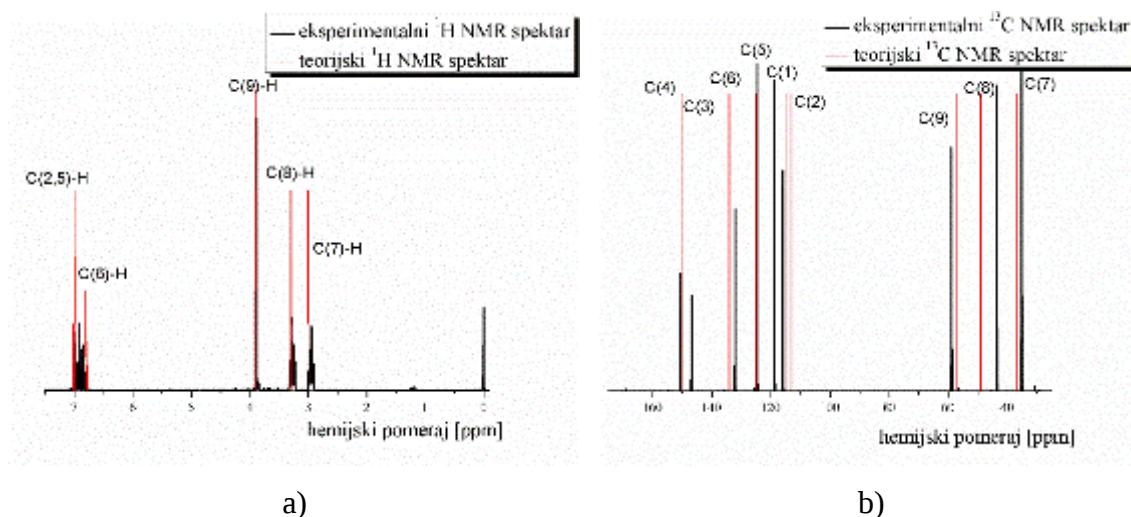
Kao što je prethodno pomenuto, 3-MT pokazuje veliku sličnost u strukturi da dopaminom ali i drugim metabolitima kao što su HVA i DOPAC. Zajednički strukturni parametri uključuju aromatični prsten i alifatični niz. Kod HVA i DOPAC-a umesto amino grupe prisutna je karboksilna grupa. Strukturna sličnost omogućava poređenje vibracionih spektara. Za spektar dopamina u oblasti visokih frekvencija traka istežuće O–

H vibracije, na sobnoj temperaturi, nije primećena [121] dok kod DOPAC-a na 15 K, jeste [143]. U istoj oblasti su primećene trake N–H i C–H istežućih vibracija. U spektru dopamina jedna od najintenzivnijih traka, na 1512 cm^{-1} , assignirana je C–C istežućoj vibraciji, dok je ta traka u spektru 3-MT prisutna na 1526 cm^{-1} . Druga intenzivna traka koje odgovara C–O istežućoj vibraciji se u spektru dopamina nalazi na 1270 cm^{-1} a u spektru molekula 3-MT na 1160 cm^{-1} . Mešoviti oblici tipa H–C–C, H–O–C i C–C se u spektru dopamina, 3-MT-a i DOPAC-a nalaze na $1092/1160/1113\text{ cm}^{-1}$ respektivno. Ostali vibracioni oblici su prisutni u sličnim oblastima spektra uz prisustvo izvesnih razlika koje su posledica prisustva karboksilne i dodatne hidroksilne grupe.

Analiza NMR spektra

Eksperimentalni ^1H i ^{13}C NMR spektri molekula 3-MT su snimljeni u DMSO kao rastvaraču. Za predviđanje hemijskih pomeraja iskorišćen je GIAO metod, zbog toga što je u literaturi pokazano da daje dobre rezultate za molekule slične strukture [157,281]. Svi teorijski hemijski pomeraji su izračunati relativno u odnosu na TMS, koji je optimizovan na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou teorije. Dobijene vrednosti hemijskih pomeraja su skalirane iz razloga što su sistematski bile veće od eksperimentalnih. Poređenje eksperimentalnih i teorijskih spektara je urađeno metodom najmanjih kvadrata, tako što je izračunat koeficijent korelacije između ovih vrednosti. Vrednosti faktora skaliranja dobijene na ovaj način su 0,949 i 0,932 za ^{13}C i ^1H NMR spektre respektivno.

Eksperimentalne i teorijske vrednosti hemijskih pomeraja su prikazane na slici 15 i tabeli 2. Između ovih vrednosti postoji visoki koeficijenti korelacije: 0,994 za ^{13}C spektre i 0,999 za ^1H NMR spektre. Kod poređenja NMR spektara očekivana je bolja korelacija za ^{13}C NMR spektar molekula [281]. Vrednosti MAE su 0,1 i 2,4 ppm za ^1H i ^{13}C NMR spektre respektivno. Najbolje slaganje eksperimentalnih i teorijskih vrednosti je dobijeno za ugljenikove atome aromatičnog prstena zbog rigidnosti strukture i malog uticaja rotacije alifatičnog niza. Kod ugljenikovih atoma u položaju 7 i 8 može se uočiti odstupanje od 2 i 6 ppm najverovatnije zbog omogućene slobodne rotacije alifatičnog niza u rastvoru usled raskidanja slabih intramolekulskih interakcija.



Slika 15 Eksperimentalni i teorijski NMR (struktura optimizovana na na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije) spektri 3-metoksitiramina a) ^1H NMR i b) ^{13}C NMR

Tabela 2 Eksperimentalni i teorijski hemijski pomeraji (struktura optimizovana na na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije) u NMR spektrima

	$\delta(^1\text{H})$ [ppm]			$\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]	
	Teorijski	Eksperimentalni		Teorijski	Eksperimentalni
C7-H	3,0	3,0	C7	37	35
C7-H	3,0	3,0	C8	49	43
C8-H	3,3	3,4	C9	57	58
C8-H	3,3	3,4	C2	113	117
C9-H	3,9	4,0	C1	115	119
C9-H	3,9	4,0	C5	125	125
C9-H	3,9	4,0	C6	134	132
C6-H	6,8	6,8	C3	150	148
C2-H	7,0	6,9	C4	151	150
C5-H	7,0	6,9	R		0,994
R		0,999	MAE		2,4
MAE		0,1			

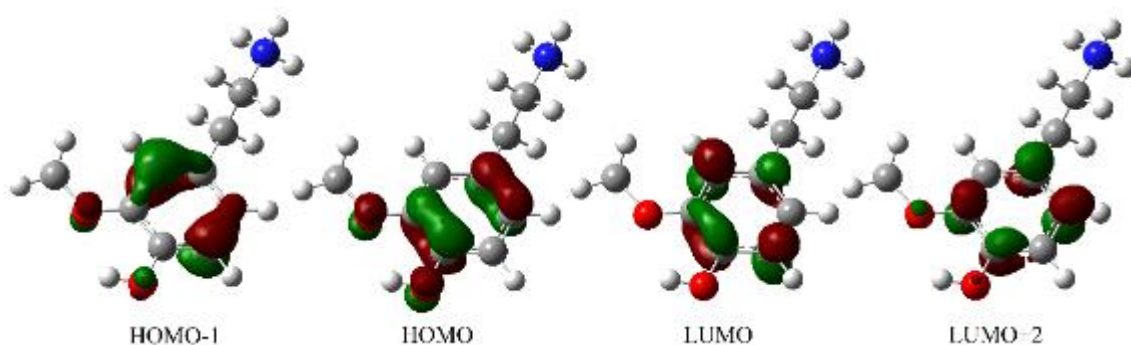
Analiza elektronskih spektara

Eksperimentalni elektronski spektar 3-MT u vodi pokazuje tri široka maksimuma na 273, 223 i 200 nm (slika S1), pri čemu intenzitet prelaza raste sa opadanjem talasne dužine. Teorijska analiza prelaza, kroz TD-DFT pristup, je urađena za konformer koji odgovara kristalografskoj strukturi zbog pretpostavke da su međumolekulske interakcije između rastvarača i rastvorka jače od intramolekulskih interakcija konformera 2 i 3. Tabela 3 daje vrednosti eksperimentalnih i teorijskih vrednosti talasnih dužina,

oscilatorne jačine i prisutne tipove prelaza. Prvi prelaz je asigniran HOMO→LUMO prelazu sa zastupljenošću od 78%. Razlika između eksperimentalne i teorijske vrednosti položaja prve trake je oko 20 nm. Druga traka je pripisana HOMO→LUMO+2 prelazu, a treća HOMO-1→LUMO prelazu. Relativni intenziteti traka, kroz vrednosti oscilatornih jačina prelaza, su dobro reprodukovane.

Tabela 3 Eksperimentalne i teorijske (struktura optimizovana na B3LYP/6-311G(d,p) nivou teorije) talasne dužine elektronskih prelaza

Talasna dužina [nm]		Parametri prelaza	
Eksperimentalna	Teorijska	Tip prelaza	Oscilatorna jačina
278	254	HOMO→LUMO (78%)	0,0735
223	228	HOMO→LUMO+2 (54%)	0,1089
200	201	HOMO-1→LUMO (52%)	0,3524



Slika 16 Molekulske orbitale uključene u elektronske prelaze molekula 3-MT (struktura optimizovana na B3LYP/6-311G(d,p) nivou teorije, izovrednost 0,07)

Razlike eksperimentalnih i teorijskih dobijenih vrednosti talasnih dužina prelaza su prihvatljive zbog toga što je eksperimentalni spektar snimljen za 3-MT hidrohlorid, tako da su i dodatni joni bili prisutni u vodenom rastvoru, dok su teorijski spektri dobijeni u polarizabilnom kontinuumu. Kako bi se dobilo objašnjenje odstupanja teorijski od eksperimentalnih vrednosti, vizuelizovane su orbitale uključene u prelaze. Četiri orbitale za konformer 1 su prikazane na slici 16. Na osnovu prikazanih orbitala može se zaključiti da su one lokalizovane na aromatičnom prstenu i da nisu pod uticajem rotacije alifatičnog niza. Relativno visoke vrednosti oscilatorne jačine su posledica blizine i sličnosti orbitala uključenih u prelaze. U rastvoru je moguće formiranje specifičnih interakcija koje nisu razmatrane u teorijskom modelu, a koje dodatno stabilizuju molekul i dovode do

batohromnog pomeraja traka. Takođe su moguće interakcije sa kiseonikovim atomima hidroksilne i metoksilne grupe.

7.1.2. Oktopamin

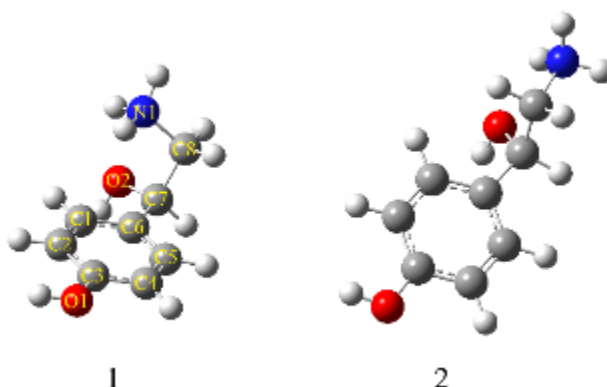
Struktura oktopamina je optimizovana na osnovu kristalografskih podataka iz rada Pakstona (*Paxton*) i saradnika [282]. Kod ovog metabolita je smanjen broj mogućih konformera zbog postojanja samo jedne hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu. Hidroksilna grupa na alifatičnom nizu ostvaruje vodoničnu vezu sa amino grupom. Prilikom ispitivanja najstabilnijeg konformera detaljno su analizirane i interakcije amino grupe sa π -elektronskim sistemom, koje dodatno stabilišu strukture dopamina i 3-metoksitiramina u gasnoj fazi. Poređenje sa kristalografskom strukturom je iskorišćeno za odabir funkcionala koji najbolje reprodukuje eksperimentalne podatke: B3LYP, CAM-B3LYP, B3LYP-D3, M05-2X i M06-2X sa 6-311++G(d,p) bazisnim skupom. U tabeli S3 su prikazane eksperimentalne i teorijske vrednosti dužina i uglova veza za strukture optimizovane različitim funkcionalima. Vrednosti koeficijenta korelacije i srednje vrednosti apsolutne greške su date u tabeli 4.

Tabela 4 Parametri korelacije između eksperimentalnih i teorijskih dužina i uglova veza oktopamina (bazisni skup 6-311++G(d,p))

Funkcional	Dužine veza		Uglovi veza	
	R	MAE [Å]	R	MAE [°]
B3LYP	0,867	0,026	0,960	1,701
CAM-B3LYP	0,886	0,022	0,948	1,591
B3LYP-D3BJ	0,868	0,026	0,961	1,683
M05-2X	0,868	0,027	0,958	1,688
M06-2X	0,859	0,027	0,958	1,688

Odabrani funkcionali dobro opisuju kristalografsku strukturu oktopamina. Vrednosti koeficijenta korelacije su niže nego kod preostalih ispitivanih molekula, što se pretpostavlja da je posledica manjeg broja veza koje su korišćene za poređenje usled jednostavnije strukture. Poređenjem parametara za vrednosti dužina veza zaključeno je da B3LYP-D3BJ i M05-2X funkcionali daju najviše MAE vrednosti, dok su najniže vrednosti MAE za B3LYP-D3BJ i B3LYP. Disperzione interakcije u okviru B3LYP-D3BJ funkcionala poboljšavaju opisivanje strukture u odnosu na funkcional B3LYP. Ista dva funkcionala najbolje opisuju uglove veza. Poređenjem svih parametara zaključeno je

da se struktura oktopamina optimizovana B3LYP-D3BJ funkcionalom može koristiti za poređenje sa eksperimentalnim spektrima. Tokom optimizacije strukture dobijena su dva stabilna konformera oktopamina, slika 17.



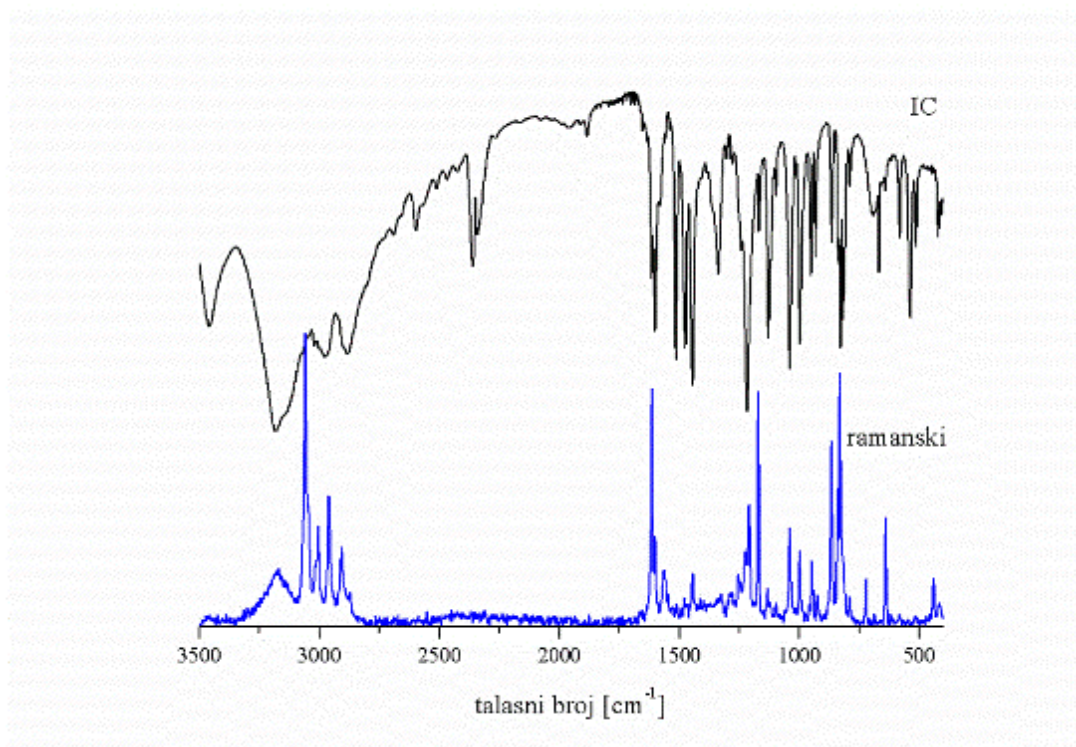
Slika 17 Dva stabilna konformera molekula oktopamina (strukture optimizovane na B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Poređenjem Gibsovih slobodnih energija optimizovanih konformera određena je najstabilnija struktura molekula. Druga struktura je 2 kJ/mol stabilnija od prve. NBO analiza je iskorišćena kako bi se dodatno prodiskutovala stabilnost određenih konformera. Kod deprotonovanih konformera naelektrisanje kiseonikovog atoma na alifatičnom nizu je $-0,750$ a.u., a azota amino grupe $-0,687$ a.u. što omogućava formiranje jake vodonične veze. Kod prvog konformera dva tipa interakcija stabilizuju strukturu: vodonična veza $O\cdots H-N$, energije 3,3 kJ/mol, i katjon $\rightarrow\pi$ interakcije, energije 6,44 kJ/mol. Izduženu strukturu drugog konformera karakterišu vodonična veza $O\cdots H-N$, ukupne jačine 15,95 kJ/mol, ali i hiperkonjugacija $\pi(C-C)\rightarrow\sigma^*(N-H)$ energije 9,9 kJ/mol. Zbog prisustva jačih interakcija drugi konformer je stabilniji.

Analiza vibracionih spektara

Infracrveni i ramanski spektri oktopamina (slika 18) su relativno jednostavni zbog malog broja grupa i određenog stepena simetrije. Vibracioni spektri oktopamina su slični spektrima 3-metoksitiramina zbog prisustva istih funkcionalnih grupa. Strukture ova dva molekula se razlikuju u postojanju hidroksilne grupe na alifatičnom nizu kod oktopamina i metoksilne grupe kod 3-metoksitiramina. Traka na 3500 cm^{-1} potiče od istežuće O–H vibracije dok je široka traka između 3300 i 3100 cm^{-1} posledica istežućih N–H i O–H

vibracija, pri čemu između grupa postoji vodonična veza. U ramanskom spektru traka amino grupe se nalazi na 3060 cm^{-1} . Ova traka je, usled simetrije grupe, vrlo intenzivna. Ostale trake u spektru potiču od istog tipa vibracionog kretanja kao kod prethodno opisanih molekula i nisu prodiskutovane detaljno.



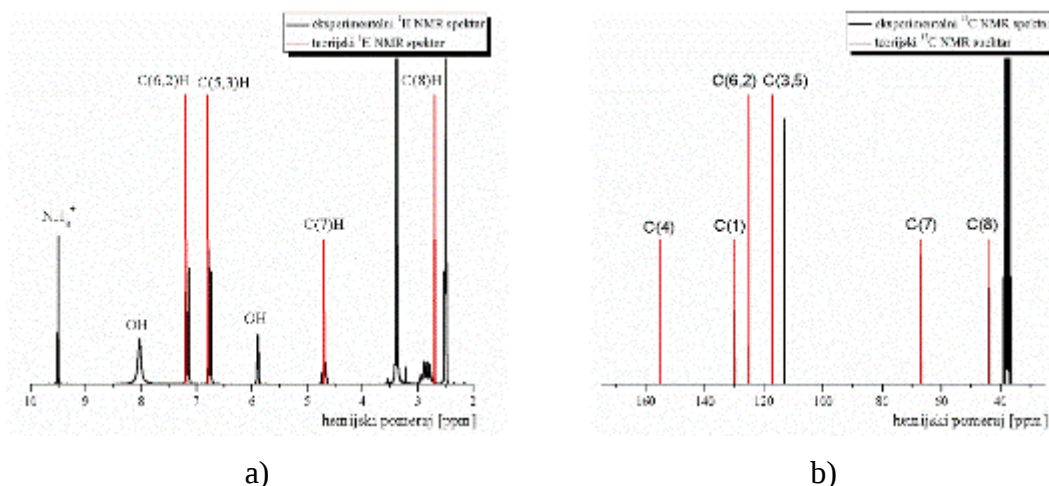
Slika 18 Vibracioni, IC i ramanski, spektari oktopamina

U teorijskim spektrima molekula 3-MT i oktopamina se može uočiti nekoliko razlika. Talasni broj vibracije hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu kod 3-MT je 3763 cm^{-1} (neskalirane vrednosti) dok je kod oktopamina na 3825 cm^{-1} . Ovo pokazuje da je kod molekula 3-MT ostvarena slaba vodonična veza između hidroksilne i metoksilne grupe koja smanjuje talasni broj istežuće vibracije. Talasni brojevi amino grupa su 3500 cm^{-1} kod oba molekula. Kod ostalih oblika vibracionog kretanja nema značajnijih razlika zbog strukturne sličnosti 3-MT i oktopamina.

Analiza NMR spektara

Zbog nižih vrednosti koeficijenata korelacije za dužine veza u oktopaminu, bilo je potrebno dodatno proveriti primenljivost odabranog funkcionala (slika 19). Simulacija

NMR spektara oktopamina je dodatno iskorišćena za poređenje eksperimentalnih i teorijskih hemijskih pomeraja (slika 19). Strukture najstabilnijeg konformera oktopamina i TMS-a su optimizovane u DMSO na B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) nivou teorije. Za predviđanje spektara je korišćena GIAO metoda. Rezultati eksperimentalnih i teorijskih hemijskih pomeraja su dati u tabeli 5. Hemijski pomeraji jezgara u simuliranim spektrima su korigovani na osnovu korelacije sa eksperimentalnim vrednostima. Korelacija je urađena zbog postojanja sistematske greške, koja se odnosi na specifične interakcije sa rastvaračem i prisutnim nečistoćama, ali i mogućnosti olakšane rotacije i postojanja većeg broja konformera. Protoni na polarnim grupama, hidroksilnim i amino, su isključeni iz poređenja zbog velikog uticaja mogućih interakcija na zaklonjenost ovih jezgara. GIAO metod, kao što je prikazano u prethodnim slučajevima, dobro opisuje vrednosti hemijskih pomeraja za ovu klasu jedinjenja.



Slika 19 Eksperimentalni i teorijski NMR (struktura optimizovana na B3LYP-D3BJ /6-311++G(d,p) nivou teorije) spektri oktopamina a) ^1H NMR i b) ^{13}C NMR

Vrednosti koeficijenta korelacije za ^{13}C i ^1H NMR spektre su 0,994 i 0,998, respektivno. Zbog prisutne simetrije kod dobijenog konformera oktopamina, ugljenikovi atomi u položajima C3 i C5, kao i C2 i C6, imaju iste hemijske pomeraje na 117,3 i 125,2 ppm respektivno. Veći hemijski pomeraj je uočen kod atoma koji imaju elektronegativne supstituente, kao što su C4 i C1. Zbog zaklonjenosti okolnim protonima atomi C8 i C7 imaju eksperimentalne vrednosti hemijskog pomeraja ispod 100 ppm. U protonskom spektru takođe postoje parovi koji imaju iste hemijske pomeraje što je posledica okruženja u kome se atomi nalaze. Vodonikovi atomi etil-grupe na položaju C8 imaju

najmanji hemijski pomeraj. Iste vrednosti hemijskih pomeraja imaju protoni na položajima C3 i C5, ali i C2 i C6. Srednja vrednost apsolutne greške je za ^1H NMR spektar 0,1 ppm, dok je za ^{13}C NMR spektar 4,0 ppm. Visoke vrednosti R i niske vrednosti MAE parametara ukazuju da su odabrani teorijski modeli pogodni za opisivanje strukture oktopamina.

Tabela 5 Eksperimentalni i teorijski hemijski pomeraji molekula oktopamina (struktura optimizovana na B3LYP-D3BJ /6-311++G(d,p) nivou teorije) u NMR spektrima

$\delta(^1\text{H})$ [ppm]			$\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]		
	Teorijski	Eksperimentalni		Teorijski	Eksperimentalni
C8-H	2,8	2,7	C8	44	54
C8-H	2,8	2,7	C7	67	74
C7-H	4,7	4,4	C3	117	112
C3-H	6,8	6,9	C5	117	112
C5-H	6,8	6,9	C2	125	125
C2-H	7,2	7,2	C6	125	125
C6-H	7,2	7,2	C1	130	130
R		0,998	C4	155	153
MAE		0,1	R		0,994
			MAE		4,0

Analiza elektronskih spektara

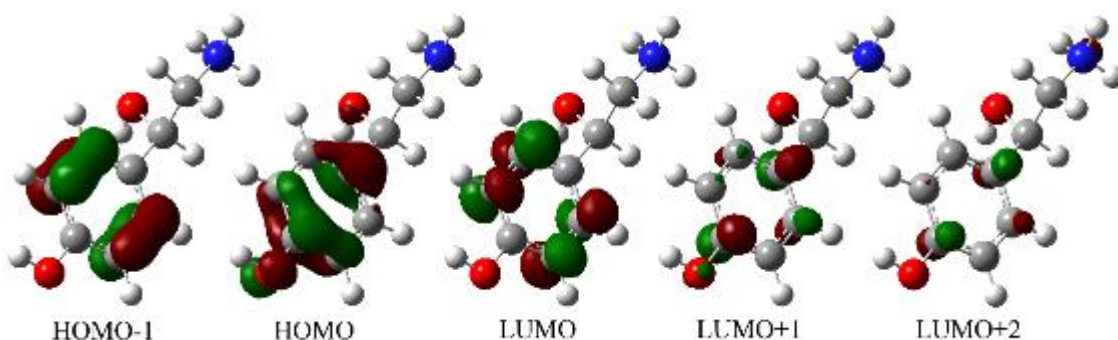
Elektronski spektar oktopamina je snimljen u oblasti od 700 do 200 nm (slika S1). Talasne dužine na kojima se trake nalaze su 280, 230 i 200 nm. Na oko 230 nm postoji maksimum koji je delom prekriven trakom sa maksimumom na 200 nm. Eksperimentalni i teorijski parametri elektronskih prelaza za najstabilniji konformer oktopamina su prikazani u tabeli 6.

Kao i kod 3-MT postoji velika razlika između eksperimentalne i teorijske vrednosti talasne dužine za prvi maksimum, od oko 30 nm, koji je označen kao HOMO→LUMO prelaz. Talasne dužine drugog i trećeg maksimuma pokazuju dobro slaganje između eksperimentalnih i teorijskih vrednosti. Značajno je napomenuti da kod teorijske analize prelaza najveće energije postoji nekoliko prelaza koji imaju bliske talasne dužine, među kojima su HOMO-1→LUMO+1, HOMO-1→LUMO+2 i HOMO-1→LUMO prelazi. Intenzitet prelaza je dobro reprodukovano, pri čemu prelaz na 200 nm ima najveći intenzitet. Orbitale od značaja za elektronske prelaze oktopamina su prikazane na slici 20. Najmanja vrednost oscilatorne jačine je dobijena za prelaz između

HOMO i LUMO orbitale zbog razlike u izgledu i grupama na kojima su orbitale lokalizovane. Veće vrednosti oscilatorne jačine su izračunate za prelaze između HOMO-1, HOMO, LUMO+1 i LUMO+2 orbitala koje su lokalizovane na aromatičnom prstenu.

Tabela 6 Eksperimentalne i teorijske (struktura optimizovana na B3LYP-D3BJ /6-311G(d,p) nivou teorije) talasne dužine elektronskih prelaza u molekulu oktopamina

Talasna dužina [nm]		Parametri prelaza	
Eksperimentalna	Teorijska	Tip prelaza	Oscilatorna jačina
280	249	HOMO→LUMO (80%)	0,0331
230	227	HOMO→LUMO+1 (81%)	0,1266
	197	HOMO-1→LUMO+1 (60%)	0,1026
200	192	HOMO-1→LUMO+2 (42%)	0,2168
	190	HOMO-1→LUMO (61%)	0,5712



Slika 20 Molekulske orbitale uključene u elektronske prelaze molekula oktopamina (struktura optimizovana na B3LYP/6-311G(d,p) nivou teorije, izovrednost 0,07)

7.1.3. 6-Hidroksidopamin

Zbog svog značaja u modernim istraživanjima, ali i strukturne sličnosti sa dopaminom, 6-hidroksidopamin je dodatno ispitan spektroskopskim i teorijskim metodama. Kako bi se odredio najbolji funkcional za opisivanje strukturnih parametara kristalografska struktura [283] 6-hidroksidopamin hidrohlorida je optimizovana korišćenjem sledećih funkcionala: B3LYP, CAM-B3LYP, B3LYP-D3BJ, M05-2X i M06-2X i 6-311++G(d,p) bazisnim skupom. Kao i kod oktopamina, koeficijent korelacije

(R) i srednja vrednost apsolutne greške (MEA) su uzeti kao parametri za poređenje dužina veza i uglova. U tabela 7 date su vrednost parametara za poređenje funkcionala, a eksperimentalne i teorijske vrednosti dužina i uglova veza u tabeli S4.

Tabela 7 Parametri korelacije između eksperimentalnih i teorijskih dužina i uglova veza 6-hidroksidopamina (bazisni skup 6-311++G(d,p))

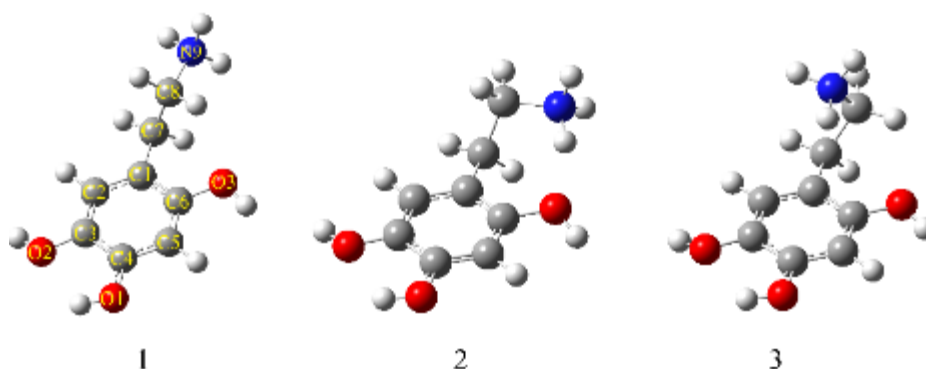
Funkcional	Dužine veza		Uglovi veza	
	R	MAE [Å]	R	MAE [°]
B3LYP	0,985	0,007	0,881	1,289
CAM-B3LYP	0,981	0,010	0,869	1,556
B3LYP-D3BJ	0,986	0,007	0,893	1,238
M05-2X	0,986	0,008	0,906	1,216
M06-2X	0,985	0,008	0,901	1,232

Na osnovu rezultata u tabeli 7 može se zaključiti da svi odabrani funkcionali dobro opisuju eksperimentalnu kristalografsku strukturu molekula. Na osnovu poređenja dužina veza zaključeno je da najveću vrednost R i najmanju MAE vrednost daje B3LYP-D3BJ funkcional, ali da su vrednosti ovih parametara za ostale funkcionalne u okviru $\pm 0,001$. Ukoliko se uporede vrednosti za uglove uočavaju se veće razlike između parametara. Najbolje vrednosti parametara pokazuju Minesota funkcionali, M05-2X i M06-2X, sa izraženijim razlikama među funkcionalima. Ukoliko se uporede svi strukturni parametri može se zaključiti da M06-2X funkcional najbolje opisuje kristalografsku strukturu 6-hidroksidopamina. Ovaj funkcional je iskorišćen za poređenje eksperimentalnih i teorijskih spektara. U literaturi je pokazano da se Minesota funkcionali mogu koristiti za dobro opisivanje eksperimentalnih spektara kateholamina [284,285].

Na osnovu strukture 6-hidroksidopamina (slika 4) očekuje se nekoliko mogućih konformera sa različitim intramolekulskim vodoničnim vezama. Strukture tri stabilna konformera su optimizovane kako bi se odredila termodinamički najpovoljnija struktura. Najstabilniji konformeri su prikazani na slici 21.

Optimizovani konformeri 6-hidroksidopamina opisuju različite intermolekulske interakcije koje postoje u strukturi. Prvi konformer odgovara kristalografskoj strukturi. Kod drugog konformera dolazi do formiranja vodonične veze između amino i hidroksilne grupe. Treći konformer odgovara strukturi dopamina za koju je uočeno da je najstabilnija usled interakcije π -elektronskog oblaka i $-NH_3^+$ grupe. Poređenjem Gibsovih slobodnih energija zaključeno je da je konformer 2 najstabilniji.

Drugi po stabilnosti je konformer koji odgovara najstabilnijoj strukturi dopamina [107,113,120], sa relativnom Gibsovom slobodnom energijom od 9,0 kJ/mol. Najmanje stabilna struktura odgovara kristalografskoj strukturi i ona ima vrednost Gibsove slobodne energije koja je za 28 kJ/mol veća od vrednosti za konformer 2. Razlike Gibsovih slobodnih energija su niske, tako da je pretpostavljeno postojanje većeg broja konformera u rastvoru usled interakcija sa okolnim molekulima i rastvaračem. Analiza rezultata perturbacione teorije drugog reda omogućava kvantitativno poređenje jačine interakcija. Najjače interakcije, kod sva tri konformera, su $\pi(\text{C}-\text{C}) \rightarrow \pi^*(\text{C}-\text{C})$ unutar prstena i $\text{LP}(\text{O}) \rightarrow \pi^*(\text{C}-\text{C})$ koje imaju energiju do 120 kJ/mol. Kod trećeg konformera 6-hidroksidopamina postoji dodatna stabilizacija strukture pomenutim katjon $\rightarrow \pi$ interakcijama sa aromatičnim prstenom, energije 7 kJ/mol. U strukturi najstabilnijeg konformera se formira vodonična veza u kojoj je vodonik u *o*-položaju akceptor protona. Ova interakcija sa energijom 88,8 kJ/mol značajno doprinosi njegovoj stabilnosti.

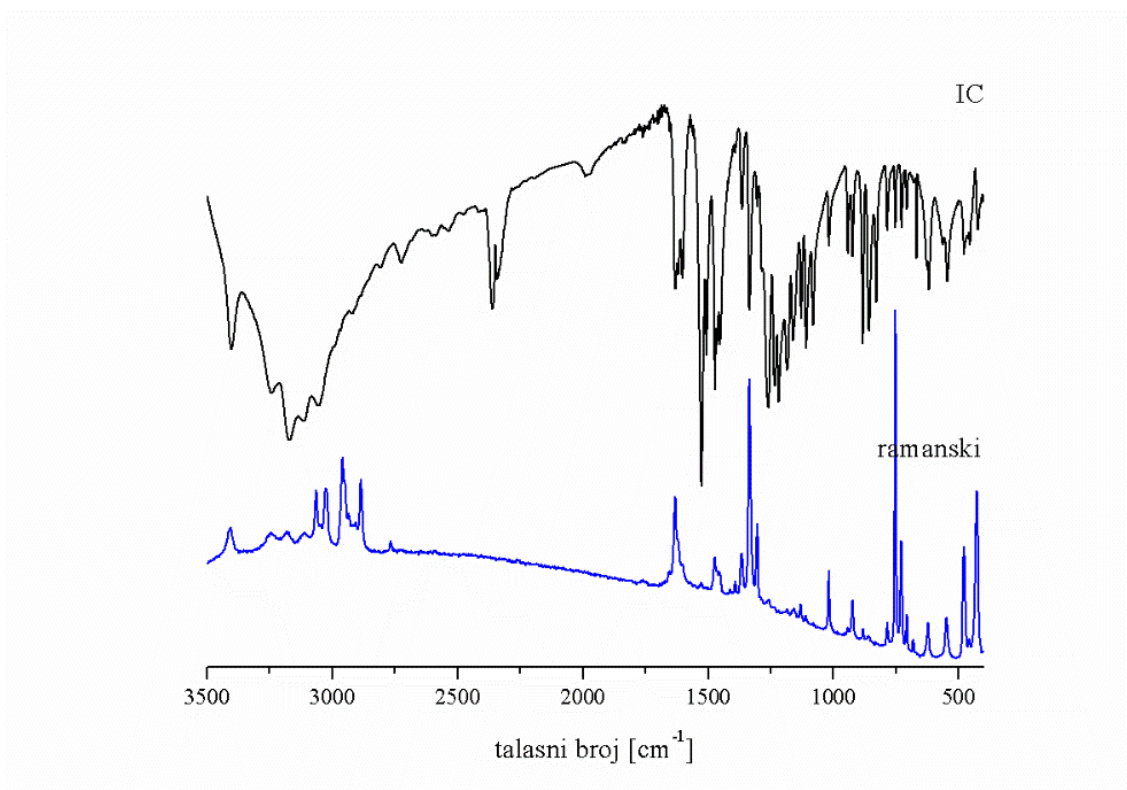


Slika 21 Tri najstabilnija konformera molekula 6-hidroksidopamina (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Analiza vibracionih spektara

Eksperimentalni vibracioni spektri 6-hidroksidopamina (slika 22) su upoređeni sa teorijskim. Kako je 6-hidroksidopamin molekul niskog stepena simetrije to je većina vibracija aktivna i u infracrvenom i ramanskom spektru. Najintenzivnija traka u IC spektru, u oblasti od 3500 do 3000 cm^{-1} , potiče od istežućih O–H vibracija. Širina trake je uslovljena intramolekulskim vodoničnim vezama između dve hidroksilne grupe kateholne jedinice ali i amino grupe i hidroksilne grupe u *o*-položaju. U teorijskom

spektru se trake vibracija tri hidroksilne grupe nalaze na 3700, 3680 i 3200 cm^{-1} . Traka istežuće vibracije amino grupe se nalazi na 3446 cm^{-1} i ona prekriva deo trake istežućih C-H vibracija. Ispod 3000 cm^{-1} se nalaze trake istežućih vibracija alifatičnih C-H grupa, dok se trake na 1640 i 1579 cm^{-1} asigniraju vibracijama prstena. Trake ispod 1500 cm^{-1} većinom pripadaju deformacionim vibracijama grupa i prstena. U ramanskom spektru se traka velikog intenziteta na 1330 cm^{-1} pripisuje simetričnoj deformacionoj vibraciji amino grupe, aromatičnog prstena i delom hidroksilnih grupa. Takođe intenzivna traka na 757 cm^{-1} se asignira simetričnom C–C obliku koji potiče od vibracija atoma u aromatičnom prstenu.



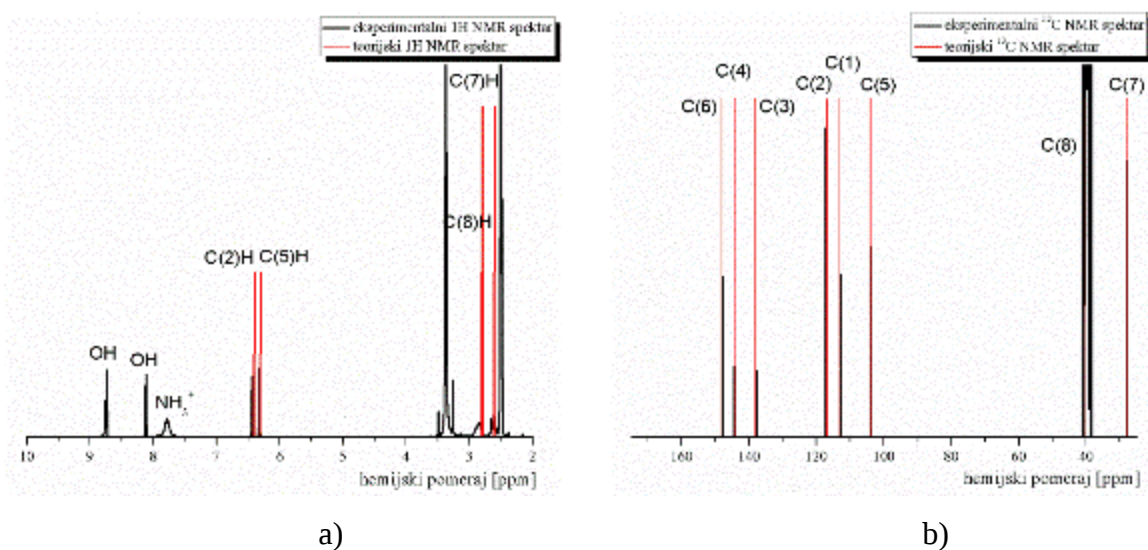
Slika 22 Vibracioni, IC i ramanski, spektri 6-hidroksidopamina

Teorijski talasni broj istežuće vibracije O–H grupe je najveći kod kiseonika u položaju 2 i iznosi 3920 cm^{-1} . Vibracija hidroksilne grupe sa atomom O3 ima vrednost talasnog broja od 3878 cm^{-1} . Na 3834 cm^{-1} se nalazi traka istežuće O1–H vibracije, što ukazuje na građenje vodonične veze sa susednom hidroksilnom grupom. Vrednost talasnog broja istežuće vibracije amino grupe je pomerena ka manjim vrednostima talasnih brojeva, na 3100 cm^{-1} , u odnosu na 3-MT i otkopamin zbog građenja jake

vodonične veze sa hidroksilnom grupom. Ostali vibracioni oblici kretanja imaju slične talasne brojeve kao i molekul 3-MT.

Analiza NMR spektara

Spektroskopska karakterizacija 6-hidroksidopamina je dopunjena eksperimentalnim NMR spektrom koji je snimljen korišćenjem DMSO-a kao rastvarača. Eksperimentalni spektri su upoređeni sa najstabilnijim konformerom. Hemijski pomeraji u ^{13}C i ^1H NMR spektrima su prikazani u tabeli 8. Eksperimentalni i teorijski spektri su predstavljeni na slici 23. Teorijske vrednosti hemijskih pomeraja, izračunate za konformer 1, su skalirane zbog vrednosti koje su bile veće od eksperimentalno dobijenih. Na osnovu koeficijenta korelacije za eksperimentalne i simulirane ^{13}C NMR spektre može se zaključiti da postoji dobro slaganje rezultata. Srednje vrednosti apsolutne greške, kao drugi parametar poređenja, pokazuju da podaci dobijeni za odabrani konformer dobro reprodukuju eksperimentalne podatke. Spektri su snimljeni za 6-hidroksidopamin hidrohlorid, tako da je ovakav rezultat očekivan.



Slika 23 Eksperimentalni i teorijski NMR spektri (struktura optimizovana na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije) 6-hidroksidopamina a) ^1H NMR i b) ^{13}C NMR

Prilikom poređenja eksperimentalnih i teorijskih ^1H NMR spektara iz posmatranja su isključeni protoni koji su pod uticajem inter- i intramolekulskih vodoničnih veza kao i ostalih specifičnih i nespecifičnih interakcija sa rastvaračem i okolnim molekulima.

Vrednosti koeficijenta korelacije za ^1H i ^{13}C NMR spektre su 0,999 i 0,998 respektivno. Srednja vrednost apsolutne greške je 0,1 i 1,9 ppm što potvrđuje da su rezonantni maksimumi dobro asignirani protonima i atomima ugljenika, ali i da struktura dobro reprodukuje strukturu prisutnu u rastvaraču.

Tabela 8 Eksperimentalni i teorijski hemijski pomeraji molekula 6-hidroksidopamina (struktura optimizovana na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije) u NMR spektrima

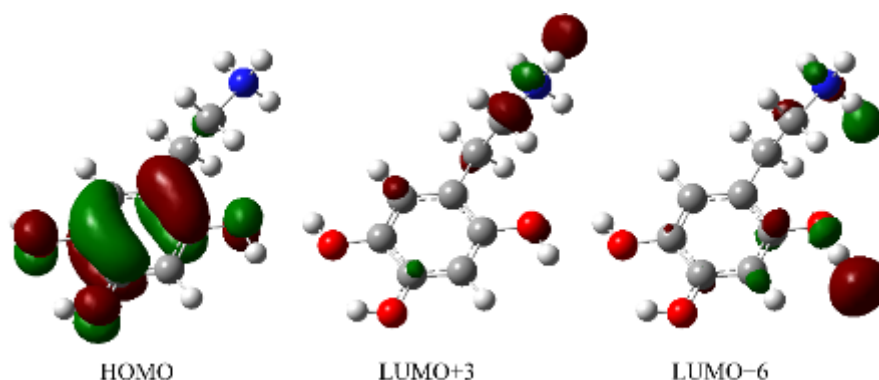
$\delta(^1\text{H})$ [ppm]			$\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]		
	Teorijski	Eksperimentalni		Teorijski	Eksperimentalni
C7-H	2,6	2,6	C7	28	28
C7-H	2,6	2,6	C8	40	45
C8-H	2,8	3,0	C5	104	104
C8-H	2,8	3,0	C1	113	116
C5-H	6,3	6,3	C2	117	118
C2-H	6,4	6,4	C3	138	136
R	0,999		C4	144	143
MAE	0,1		C6	148	146
			R	0,998	
			MAE	1,9	

Analiza elektronskih spektara

Elektronski spektar 6-hidroksidopamina je snimljen u oblasti od 700 do 200 nm i prikazan je na slici S1. Kao i kod molekula sličnih struktura, oktopamina i 3-MT, uočene su dve široke trake na 280 i 200 nm. Poređenjem eksperimentalnih vrednosti zaključeno je da sa talasne dužine prelaza ne zavise značajno od broja hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu ili alifatičnom nizu. Teorijska analiza elektronskog spektra je urađena za izduženi konformer. Razlika između teorijske i eksperimentalne vrednosti talasne dužine maksimuma je 25 nm, što je manje nego kod oktopamina i 3-MT. Prelaz na oko 200 nm se može pripisati HOMO→LUMO+6 prelazu.

Tabela 9 Eksperimentalne i teorijske (struktura optimizovana na M06-2X/6-311G(d,p) nivou teorije) talasne dužine elektronskih prelaza u molekulu 6-hidroksidopamina

Talasna dužina [nm]		Parametri prelaza	
Eksperimentalna	Teorijska	Tip prelaza	Oscilatorna jačina
280	241	HOMO→LUMO+3 (65%)	0,1370
	195	HOMO→LUMO+6 (36%)	0,2444
200	194	HOMO→LUMO+6 (42%)	0,2117



Slika 24 Molekulske orbitale uključene u elektronske prelaze 6-hidroksidopamina (struktura optimizovana na M06-2X/6-311G(d,p) nivou teorije, izovrednost 0,04)

Orbitale uključene u prelaze su prikazane na slici 24. Vrednosti oscilatorne jačine za ostale prelaze su niže nego kod oktopamina zbog razlika u rasporedu elektronske gustine. Orbitala HOMO je lokalizovana na aromatičnom prstenu i kiseonikovim atomima hidroksilnih grupa. Druga prikazana orbitala je lokalizovana na alifatičnom nizu i amino grupi, dok je kod treće najveća elektronska gustina na aromatičnom prstenu i jednoj hidroksilnoj grupi u *m*-položaju. Zbog specifičnog rasporeda i manjeg preklapanja orbitala nisu očekivane velike vrednosti oscilatorne jačine prelaza.

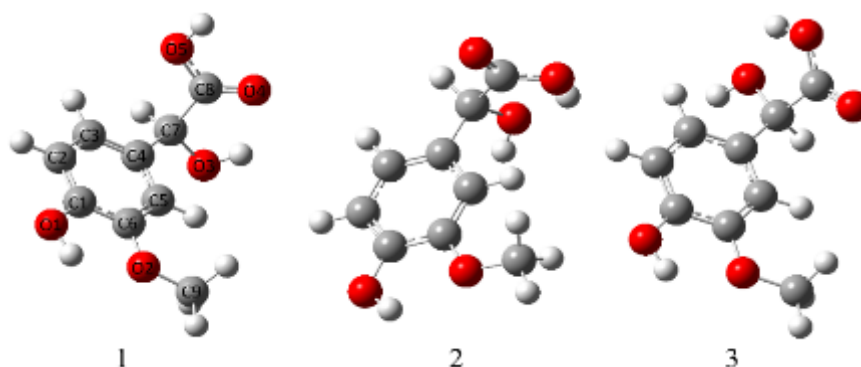
7.1.4. Vanililbademova kiselina

Struktura VMA je optimizovana na osnovu kristalografske strukture preuzete iz kristalografske baze podataka [286]. Najčešće korišćeni funkcionali u literaturi (B3LYP, CAM-B3LYP, B3LYP-D3BJ, M06-2X i M05-2X) su ispitani kako bi se odredila optimalna metoda za opisivanje strukture i reaktivnosti ovog metabolita. U svim proračunima je korišćen isti bazisni skup, 6-311++G(d,p). Eksperimentalne i teorijske vrednosti dužina i uglova veza su date u tabeli S5, dok su vrednosti R i MAE parametra prikazane u tabeli 10.

Dva parametra, R i MAE, su izračunata kako bi se osiguralo dobro poređenje rezultata. Najveća vrednost R od 0,991, i za dužine i za uglove veza, je dobijena za M05-2X funkcional tako da je ovaj funkcional korišćen u daljoj diskusiji dobijenih rezultata. Ostali funkcionali takođe, sa manjim varijacijama, dobro opisuju eksperimentalne dužine veza i uglove. Tri najstabilnija konformera VMA su prikazana na slici 25.

Tabela 10 Parametri korelacije između eksperimentalnih i teorijskih dužina i uglova veza VMA (bazisni skup 6-311++G(d,p))

Funkcional	Dužine veza		Uglovi veza	
	R	MAE [Å]	R	MAE [°]
B3LYP	0,991	0,010	0,987	0,754
CAM-B3LYP	0,991	0,008	0,987	0,774
B3LYP-D3BJ	0,991	0,009	0,991	0,667
M06-2X	0,988	0,009	0,991	0,647
M05-2X	0,991	0,008	0,991	0,627



Slika 25 Najstabilniji konformeri molekula VMA u vakuumu (strukture optimizovane na M05-2X/6-311G(d,p) nivou teorije)

Kao što se može videti na slici 25 najstabilnije strukture VMA karakterišu vodonične veze različitih tipova: interakcija između hidroksilne i metoksilne grupe koje su vezane za aromatični prsten i različiti relativni položaji hidroksilne i karboksilne grupe na alifatičnom lancu. Upoređene su vrednosti Gibsovih slobodnih energija za sve konformere kako bi se odredio najstabilniji. Nađeno je da je konformer 1 stabilniji za 9,8 i 11 kJ/mol od konformera 2 i 3, respektivno. Njegova geometrija je u saglasnosti sa eksperimentalnim podacima za dužine veza i uglove. Na osnovu rezultata perturbacione teorije drugog reda analizirane su stabilizacione interakcije za različite konformere. Kao i kod prethodnih struktura najznačajnije interakcije su hiperkonjugacija i rezonancija, koje se ostvaruju između orbitala $\pi(\text{C}-\text{C})$ i $\pi^*(\text{C}-\text{C})$. Ove interakcije postoje kod svih ispitivanih konformera i imaju energiju između 100 i 127 kJ/mol. Ovo je očekivano zbog toga što ovaj deo molekula nije pod uticajem rotacije alifatičnog niza. Najjača interakcija, sa energijom oko 200 kJ/mol, koja je uočena u strukturama je preklapanje između slobodnog elektronskog para na kiseoniku i $\pi(\text{C}-\text{O})$ orbitale karboksilne grupe, ali takođe

i preklapanja sa $\pi(\text{C}-\text{C})$ orbitalom, energije 80 kJ/mol. Dobijeni rezultat je posledica velike delokalizacije unutar karboksilne grupe, koja je delom pod uticajem prisustva dodatne hidroksilne grupe na alifatičnom lancu, usled čega postoje razlike u ovim energijama za različite konformere.

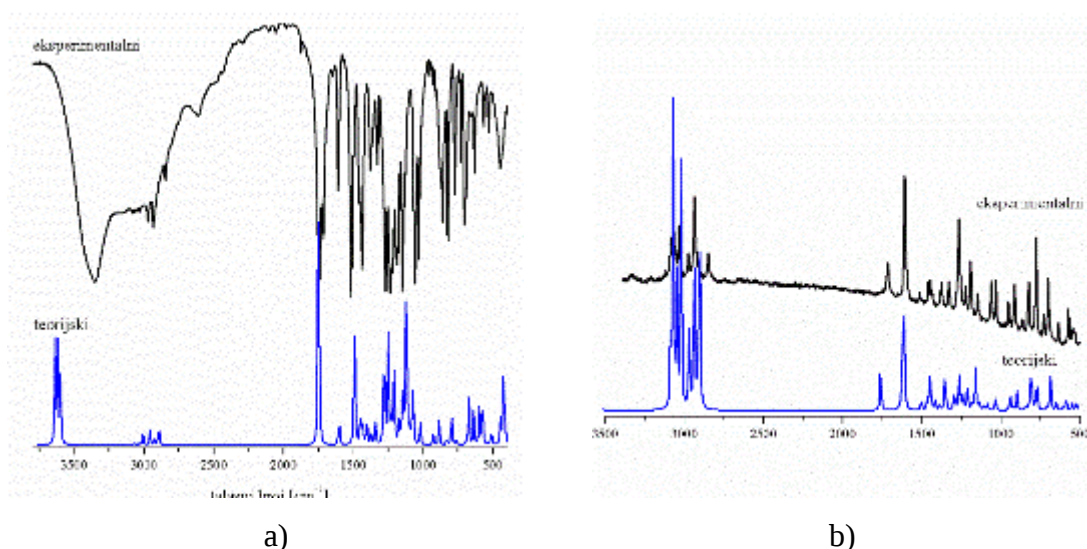
Kiseonikovi atomi direktno vezani za aromatični prsten dodatno stabilizuju strukturu VMA interakcijama koje imaju energiju 140 kJ/mol. U svim konformerima postoji i vodonična veza jačine 7,44 kJ/mol. Ono što razlikuje konformere je jačina vodonične veze između hidroksilne i karboksilne grupe na alifatičnom nizu. U datim strukturama nema značajnih razlika u vezama $\text{O1}-\text{H}\cdots\text{O2}$, uključujući i stabilizacione energije koje iznose 7-8 kJ/mol. Najjača vodonična veza se formira kod strukture 1, kod koje je energija interakcije između kiseonika u položaju 3 i hidroksilne grupe 11,53 kJ/mol. Kada se relativni položaj grupa promeni i formira vodonična veza, između slobodnog para na kiseoniku hidroksilne i OH grupe karboksilne grupe, onda jačina interakcije iznosi između 7,4 i 10 kJ/mol, zavisno od položaja. Ovo dokazuje da je jačina vodonične veze važan parametar koji određuje položaj alifatičnog niza. NBO naelektrisanja na atomima O3, O4 i O5 su -0,773, -0,634 i -0,690 a.u. Ove vrednosti pokazuju da je najjača vodonična veza ostvarena ukoliko je atom O3 donor protona vodonika, odnosno atom vodonika ima najveću vrednost pozitivnog naelektrisanja. Ukoliko se veza ostvaruje tako da je donor protona kiseonik u položaju O4 ili O5 ove interakcije su slabije. Vrednost energije interakcije je dobro korelisana sa naelektrisanjem kiseonikovog atoma koji je donor protona.

Analiza vibracionih spektara

Teorijski vibracioni spektri su dobijeni za najstabilniji konformer VMA u vakuumu, koji se i poklapa sa kristalografskom strukturom iz literature [286]. Ukupan broj normalnih oblika je 66 i zbog malog stepena simetrije većina je aktivna i u IC i u ramanskom spektru. Eksperimentalni rezultati su upoređeni sa teorijskim za najintenzivnije maksimume. Očekivana je velika razlika u talasnim brojevima između vrednosti O-H istežućih vibracija zbog jakog uticaja formiranja vodoničnih veza u kristalu, u odnosu na strukture optimizovane u vakuumu. Faktor skaliranja, dobijen metodom najmanjih kvadrata, je određen za oba tipa spektra i iznosi 0,948. U tabeli S6 su dati podaci skaliranih vrednosti talasnih brojeva sa odgovarajućim rezultatima PED

analize. Parametri R i MAE za ramanske spektre iznose 0,9997 i 15 cm^{-1} , dok za IC 0,9995 i 27 cm^{-1} , što dokazuje da se odabrani nivo teorije, M06-2X/6-311++G(d,p), može koristiti za predviđanje teorijskih vrednosti talasnih brojeva vibracija ovakvog tipa molekula. Uporedni prikaz teorijskih i eksperimentalnih vibracionih spektara je dat na slici 26, a u nastavku su prodiskutovane intenzivnije trake i asignirane određenom obliku vibracionog kretanja.

Najintenzivnije trake su u oblasti između 4000 i 300 cm^{-1} (slika 26). Vrednosti talasnih brojeva su pripisane čisto istežućim O–H i C–H vibracionim oblicima. Prvi tip, zbog prisustva većeg broja hidroksilnih grupa, se nalazi na 3650 (100% ν_{OH}) i 3090 cm^{-1} (100% ν_{OH}). Širenje linija u eksperimentalnom spektru ukazuje na stvaranje vodoničnih veza. Traka na 3100 cm^{-1} je asignirana aromatičnim C–H vibracijama dok su trake ispod 3000 cm^{-1} asignirane C–H vibracijama alifatičnog niza. Formiranje vodoničnih veza i širenje traka su takođe pokazane prilikom optimizacije strukture i u NBO analizi eksperimentalnih i teorijskih talasnih brojeva (tabela S6 u delu Dodatak).



Slika 26 Uporedni prikaz eksperimentalnih i teorijskih (optimizovani na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije) spektara VMA: a) infracrveni i b) ramanski

Deo spektra između 2900 i 1900 cm^{-1} ne sadrži trake. U oblasti srednjih frekvencija (od 1900 do 1000 cm^{-1}) najintenzivnija traka na 1760 cm^{-1} , koja se javlja kao dublet usled formiranja vodoničnih veza, je asignirana istežućem C=O obliku. Značajan deo vibracija u ovom delu spektra sadrži udeo istežućih C–C i C–O vibracija. Intenzivne trake se nalaze na 1760 (IC), 1596 (R), 1500 (IC), 1440 (IC), 1268 (IC), 1265 (R) i 1235

(IR) cm^{-1} i pripisane su C–H, C–C i C–O istežućim, kao i H–C–C, H–C–O, C–C–C savijajućim vibracijama. Trake srednjeg intenziteta, assignirane savijajućim vibracijama različitih delova molekula, se nalaze na: 1730 (R), 1607 (IC), 1131 (IC), 1192 (R) i 1028 (IC) cm^{-1} . Zbog rigidnosti strukture, između vibracija koje uključuju atome aromatičnog i alifatičnog dela molekula VMA, postoji razlika u položajima traka od nekoliko cm^{-1} . Trake slabog intenziteta, koje se mogu razlikovati od šuma i koje potiču od već pomenutih tipova vibracija, se nalaze na 1462 (IC), 1444 (R), 1377 (IC), 1376 (R) i 1131 (IR) cm^{-1} .

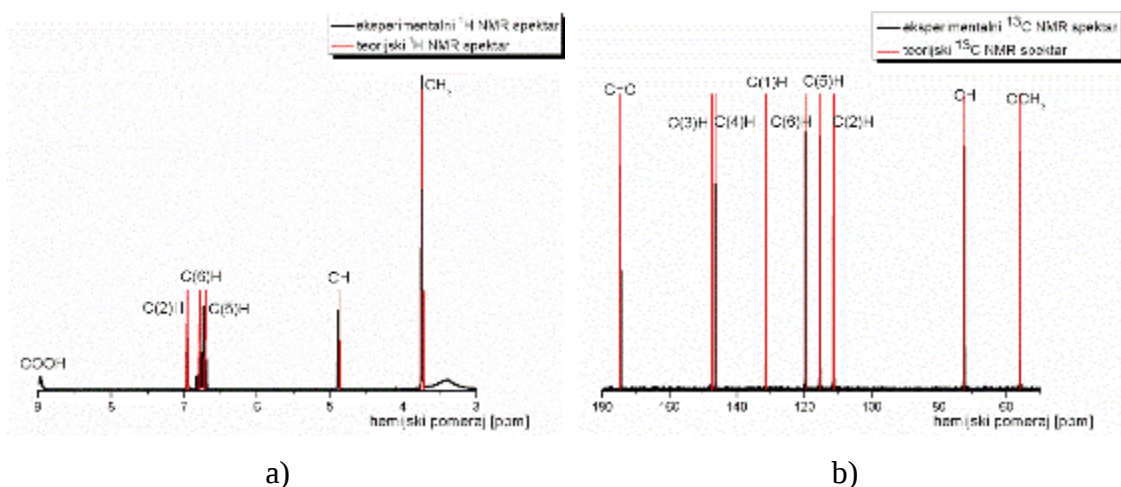
Mali broj vibracionih maksimuma može biti očitán ispod 1000 cm^{-1} . Trake u datoj oblasti su assignirane torzionim (H–C–C–C, H–O–C–C, i H–O–C–O), savijajućim (H–C–C, C–C–C, i H–O–C) i istežućim vibracijama (C–O and C–C) različitih delova molekula. Najintenzivnije trake u IC spektru su na 862, 821 i 696 cm^{-1} , dok su u ramanskom spektru te trake na 778 i 701 cm^{-1} . U spektru postoje i trake srednjeg do slabog intenziteta u spektru na talasnim brojevima 771 (IC), 654 (IC), 574 (R), 547 (R), 532 (R), 462 (R), 454 (IC), 447 (IC), 400 (R) i 368 (IC) cm^{-1} . PED vrednosti za ove vibracione oblike nemaju u potpunosti izračunat sastav zbog toga što predstavljaju mešavinu velikog broja različitih oblika vibracija.

Analiza NMR spektara

Kako bi se predvideo NMR spektar VMA molekula njegova struktura je optimizovana u DMSO, korišćenjem SMD metode rastvarača. Usled rigidnosti prstena nije bilo značajnih promena u strukturnim parametrima nakon optimizacije strukture u rastvaraču. Za predviđanje spektara korišćen je GIAO metod [157,281,284]. Hemijski pomeraji su izračunati relativno u odnosu na TMS. Dobijene vrednosti hemijskih pomeraja su bile više od eksperimentalnih tako da su metodom najmanjih kvadrata određeni korekcionni faktori. Ovaj faktor za ^1H NMR spektar iznosi 0,9, dok za ^{13}C NMR spektar iznosi 0,85. Pretpostavljeno je da su vrednosti ovih faktora uslovljeni ograničenom fleksibilnošću alifatičnog lanca i formiranjem jakih interakcija zbog prisustva polarnih grupa. Zbog toga su samo H atomi vezani za nepolarne grupe bili uključeni u poređenje. Vrednosti eksperimentalnih i teorijskih hemijskih pomeraja su date u tabeli 11.

Slaganje eksperimentalnih i teorijskih vrednosti hemijskih pomeraja je veoma dobro. Korelacioni koeficijenti su 0,999 i 0,996 za ^1H i ^{13}C NMR spektre (slika 27 i tabela

11). Za ovaj tip jedinjenja bolje slaganje je očekivano za ^{13}C spektar [281]. Prosečna razlika između eksperimentalnih i teorijskih vrednosti za ugljenikove atome je 2-3 ppm, sa naznakom da su položaji C atoma u aromatičnom prstenu veoma dobro reprodukovani. Hemijski pomeraji vodonikovih atoma su mnogo više podložni uticaju okoline i polarnosti rastvarača, kao i specifičnih i nespecifičnih interakcija sa molekulima rastvarača i nečistoća. MAE vrednost za ^1H NMR spektar je 0,18 ppm. Dobro slaganje eksperimentalnih i teorijskih vrednosti hemijskih pomeraja je, zbog rigidnosti velikog dela molekula VMA, očekivano.



Slika 27 Eksperimentalni i teorijski NMR spektri (struktura optimizovana na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije) VMA: a) ^1H NMR i b) ^{13}C NMR

Tabela 11 Eksperimentalni i teorijski hemijski pomeraji (struktura optimizovana na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije) u NMR spektrima

$\delta(^1\text{H})$ [ppm]			$\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]		
	Teorijski	Eksperimentalni		Teorijski	Eksperimentalni
C9-H	3,6	3,7	C9	52	56
C9-H	3,6	3,7	C7	69	72
C9-H	3,6	3,7	C5	110	111
C7-H	4,7	4,9	C2	117	115
C5-H	6,8	6,7	C4	124	120
C2-H	6,9	6,8	C5	135	131
C3-H	7,0	7,0	C6	146	146
R		0,999	C9	146	147
AAE		0,1	C10	172	174
			R		0,997
			AAE		2

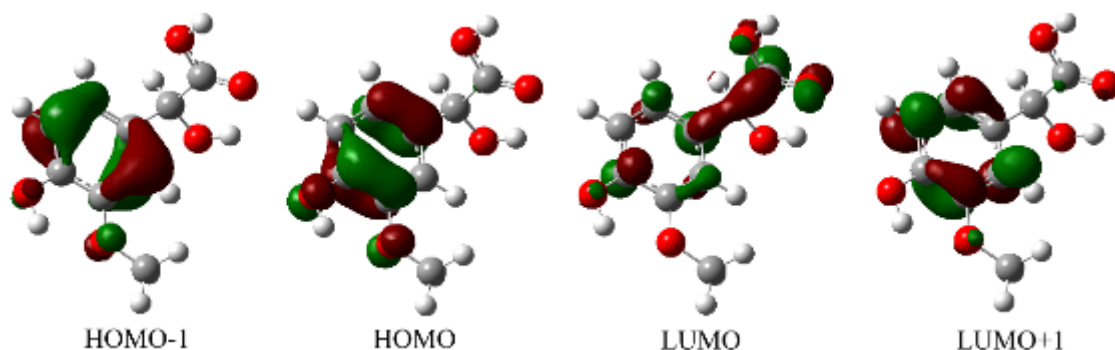
Analiza elektronskih spektara

Eksperimentalni elektronski spektar VMA je snimljen u oblasti od 800 do 190 nm (slika S1). U spektru postoje tri maksimuma, na 199, 230 i 280 nm, pri čemu je najintenzivniji maksimum je na 199 nm. TD-DFT pristup je primenjen kako bi se simulirali elektronski spektri VMA. Struktura najstabilnijeg konformera je optimizovana u vodi korišćenjem SMD modela. Dobijene su sledeće talasne dužine elektronskih prelaza: 194/188, 225 i 238 nm (tabela 12).

Kao što se može videti u tabeli 12 relativni intenziteti traka, koji rastu sa smanjenjem talasne dužine prelaza, su dobro reprodukovani. Na nižim talasnim dužinama postoji dobro slaganje, do nekoliko nm, sa eksperimentalnim podacima. Prelaz koji je opisan kao HOMO→LUMO pokazuje razliku od 40 nm. Ova razlika je najverovatnije posledica specifičnih interakcija sa rastvaračem koje nisu uključene u SMD model. Kako bi se ispitao mogući razlog za ovu veliku razliku orbitale uključene u prelaze (HOMO-1, HOMO, LUMO, LUMO+1) su pažljivo analizirane i prikazane su na slici 28.

Tabela 12 Eksperimentalne i teorijske (struktura optimizovana na M06-2X/6-311G(d,p) nivou teorije) talasne dužine elektronskih prelaza

Talasna dužina [nm]		Parametri prelaza	
Eksperimentalna	Teorijska	Tip prelaza	Oscilatorna jačina
280	238	HOMO→LUMO (52%)	0,0838
230	225	HOMO→LUMO+1 (54%)	0,1414
	194	HOMO-1→LUMO (69%)	0,4235
199	188	HOMO-1→LUMO+1 (64%)	0,4962



Slika 28 Molekulske orbitale uključene u elektronske prelaze VMA (struktura optimizovana na M062-2X/6-311G(d,p) nivou teorije, izovrednost 0,07)

Na slici 28 se može videti da je elektronska gustina različito raspoređena za različite orbitale. Orbitale HOMO-1, HOMO i LUMO+1 su lokalizovane na aromatičnom delu molekula dok je LUMO orbitala na alifatičnom nizu, posebno karboksilnoj grupi, i aromatičnom prstenu. Velika oscilatorna jačina drugog i četvrtog prelaza se može objasniti blizinom i sličnošću orbitala uključenih u prelaze. Jedan od razloga većih razlika između eksperimentalnih i teorijskih vrednosti talasnih dužina apsorpcionih maksimuma se može objasniti raspodelom elektronske gustine. Aromatični deo molekula nije pod velikim uticajem molekula rastvarača zbog toga što su interakcije između njih slabe. Sa druge strane, interakcije između karboksilne grupe i molekula rastvarača su jače što dodatno stabilizuje strukturu.

7.2. Eksperimentalno i teorijsko određivanje antiradikalske aktivnosti neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita prema odabranim radikalima

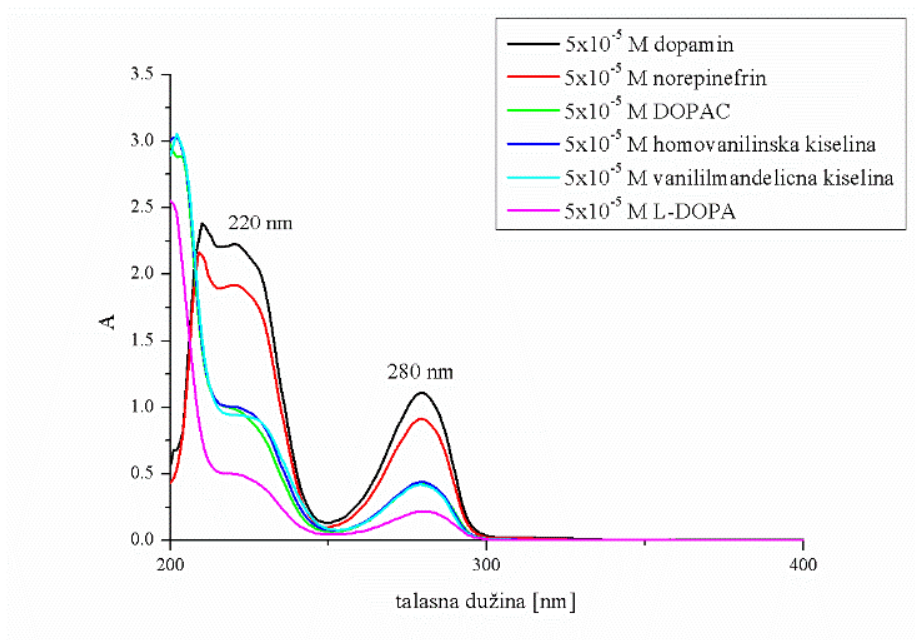
Antioksidaciona aktivnost neurotransmitera, njihovih metabolita i prekursora je eksperimentalno ispitana prema DPPH i askorbil-radikalima, ABTS radikal-katjonu i superoksid radikal-anjonu. Broj ispitivanih molekula je različit za različite radikale, ali su molekuli birani tako da budu uključeni neurotransmiteri, neki od njihovih metabolita i prekursora sa funkcionalnim grupama generalno od značaja za antiradikalisku aktivnost molekula. Termodinamički parametri reakcija, dobijeni na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou, omogućili su predviđanje najpovoljnijeg mehanizma. Za DPPH i ABTS radikale su izračunate i konstante brzina po SPLET mehanizmu, a prema Markusovoj teoriji, kako bi se dodatno potvrdio odabir najpovoljnijeg mehanizma. Reakcije prema hlorovanim metilperoksi-radikalima su samo teorijski ispitane kako bi se odredio uticaj broja hlorovih atoma na mehanizme reakcija. Na kraju svakog od poglavlja su prodiskutovani osnovni parametri reaktivnosti odabranih molekula.

7.2.1. DPPH[•]

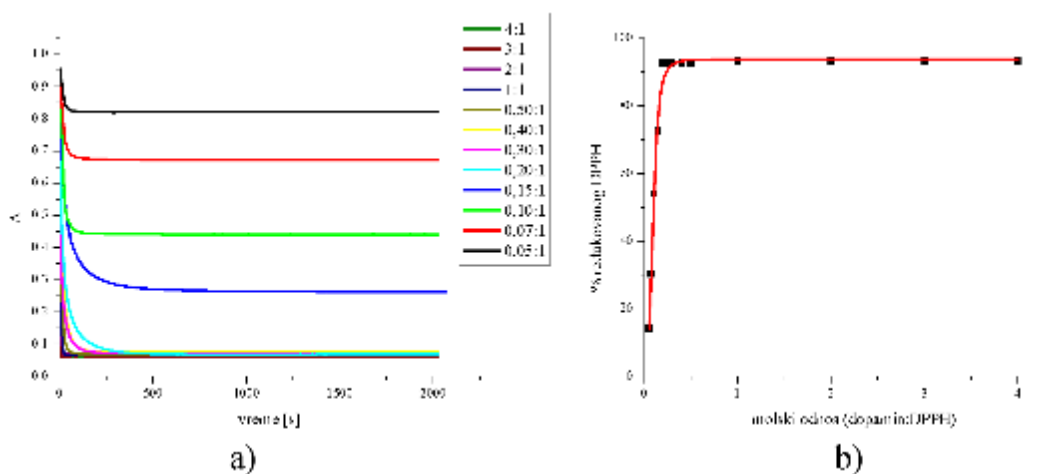
Reaktivnost prema DPPH radikalima je ispitana za niz molekula: katehol, HVA, 3-MT, dopamin, DOPAC, epinefrin, norepinefrin, L-DOPA, VMA, tiramin, tirozin, fenilalanin, feniletilamin, oktopamin i 6-hidroksidopamin. Za molekule koji su spektrofotometrijskom testu pokazali najveću aktivnost snimljeni su EPR spektri i određena njihova aktivnost prema istom radikalima. Primena spektrofotometrijskog DPPH testa je bila moguća zahvaljujući činjenici da ispitivani molekuli ne apsorbuju u oblasti u kojoj apsorbuje sam radikal. U nastavku, na slici 29, su prikazani apsorpcioni spektri odabranih neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita u oblasti.

U elektronskim spektrima ispitivanih molekula, u oblasti ispod 300 nm, uočavaju se dve široke trake, čiji položaji ne zavise od strukture molekula. Trake na oko 280 nm potiču od prelaza koji uključuju alifatični niz i aromatični prsten molekula. Iako dopamin i norepinefrin imaju krajnju amino grupu na alifatičnom nizu a ostali molekuli karboksilnu grupu efekat krajnjih grupa u spektru nije evidentan. Traka koja se javlja ispod 230 nm pripisuje se, zbog velikog intenziteta, $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u molekulima.

Približno ista energija ovog prelaza kod niza molekula ukazuje na sličnost orbitala između kojih se prelaz vrši.



Slika 29 Elektronski spektri odabranih supstanci korišćenih u eksperimentima.

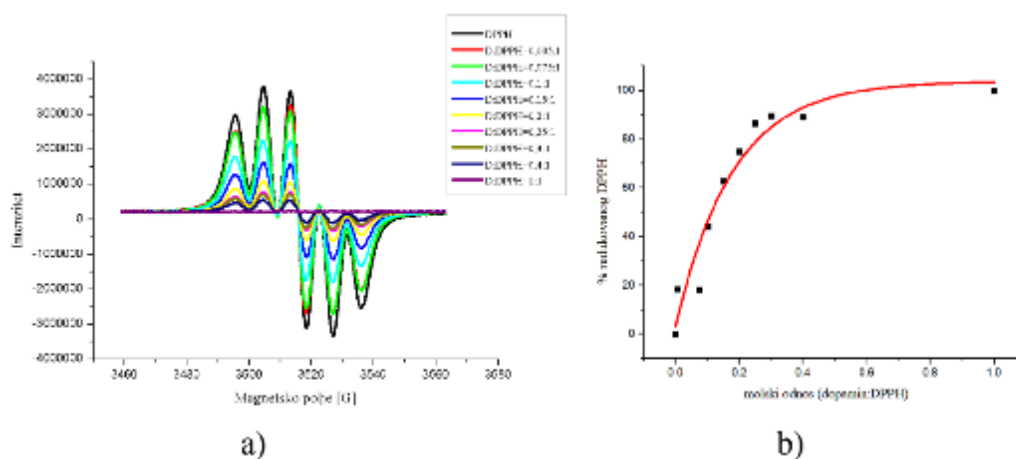


Slika 30 Kinetičke krive za reakciju DPPH• i dopamina a) opadanje apsorbancije rastvora za različite molske odnose dopamin/ DPPH• i b) zavisnost procenta redukovano DPPH• od molskog odnosa dopamin/ DPPH•

Na slici 30 predstavljene su zavisnosti apsorbancije rastvora dopamina i DPPH radikala u funkciji vremena pri različitim molskim odnosima komponenata i zavisnost procenta redukovano radikala od molskog odnosa komponenata. Isti trend zavisnosti

pokazala su i ostala jedinjenja koja su ispitana na potpuno isti način. Parametri neophodni za crtanje datih grafika dobijeni su obradom elektronskih (i EPR) spektara ispitivanih molekula i DPPH radikala. Prvi, početni deo krive na slici 30, opisuje tzv. brzi stepen reakcije u kojoj dolazi do prenosa najlabilnijeg protona sa antioksidansa na DPPH radikal. Drugi stepen odgovara sporij promeni apsorpcije rastvora sa povećanjem molskog udela komponenata i predstavlja zaostalu aktivnost proizvoda degradacije. Za svaku od supstanci je sa grafika određen molski odnos pri kome se redukuje 50% prisutne količine radikala i prikazan kao EC_{50} vrednost.

Antiradikalska aktivnost ispitivanih molekula prema DPPH radikalu određena je i primenom EPR spektroskopije. Na slici 31 prikazani su EPR spektri DPPH radikala pre i posle dodavanja dopamina u različitim molskim odnosima. Na slici 31 b) je prikazana zavisnost procenta redukovanog DPPH radikala dopaminom dobijena iz EPR spektara. EPR spektri komponenata su snimani jedan sat posle pravljjenja rastvora kako bi došlo do potpunog odigravanje reakcije. Antiradikalska aktivnost je određivana na osnovu smanjenja površine ispod apsorpcionog maksimuma u EPR spektrima sistema DPPH-antioksidansi u odnosu na površinu maksimuma koji odgovara čistom DPPH radikalu..



Slika 31 EPR spektroskopsko određivanje antiradikalske aktivnosti dopamina prema DPPH radikalu a) zavisnost intenziteta signala rastvora DPPH^{*} nakon dodatka dopamina u različitim molskim odnosima i b) zavisnost procenta redukcije od molskog odnosa

U tabeli 13 su prikazani kvantitativni parametri redukcije, vrednost EC_{50} faktora i stehiometrijski faktor (SF) svakog od jedinjenja dobijeni analizom elektronskih i EPR

spektara. Rezultati prikazani u tabeli 13 pokazuju da sve ispitivane supstance imaju aktivnost prema DPPH radikalu koja zavisi od strukturnih parametara molekula. Rezultati DPPH* testa su prodiskutovani tako što su supstance podeljene u grupe prema aktivnosti. Prvu grupu čine molekuli koji imaju faktor EC_{50} manji od 8×10^{-6} M, drugu grupu čine molekuli sa faktorom EC_{50} od 10×10^{-6} do 14×10^{-6} M, treću sa faktorom preko 20×10^{-6} M, i četvrtu sa faktorom preko 100×10^{-6} M. Na osnovu vrednosti faktora SF svi molekuli koji imaju vrednost $SF > 2$ se smatraju dobrim antioksidansima [190]. Kako vrednost ovog parametra može biti i dvosmislena, iz razloga što zavisi od vremena snimanja i koncentracije antioksidansa, njegova vrednost je izračunata je tako što su eksperimenti izvođeni uvek sa istom koncentracijom radikala i vremenom snimanja. Na osnovu preliminarne analize molekuli kao što su L-DOPA, DOPAC, katehol, dopamin, epinefrin i norepinefrin se mogu smatrati dobrim antioksidansima.

Tabela 13 Eksperimentalni parametri redukcije DPPH radikala

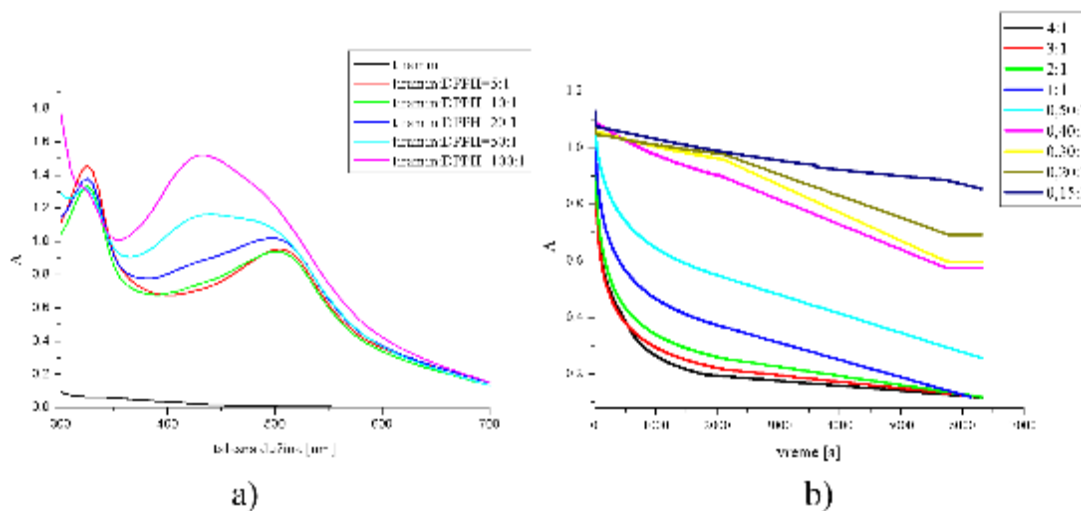
Molekul	ULj-VID		EPR	
	$EC_{50} \times 10^{-6}$ [M]	SF	$EC_{50} \times 10^{-6}$ [M]	SF
L-DOPA	$5,67 \pm 0,01^a$ 6,9	7,24	5,4	9,26
DOPAC	7,1 7,8	6,41	4,6	10,87
Dopamin	$10,50 \pm 0,51^a$ 10,5	4,76	11,0	4,54
6-hidroksidopamin	10,70	4,68	/	/
Norepinefrin	$10,87 \pm 0,12^a$ 10,6	4,72	12,1	4,13
Epinefrin	$11,27 \pm 0,01^a$ 10,50	4,76	15,6	3,21
Katehol	$13,92 \pm 0,05^a$ 11,9	4,20	9,8	5,10
Tirozin	24,50	2,04	/	/
HVA	26,6	1,88	40,6	1,23
VMA	33	1,51	/	/
3-MT	$63,16 \pm 0,91^a$ 36,1	1,38	32,9	1,51
Oktopamin	300	0,17	/	/
Tiramin	nije određeno	/	/	/
Fenilalanin	∞	/	/	/
Feniletilamin	∞	/	/	/

^a preuzeto iz reference [179]

Najbolju aktivnost su pokazali L-DOPA i DOPAC. Analizom strukture (slika 4) uočava se da ovi molekuli u strukturi sadrže kateholnu jedinicu i karboksilnu grupu. L-DOPA ima i primarnu amino grupu na alifatičnom nizu, koja može povećati aktivnost, kao što je objašnjeno kod molekula epinefrina/norepinefrina. Aktivnost molekula L-DOPA i DOPAC je uporediva sa vrednostima dobijenim za standardne antioksidanse kao što su kvercetin i galna kiselina [179]. Ukoliko se karboksilna grupa zameni amino grupom dobija se klasa neurotransmitera u koju spadaju dopamin, epinefrin i norepinefrin koji imaju sličnu aktivnost prema ispitivanom radikalu. Amino grupa je slab donor protona i ona se ne smatra aktivnim mestom. U strukturi norepinefrina je takođe prisutna primarna amino grupa što može biti razlog nešto veće aktivnosti prema DPPH radikalu u odnosu na epinefrin koji ima sekundarnu amino grupu. Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatima Šimicua (*Shimizu*) i saradnika [287]. Takođe treba napomenuti da dodatna hidroksilna grupa na alifatičnom nizu epinefrina i norepinefrina ne menja značajno aktivnost molekula u odnosu na dopamin. Molekul katehola koji nema dodatnih grupa ima EC₅₀ vrednost koja je vrlo bliska vrednostima za pomenute neurotransmitere što dodatno dokazuje važnost kateholne jedinice u strukturi molekula. U narednom odeljku će ovaj strukturni parametar biti prodiskutovan sa teorijskog stanovišta. Pomenuti molekuli imaju aktivnost koja je slična aktivnosti standarda kao što su troloks, askorbinska kiselina i (+)- α -tokoferol, mereni pri istim eksperimentalnim uslovima [179].

Ukoliko se u strukturi dopamina i DOPAC-a jedna hidroksilna grupa zameni metoksilnom grupom, i time smanji broj mogućih jakih vodoničnih veza, nastaju molekuli 3-MT i HVA respektivno. Aktivnost datih molekula prema DPPH radikalu se smanjuje tri puta u odnosu na polazne molekule. Dodatak nove hidroksilne grupe na strukturu HVA dovodi do nastanka VMA. Ova strukturna promena ne utiče značajno na aktivnost molekula i dodatno dokazuje da hidroksilne grupe na alifatičnom nizu nisu važan strukturni parametar u antiradikalnoj aktivnosti neurotransmitera i njihovih derivata. Pretpostavlja se da je razlog male aktivnosti grupa na alifatičnom nizu smanjenje delokalizacije u sistemu koja postoji ukoliko je hidroksilna grupa u *p*- i *m*-položaju u odnosu na alifatični niz. Dodatak hidroksilne grupe na strukturu dopamina, u *o*-položaju u odnosu na alifatični niz, takođe ne doprinosi povećanju aktivnosti što je pokazano ispitivanjem 6-hidroksidopamina.

Uticaj kateholne jedinice je dodatno ispitan u nizu struktura dopamin/tiramin/feniletilamin, L-DOPA/tirozin/fenilalanin i norepinefrin/oktopamin. Strukture sa jednom hidroksilnom grupom na aromatičnom prstenu imaju aktivnost koja je višestruko manja od aktivnosti molekula sa kateholnom jedinicom. Tirozin ima vrednost EC_{50} parametra od $24,50 \times 10^{-6}$ M, dok je za oktopamin 300×10^{-6} M, što ponovo ukazuje na karboksilnu grupu kao važan parametar aktivnosti. Aktivnost karboksilne grupe može se smatrati posledicom lakoće otpuštanja protona i delokalizacije unutar grupe. Vrednost parametra EC_{50} za tiramin nije određena zbog redukcije DPPH radikala u odgovarajući anjon, što je onemogućilo praćenje opadanje intenziteta apsorpcije na 517 nm. Spektri prikazani u nastavku (slika 32) pokazuju da tiramin nema apsorpcionu traku u oblasti na kojoj je vršeno praćene redukcije radikala. Međutim, sa dodatkom tiramina raste intenzitet široke trake sa maksimumom na oko 450 nm koja odgovara anjonu DPPH radikala. Intenzitet date trake zavisi od koncentracije tiramina u rastvoru [190]. Molekuli bez hidroksilnih grupa na prstenu, fenilalanin i feniletilamin, nisu dali rezultate za redukciju 50% prisutnog radikala ni u slučaju velikih koncentracija, i do 1000 puta većih od koncentracije DPPH radikala.



Slika 32 a) Apsorpcioni spektar tiramina i rastvora DPPH* ($c=1 \times 10^{-4}$ M) sa dodatkom tiramina u različitim molskim odnosima i b) zavisnost apsorpcije rastvora DPPH* nakon dodatka 3-MT u različitim molskim odnosima (elektronski spektri)

Pored aktivnosti važan parametar za opisivanje antiradikalne aktivnosti je i brzina kojom se postiže redukcija radikala. Sa smanjenjem vrednosti parametra EC_{50}

smanjuje se i brzina reakcije. Rastvori ispitivanih molekula su snimani dva sata kako bi se osigurala potpuna redukcija radikala i dostizane platoa. Međutim za molekule kao što su 3-MT i oktopamin, koji su mereni pri malim molskim odnosima, kvantitavni parametri redukcije nisu mogli biti određeni ni posle ovog vremena snimanja.

Kako bi se pokazao uticaj strukturnih parametara na brzinu, dat je grafik zavisnosti apsorbancije od vremena za različite molske odnose DPPH[•] i 3-MT. Na osnovu slike 30 uočava se da su reakcije sa dopaminom, pri svim molarnim odnosima komponenata, bile završene do 100 s nakon dodatka dopamina, dok je kod 3-MT je apsorbancija opadala i nakon 6000 s od početka eksperimenta (slika 32). Slično je primećeno i kod ostalih molekula iz datog opsega EC₅₀ vrednosti.

Rezultati redukcije DPPH radikala dobijeni EPR spektroskopijom pokazuju dobro slaganje sa spektrofotometrijskim testom pri čemu su apsolutne vrednosti dobro reprodukovane. Aktivnost molekula opada u nizu DOPAC ≈ L-DOPA > dopamin ≈ epinefrin ≈ norepinefrin ≈ katehol > HVA ≈ 3-MT. Dobijeni rezultati pokazuju da se za ispitivanje antiradikalne aktivnosti molekula podjednako dobro mogu koristiti elektronska kao i EPR spektroskopija.

Strukture pomenutih molekula su optimizovane na M06-2X/6-311G(d,p) nivou kako bi se objasnila reaktivnost pojedinačnih delova molekula, posebno hidroksilnih grupa vezanih za aromatični prsten kao krajnjih grupa alifatičnog lanca. U tabeli 14 prikazane su vrednosti energija HOMO i LUMO orbitale, razlike ovih energije i energije stabilizacije, izračunate na sledeći način:

$$\Delta E_{se} = H(AO^{\bullet}) + H(PhOH) - H(AOH) - H(PhO^{\bullet}) \quad (41)$$

u kojoj su H(AOH) i H(AO[•]) entalpije ispitivanog molekula i njegovog radikala, a H(PhOH) i H(PhO[•]) entalpije fenola i fenoksidnog radikala.

Strukture tri najstabilnija konformera svakog od ispitivanih molekula su preuzete iz literature [120,125,130,139,143,157] i optimizovane na pomenutom nivou teorije i u tri rastvarača: vodi, metanolu i benzenu. Za poređenje sa eksperimentalnim rezultatima za redukciju DPPH radikala su iskorišćene strukture optimizovane u metanolu i to bez protonovanih/deprotonovanih oblika zbog toga što je pretpostavljeno da u metanolu ovi procesi neće biti dominantni. Termodinamički parametri raskidanja veze X–O (X=O, N) su izračunati za sve aktivne položaje u molekulima, a prema jednačinama 20-24.

Strukture radikal-katjona, radikala i anjona su optimizovane na osnovu najstabilnijeg konformera.

Na osnovu struktura prikazanih na slici 4 može se zaključiti da različiti molekuli imaju različit broj aktivnih mesta značajnih za antiradikalisku aktivnost: jedno mesto na kateholu (zbog simetrije molekula), dva na HVA (*p*-OH i COOH grupe) i 3-MT (*p*-OH i NH₂ grupe), tri na dopaminu (dve kateholne OH i NH₂ grupe), DOPAC (dve kateholne i COOH grupe), epinefrinu (dve kateholne OH i NH grupe), norepinefrinu (dve kateholne i NH₂) i L-DOPA (dve kateholne i COOH grupa). Svi termodinamički parametri za ispitivane molekule su dati u tabeli 15. U nastavku su prodiskutovani rezultati dobijeni kvantno-hemijskim izračunavanjima i njihove vrednosti su korelisane sa eksperimentalno dobijenim EC₅₀ vrednostima.

Tabela 14 Energetski parametri za ispitivane supstance (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije).

Molekul	HOMO [eV]	LUMO [eV]	ΔE [eV]	ΔE _{se} [kJ/mol]
Katehol	-0,295	0,053	0,348	-16,4
HVA	-0,296	0,044	0,341	-11,0
3-MT	-0,291	0,570	0,348	-15,6
Dopamin	-0,290	0,056	0,346	-22,5
Tiramin	-0,277	0,004	0,281	1,5
Feniletilamin	-0,248	0,005	0,253	154,3
DOPAC	-0,295	0,044	0,340	-18,9
Epinefrin	-0,294	0,055	0,349	-20,8
Norepinefrin	-0,294	0,055	0,350	-19,5
Oktopamin	-0,281	0,002	0,283	6,6
VMA	-0,275	0	0,275	-6,1
L-DOPA	-0,293	0,036	0,328	-32,4
Tirozin	0,279	0	0,279	3,26
Fenilalanin	-0,299	0	0,299	31,2
6-hidroksidopamin	-0,258	0,001	0,257	-40,9

Energije HOMO i LUMO orbitala

Razlika u energijama HOMO i LUMO orbitala može biti značajan parametar reaktivnosti molekula. Više energije HOMO orbitala omogućavaju molekulu da bude bolji elektron donor. Na osnovu rezultata u tabeli 14 može se zaključiti da svi ispitivani molekuli imaju slične vrednosti energija HOMO orbitala, oko -0,3 eV. Molekuli sa karboksilnom grupom imaju više energije što ukazuje na značaj ove grupe za antiradikalnu aktivnost. L-DOPA ima najnižu vrednost razlike energija HOMO i LUMO orbitale što je dobro korelisano sa antiradikalnom aktivnošću ovog molekula. Ova razlika je mala i kod molekula sa karboksilnom grupom zbog blizine n orbitale kiseonika i π^* orbitale karboksilne grupe. Zanimljivo je primetiti da molekul 3-MT ima vrednost razlike energija HOMO i LUMO orbitale koja je uporediva sa dopaminom, iako su EC_{50} vrednosti značajno različite. Ovo ukazuje da metoksilna grupa ove strukture ne utiče na vrednost ovih energija. Treba napomenuti i da ovakva vrsta analize može biti dvosmislena, posebno kada se upoređuju molekuli koji imaju različite strukturne jedinice.

Energija stabilizacije

Vrednosti stabilizacionih energija se mogu iskoristiti za poređenje aktivnosti različitih supstanci prema istom radikalu, u ovom slučaju fenoksi-radikalu ($ArO^{\bullet}$) u vodi [288]. Ove vrednosti, prikazane u tabeli 14, su izračunate samo za pretpostavljeno najreaktivnije mesto molekula, hidroksilnu grupu u p -položaju. Vrednosti promene entalpija su negativne za sve molekule koji imaju kateholnu strukturu kao i hidroksilnu i metoksilnu grupu na aromatičnom prstenu. Najveće pozitivne vrednosti entalpija su dobijene za fenilalanin i feniletilamin koji nemaju hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu. Feniletilamin ima pet puta veću energiju stabilizacije u odnosu na fenilalanin zbog smanjene stabilnosti celokupne strukture. Pozitivne vrednosti promena entalpije ove reakcije su dobijene i za oktopamin, tirozin i tiramin koji imaju samo hidroksilnu grupu u p -položaju. Kada su prisutne hidroksilna i metoksilna grupa, u strukturi 3-metoksitramina, VMA i HVA, vrednosti energija stabilizacije su do -15 kJ/mol. Molekuli sa kateholnom strukturom imaju vrednosti ovog parametra iznad -18 kJ/mol. Najviše energije stabilizacije su dobijene za molekule L-DOPA i 6-hidroksidopamin. Na osnovu ovog parametra značajnije vrednosti antiradikalne aktivnosti su očekivane za većinu

Tabela 15 Termodinamički parametri, u kJ/mol, za tri najčešća antiradikalna mehanizma za kateholamine i njihove metabolite (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p))

Molekul	Reakciono mesto	Vodeni rastvor					Benzen					Metanol				
		HAT/PCET	SET-PT		SPLET		HAT/PCET	SET-PT		SPLET		HAT/PCET	SET-PT		SPLET	
		BDE	IP	PDE	PA	ETE	BDE	IP	PDE	PA	ETE	BDE	IP	PDE	PA	ETE
Katehol			490					656					508			
	OH	348		21	139	372	334		91	425	322	344		11	137	382
HVA			482					634					500			
	<i>p</i> -OH	354		35	154	363	360		139	469	304	351		26	153	372
	COOH	412		94	109	466	350		129	426	337	413		88	108	479
3-MT			474					621					492			
	<i>p</i> -OH	349		38	157	355	356		148	478	291	346		28	156	364
	NH ₂	412		100	320	255	418		210	644	187	414		97	324	265
Dopamin			479					632					496			
	<i>p</i> -OH	342		26	143	363	332		113	424	321	338		16	141	372
	<i>m</i> -OH	347		31	141	369	328		109	426	315	342		21	139	378
	NH ₂	412		96	320	255	418		200	638	193	415		93	323	266
Tiramin			498					648					515			
	<i>p</i> -OH	366		22	148	372	359		125	459	313	363		22	156	382
	NH ₂	412		65	308	254	414		179	627	200	412		71	322	264
Feniletilamin			504					670					522			
	NH ₂	409		59	308	255	418		161	625	206	415		67	321	268
DOPAC			487					649					504			
	<i>p</i> -OH	346		22	140	369	335		98	418	329	342		21	137	379
	<i>m</i> -OH	347		23	139	371	333		96	419	327	343		13	137	381
	COOH	418		94	110	471	347		111	422	338	418		88	109	483
Norepinefrin			483					631					498			
	<i>p</i> -OH	344		24	140	367	330		111	431	312	339		15	136	377
	<i>m</i> -OH	346		27	138	371	334		116	432	315	341		17	136	380
	NH ₂	384		64	313	234	393		174	577	229	388		64	/	/

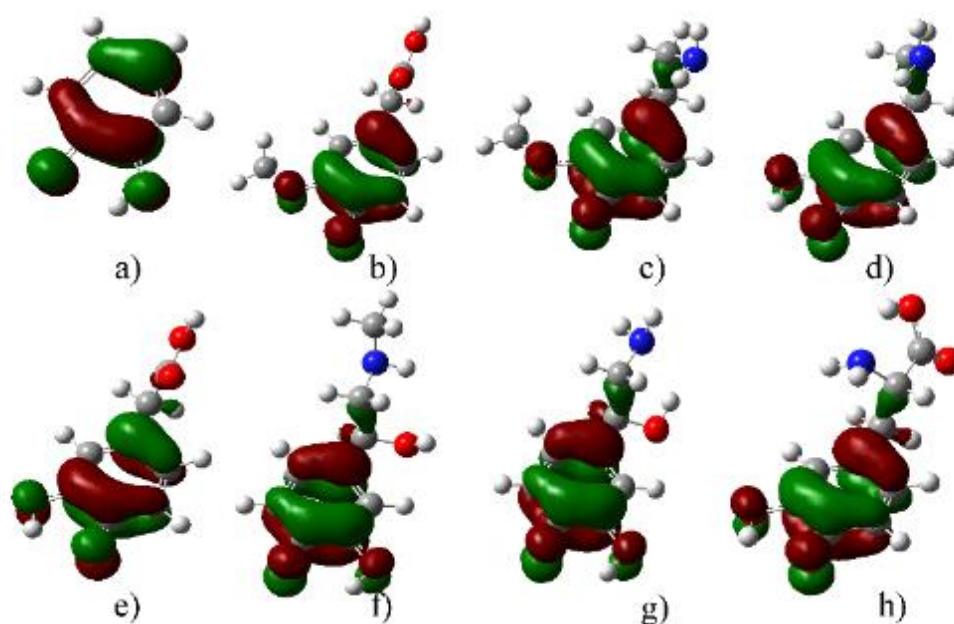
Molekul	Reakciono mesto	Vodeni rastvor					Benzen					Metanol				
		HAT/PCET	SET-PT		SPLET		HAT/PCET	SET-PT		SPLET		HAT/PCET	SET-PT		SPLET	
		BDE	IP	PDE	PA	ETE	BDE	IP	PDE	PA	ETE	BDE	IP	PDE	PA	ETE
Epinefrin		483					637					499				
	<i>p</i> -OH	345		25	140	368	329		105	439	303	340		16	138	377
	<i>m</i> -OH	349		28	140	372	332		108	426	320	344		20	138	381
	NH	422		101	206	379	423		199	577	259	425		101	297	303
Oktopamin		506					656					523				
	<i>p</i> -OH	371		29	153	381	361		117	458	315	367		19	153	389
	<i>al</i> -OH	458		116	207	414	456		213	535	335	458		110	210	423
	NH ₂	421		79	207	377	419		202	263	513	416		68	211	380
VMA		488					608					467				
	<i>p</i> -OH	359		33	149	373	360		136	460	313	354		24	148	381
	<i>al</i> -OH	486		161	184	465	/		/	515	/	486		156	184	477
	COOH	399		73	90	472	/		/	388	/	397		67	89	483
L-DOPA		471					659					474				
	<i>p</i> -OH	332		24	131	364	331		85	411	333	340		13	139	375
	<i>m</i> -OH	335		27	130	368	334		87	408	339	342		16	137	380
	COOH	417		109	106	474	482		235	429	466	429		103	116	488
Tirozin		506					679					529				
	<i>p</i> -OH	370		28	156	378	364		98	439	338	365		10	153	386
	COOH	444		101	112	495	/		/	427	/	447		92	112	509
Fenilalanin		534					573					551				
	COOH	396		25	102	456	363		202	263	513	390		14	103	462
6-hidroksidopamin		451					608					467				
	<i>p</i> -OH	332		45	140	355	319		124	424	307	328		35	138	365
	<i>m</i> -OH	324		36	147	340	312		118	437	289	320		27	145	349
	<i>o</i> -OH	341		45	159	345	339		144	456	295	337		44	158	354
	NH ₂	413		125	319	257	417		222	632	198	415		122	322	267

ispitivanih molekula, što je i pokazano prilikom analize reakcija sa DPPH radikalom. Detaljnija analiza aktivnosti je data u nastavku.

Energija disocijacije veze i afinitet prema protonu

Formiranje radikala je moguće kada se homolitički raskinu N–H i O–H veze. Stabilnost formiranih radikala je važan parametar koji uslovljava mehanizam reakcije zato što utiče na njegovu termodinamčku povoljnost. Na osnovu vrednosti prikazanih u tabeli 15 uočeno je da nema velikih razlika u vrednostima za BDE u polarnim rastvaračima (vodi i metanolu). Geometrije molekula su bile ekvivalentne u oba polarna rastvarača što objašnjava male razlike u vrednostima termodinamičkih parametara. Kao što se može videti u tabeli 15, najstabilniji radikali nastaju kada se homolitički raskinu O–H veze grupa koje su direktno vezane za aromatični prsten. Vrednost BDE parametra zavisi i od prisustva druge hidroksilne grupe. Ukoliko druga hidroksilna grupa nije prisutna u strukturi, kao kod 3-MT i HVA, BDE vrednosti su više i do 20 kJ/mol u svim rastvaračima. U slučaju tiramina, tirozina i oktopamina, kod kojih ne postoje hidroksilne grupe u *m*-položaju, vrednost BDE je oko 370 kJ/mol. Za molekule sa kateholnom jedinicom (L-DOPA, DOPAC, dopamin, 6-hidroksidopamin, epinefrin i norepinefrin) vrednosti BDE su slične za obe OH grupe. Jedan od razloga može biti i optimizacija strukture radikala kod koga je nagrađena vodonična veza koja dodatno stabilizuje strukturu. Odmah nakon deprotonovanja, a pre rotacije druge hidroksilne grupe i nagrađnje vodonične veze, BDE vrednosti bi trebalo da se razlikuju. Vrednosti ovog parametra su slične za dopamin, epinefrin, norepinefrin, DOPAC i L-DOPA što ukazuje da sam alifatični niz ne utiče značajno na njegovu vrednost. Kada se uporede vrednosti BDE parametra za amino grupu zaključuje se da je termodinamički manje povoljno njihovo raskidanje za koje je u proseku potrebno od 40 do 80 kJ/mol više energije. Vrednosti BDE parametra za karboksilnu grupu su 70 kJ/mol veće, što prema HAT mehanizmu ukazuje da je ona nepovoljno mesto za nastanak radikala. Ukoliko je hidroksilna grupa prisutna u strukturi lanca onda se vrednosti termodinamičkih parametara smanjuju kao kod sledećih parova: dopamin-norepinefrin i DOPAC-VMA. Razlog ovog smanjenja je najverovatnije mogućnost građenja intramolekulske vodonične veze.

Stabilnost radikala se može objasniti i na osnovu spinske delokalizacije i delokalizacije SOMO orbitale. SOMO orbale odabranih molekula su prikazane na slici 33. Radikali sa dobrom spinskom delokalizacijom lakše nastaju i stabilniji su. U svim prikazanim strukturama nespareni elektron je rasprostranjen po aromatičnom prstenu, sa značajnim udelom na kiseonikovom atomu u *o*-položaju. Ovo dokazuje da su kateholna jedinica i kiseonikovi atomi na aromatičnom prstenu važni strukturni parametri za antiradikalisku aktivnost. SOMO orbitale ispitivanih molekula pokazuju delokalizaciju oko atoma kiseonika sa koga je raskinuta veza sa vodonikom, ali i oko drugog kiseonika i ugljenikovih atoma aromatičnog prstena. Dodatna stabilizacija je posledica delokalizacije u alifatičnom nizu. Analiza SOMO orbitala dodatno potvrđuje stabilnost dobijenih radikala.



Slika 33 SOMO orbitale odabranih molekula (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije): a) katehol, b) HVA, c) 3-MT, d) dopamin, e) DOPAC, f) epinefrin, g) norepinefrin, h) L-DOPA

Kako bi se dobili dodatni kvantitativni parametri za ispitivanje stabilizacije radikala iskorišćena je NBO analiza. Na osnovu rezultata perturbacione teorije drugog reda konstatovano je da postoji značajna donorsko-akceptorska interakcija između kiseonikovih atoma u formiranom radikalu i hidroksilne grupe u *m*-položaju u odnosu na

alifatični niz. Vrednost energije stabilizacije u ovom slučaju iznosi 1,05 kJ/mol. Na osnovu NBO analize zaključeno je i da su naelektrisanja, u formiranim radikalima, na kiseonikovom atomu u *p*-položaju (tabela S7). Ista tabela pokazuje da su naelektrisanja na kiseonikovom atomu slična za sve formirane radikale.

Heterolitičkim raskidanjem O–H i N–H veza, kojim se opisuje afinitet prema protonu (tabela 15), nastaju odgovarajući anjoni. Ove vrednosti pokazuju još veće sličnosti u vodi i metanolu. Vrednost PA iznosi oko 140 kJ/mol kada je u strukturi prisutna kateholna jedinica. Ukoliko su u strukturi prisutne jedna hidroksilna i jedna metoksilna grupa vrednost parametra raste na 155 kJ/mol, usled nedostatka stabilizacije vodoničnom vezom. U slučaju molekula sa jednom ili nijednom hidroksilnom grupom na prstenu PA vrednost hidroksilne grupe u *p*-položaju je slična kao u slučaju prisustva metoksilne grupe u *m*-položaju. Ovakav rezultat ukazuje na to da PA vrednost zavisi isključivo od prisustva druge hidroksilne grupe sa kojom se ostvaruje jaka vodonična veza. Vrlo bliske PA vrednosti su dobijene za strukture koje imaju dve hidroksilne grupe koje se nalaze u kateholnoj jedinici. Niže vrednosti PA su izračunate za karboksilne grupe zbog stabilizacionog efekta delokalizacije u COO[−] grupi usled postojanja visokog stepena simetrije. Značajan uticaj na PA vrednosti kod karboksilnih kiselina ima prisustvo dodatnih grupa na alifatičnom nizu što, usled interakcije sa hidroksilnom grupom, uslovljava najnižu vrednost ovog parametra kod VMA. U slučaju molekula L-DOPA postoji vodonična veza između amino i karboksilne grupe tako da je vrednost PA niža nego kod DOPAC-a i iznosi 106 kJ/mol. Deprotonovanje molekula koji sadrže karboksilnu grupu je značajan proces u polarnim rastvaračima, ali prilikom određivanja najpovoljnijeg mehanizma nije uzeta zbog ispitivanja molekula u neutralnom obliku. Reaktivnost molekula po SPLET mehanizmu verovatno zavisi i od pH vrednosti rastvora. PA vrednosti amino grupe su više od dva puta veće nego kod ostalih grupa što je posledica smanjenja simetrije unutar NH[−] grupe usled gubitka protona. Ponovo, ukoliko je prisutna hidroksilna grupa na alifatičnom nizu struktura anjona nastalog deprotonovanjem amino grupe je dodatno stabilizovana tako da dopamin i 3-MT imaju PA vrednost parametra oko 255 kJ/mol, dok su kod norepinefrina i oktopamina između 234 i 207 kJ/mol respektivno. Visoke vrednosti ovog parametra ukazuju da ove grupe najverovatnije nisu uključene u antiradikalske mehanizme. Na osnovu podataka iz iz tabele 15 uočava se da postoje i značajne razlike u PA vrednostima u polarnim i nepolarnim rastvaračima što ukazuje da

je prvi korak SPLET mehanizma termodinamički verovatniji od HAT mehanizma u polarnim rastvaračima kao i da su nastale vrste stabilizovane dipol-dipol i ostalim specifičnim interakcijama. Isti efekat stabilizacije je uočen kod anjona molekula sa kateholnom strukturom, uz formiranje jače vodonične veze nego kod odgovarajućih radikala. Energija veze je oko 2,2 kJ/mol, što dodatno objašnjava povoljnost SPLET mehanizma u odnosu na HAT.

Potencijal jonizacije

Pri gubljenju jednog elektrona iz strukture nastaje radikal-katjon. Uopšteno, molekuli sa nižim vrednostima parametra IP lakše otpuštaju elektron i lakše učestvuju u hemijskim reakcijama [288]. Svi ispitivani molekuli imaju slične vrednosti IP i ovaj korak zahteva oko 250 kJ/mol više energije u polarnim rastvaračima (vodi i metanolu) u odnosu na benzen. Najniže vrednosti ovog parametra su određene za L-DOPA. Uvođenje dodatne hidroksilne grupe ne menja značajno vrednost ovog parametra, što je pokazano kada se uporede IP vrednosti za dopamin i DOPAC sa vrednostima za 3-MT i HVA, respektivno. Ovaj korak je termodinamički nepovoljniji u poređenju sa prvim korakom SPLET i HAT mehanizama, tako da nije diskutovan dalje u ovom poglavlju. Potencijal jonizacije je, za ispitivane molekule koji imaju jednu ili nijednu hidroksilnu grupu na aromatičnom prstenu, iznad 500 kJ/mol.

Antiradikalski mehanizmi u vodi, metanolu i benzenu

Anitradikalna aktivnost kateholamina je dokazana u prvom delu prema DPPH radikalu, a u nastavku teze i prema ostalim radikalima. Termodinamički najverovatniji mehanizam delovanja je prodiskutovan na osnovu vrednosti parametara (BDE, IP, PDE, PA i ETE) izračunatih u različitim rastvaračima. Najniža vrednost označava najpovoljniji mehanizam. Izračunati parametri pokazuju da se značajna aktivnost može očekivati od većine ispitivanih molekula. Dodatna hidroksilna grupa na aromatičnom prstenu snižava vrednosti termodinamičkih parametara, pri čemu se zaključuje da je kateholna jedinica važan strukturni parametar. Zbog rezonantnog efekta unutar grupe COO^- grupe molekuli sa karboksilnom grupom imaju nisku vrednost PA što čini ovu grupu takođe važnom za antiradikalnu aktivnost molekula. Kada se oba strukturna parametra uzmu u obzir može se reći da L-DOPA i DOPAC imaju najveću verovatnoću da budu dobri gasioci radikala,

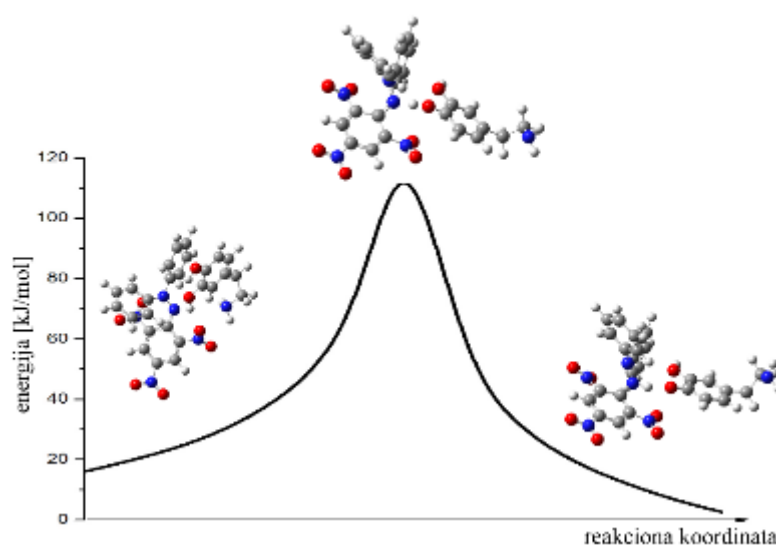
što je i pokazano eksperimentalno. Poređenje parametara za prvi korak svakog od mehanizama (BDE, IP i PA) pokazuje da su vrednosti za IP najviše što ukazuje da je SET-PT mehanizam najmanje verovatan. U polarnom rastvaraču PA vrednosti su niže od BDE dok je u benzenu obrnuto. Razlika između PA i BDE vrednosti u polarnom rastvaraču je oko 200 kJ/mol, iz čega se zaključuje da je heterolitičko raskidanje veze proces koji preovlađuje u polarnom rastvaraču. Kako bi se dobijeni rezultat potvrdio i sa aspekta kinetike reakcija dodatno su ispitani prvi koraci u SPLET i HAT mehanizmima.

HAT vs. PCET mehanizam

Prema rezultatima EPR eksperimenata HAT je pretpostavljen kao dominantan mehanizam antiradikalskog delovanja ispitivanih supstanci [175,176]. Razmena atoma vodonika između četiri odabrana kateholamina (L-DOPA, dopamin, norepinefrin i epinefrin) i DPPH radikala je u ovoj tezi ispitana na M062-2X/6-31G(d,p) nivou teorije u vakuumu. Prelazna stanja ove reakcije su detaljno prodiskutovana.

Reakcije su analizirane sa termodinamički najpovoljnijeg položaja, hidroksilne grupe u *p*-položaju, pri čemu je samo jedno prelazno stanje optimizovano za svako od jedinjenja. Može se očekivati da za svaki od ispitivanih molekula postoje i dodatni reakcioni putevi posebno usled stabilizacije struktura vodoničnom vezom, koja je važan parametar ovakvog tipa reakcija [200,289]. Sve reakcije su dodatno ispitane primenom jednačina teorije prelaznog stanja koji uključuje i efekte tunelovanja. Prelazno stanje između dopamina i DPPH radikala je prikazano na slici 34.

Energije aktivacije, brzine reakcija i promene u Gibsovoj slobodnoj energiji za reakcije su date u tabeli 16. Dobijene vrednosti konstanti brzina su slične za sve ispitivane molekule pri čemu je najniža vrednost određena za dopamin. Ove vrednosti pokazuju dobro slaganje sa prethodno dobijenim rezultatima na sličnim molekulima: fenolu, 4-metoksifenolu i 3-metoksifenolu, objavljenim u opsežnom istraživanju Fotija (*Foti*) i saradnika [199] koje je imalo za cilj upoređivanje eksperimentalnih i teorijskih konstanti brzina. Eksperimentalno dobijene konstante brzina dopamina, epinefrina, norepinefrina i L-DOPA sa galvanoksil-radikalom [175] su bile istog reda veličine kao teorijske vrednosti dobijene u ovom istraživanju. Značajan efekat polarnosti rastvarača na konstantu brzine je pokazan u radu Fotija i Rubertoa (*Ruberto*) [290].



Slika 34 Reakcioni put za reakciju između dopamina i DPPH radikala (strukture optimizovane na M06-2X/6-31G(d,p) nivou teorije)

Jedno od pitanja koje je proisteklo iz istraživanja je i da li se reakcija između DPPH radikala i ispitivanih jedinjenja odvija prema HAT ili PCET mehanizmu. Oba mehanizma imaju važne biološke implikacije, kao što je prodiskutovano u uvodnom delu rada. Nekoliko tehnika razlikovanja ova dva mehanizma je iskorišćeno u ovom istraživanju. Jedan od važnih uslova odigravanja reakcija prema PCET mehanizmu je formiranje vodonične veze u pre-reakcionom kompleksu i prelaznom stanju [262,263], što je postignuto ovde. Iako prisutna, vodonična veza ne predstavlja dovoljan uslov za dokazivanje PCET mehanizma [263]. U strukturi prelaznog stanja za reakciju DPPH radikala i dopamina, ugao $\theta(\text{O-H-N})$ je 165° , što odstupa od linearnosti zbog sternih smetnji i veličine radikalske vrste [199]. Kod čistog HAT mehanizma ovaj ugao bi trebalo da bude blizu 180° . Diedarski uglovi se takođe mogu koristiti za razlikovanje HAT i PCET mehanizma. Ako je vodonikov atom koji se razmenjuje u ravni sa C-N-N i O-C-C vezama, onda je dominantni mehanizam HAT. U slučaju PCET mehanizmna vodonikov atom koji se razmenjuje se nalazi pod uglom od 90° u odnosu na pomenute uglove veza. Vrednosti ovih uglova za dopamin-DPPH' kompleks su: $\phi(\text{H-O-C-C}) = 45^\circ$ i $\phi(\text{H-N-N-C}) = 43^\circ$. Strukturni parametri za preostale ispitivane molekule se razlikuju za najviše 1° , što ukazuje da se prelazna stanja, najverovatnije zbog sternih smetnji, razlikuju od očekivanih za oba mehanizma.

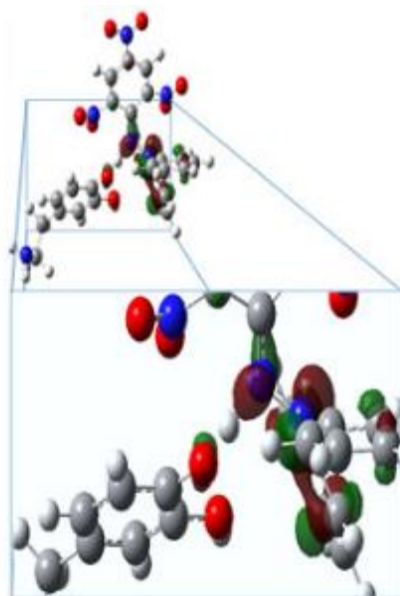
Još jedan od načina razlikovanja ova dva mehanizma je detaljno ispitivanje SOMO orbitale [11]. Za HAT mehanizam je karakteristična elektronska gustina SOMO orbitale duž donor-H-akceptor ose. Sa druge strane, PCET mehanizam uključuje *p*-orbitale koje su ortogonalne u odnosu na liniju koja spaja atome koji se ponašaju kao donor i akceptor atoma vodonika. SOMO orbitala za prelazno stanje dopamin-DPPH[•] je data na slici 35, sa uvećanim delom od interesa. Kao što se može videti na pomenutoj slici, ovo prelazno stanje odstupa od linearnosti, iako postoji deo elektronske gustine duž linije koja spaja reaktante. Atom vodonika prelazi sa donora na akceptor pri čemu postoji interakcija sa *p* orbitalama atoma azota i slobodnog elektronskog para na kiseoniku, što je primećeno i kod sličnih molekula [199].

Tabela 16 Vrednosti termodinamičkih i kinetičkih parametara, dobijenih iz teorije prelaznog stanja, za reakciju odabranih neurotransmitera i DPPH radikala (strukture optimizovane na M06-2X/6-31G(d,p) nivou teorije)

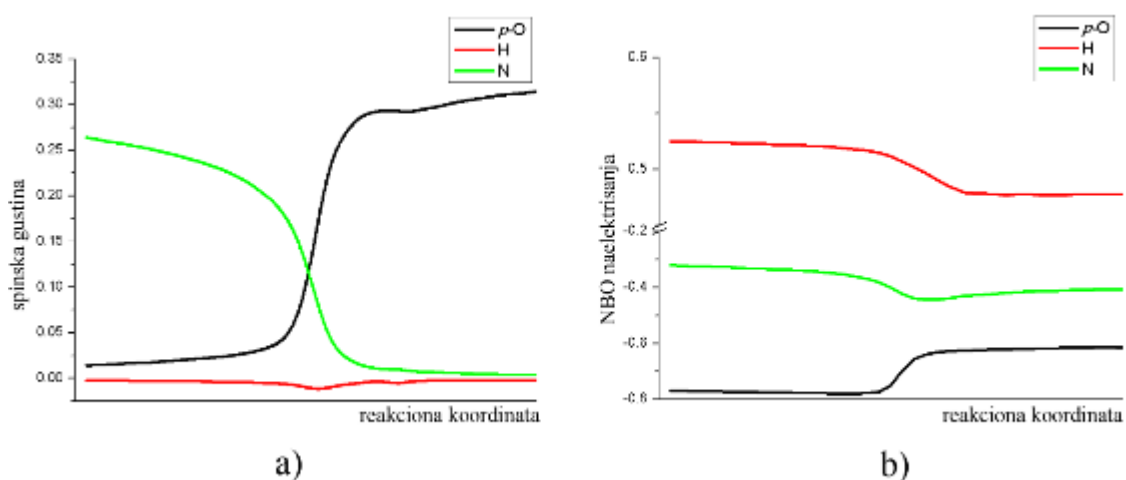
Reakcija	$\Delta G^\ddagger$ [kJ/mol]	k^{TST} [M ⁻¹ s ⁻¹]	ΔG_r [kJ/mol]
L-DOPA + DPPH [•]	67,6	8,8	15,3
Dopamin + DPPH [•]	77,1	$1,9 \times 10^{-1}$	19,3
Norepinefrin + DPPH [•]	60,1	$1,8 \times 10^2$	2,6
Epinefrin + DPPH [•]	56,4	$8,2 \times 10^2$	-0,9

U revijskom radu Galano [11] opisan je jednostavan način razlikovanja HAT i PCET mehanizma, zasnovan na promeni naelektrisanja i spinske gustine H-donora, H-akceptora i atoma vodonika duž reakcione koordinate. Promena znaka naelektrisanja na atomima donora i akceptora atoma vodonika je evidentna za PCET mehanizam, dok kod HAT mehanizma znak naelektrisanja ostaje negativan duž cele reakcije [291]. Pored promene znaka i izgled krive promene spinske gustine i naelektrisanja može biti faktor razlikovanja. Glatka promena u atomskom naelektrisanju je indikator HAT mehanizma, dok je za PCET karakteristična nagla promena ovog parametra u blizini prelaznog stanja. Vrednosti za parcijalna naelektrisanja atoma od interesa i spinske gustine za reakcioni kompleks, prelazno stanje i proizvodni kompleks su prikazani na slici 36. Naelektrisanja na kiseonikovom i azotovom atomu su negativna duž cele koordinate bez promene naelektrisanja, dok je naelektrisanje na vodoniku oko 0,5 e što se nalazi na sredini između vrednosti koje su Sirjušing (*Sirjoosingh*) i Hames-Šifer (*Hammes-Schiffer*) dobili za HAT

i PCET mehanizme [291]. Promena naelektrisanja u sistemu dopamin–DPPH[•] je relativno glatka, uz značajnije promene u blizini prelaznog stanja i bez presecanja krivih. Kada se uporedi zavisnost spinske gustine od reakcione koordinate sa slikom 8 rada Sirjušinga i Hames-Šifera [291], može se uočiti da kriva ima karakteristike oba mehanizma. Na osnovu strukturnih parametara i izgleda SOMO orbitale moguće je zaključiti da su prisutna oba mehanizma.



Slika 35 SOMO orbitala prelaznog stanja između dopamina i DPPH radikala (struktura optimizovana na M06-2X/6-31G(d,p) nivou teorije)



Slika 36 Promena duž reakcione koordinate za relevantne atome za reakciju između dopamina i DPPH[•] a) spinske gustine, b) NBO naelektrisanja (strukture optimizovane na M06-2X/6-31G(d,p) nivou teorije)

Zbog kompleksnosti ispitivanog radikala i sternih smetnji koje mogu biti od značaja, reakcija između dopamina (ali i ostalih kateholamina) i DPPH radikala se ne može jednostavno opisati HAT i PCET mehanizmima. Ovaj sistem potpada pod sisteme kod kojih razlikovanje ova dva mehanizma nije moguće zbog, kako su objasnili Skone (*Skone*) i saradnici [262,292], kvatno-mehaničke prirode protona i elektrona.

SPLET mehanizam

Vrednosti termodinamičkih parametara za prvi korak SPLET mehanizma su niže od BDE vrednosti (tabela 15) što nije ograničavajući korak u antiradikalnoj aktivnosti ispitivanih molekula u polarnim rastvaračima. Kako drugi korak SPLET mehanizma predstavlja prenos elektrona sa anjona antiradikalne vrste na radikal to ga, prema vrednostima odgovarajućih deskriptora, čini manje povoljnim u odnosu na HAT/PCET mehanizam ili prvi korak u SPLET mehanizmu. Kinetički parametri ovog koraka su ispitani korišćenjem Markusove teorije, kao što je objašnjeno u poglavlju Računarske metode. Tabela 17 daje vrednosti slobodne energije aktivacije, slobodne energije reakcije za prenos elektrona, energiju reorganizacije, konstantu brzine i prividnu konstantu brzine reakcije.

Tabela 17 Vrednosti parametara za reakciju prenosa elektrona u sistemu kateholamini-DPPH[•] prema Markusovoj teoriji (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

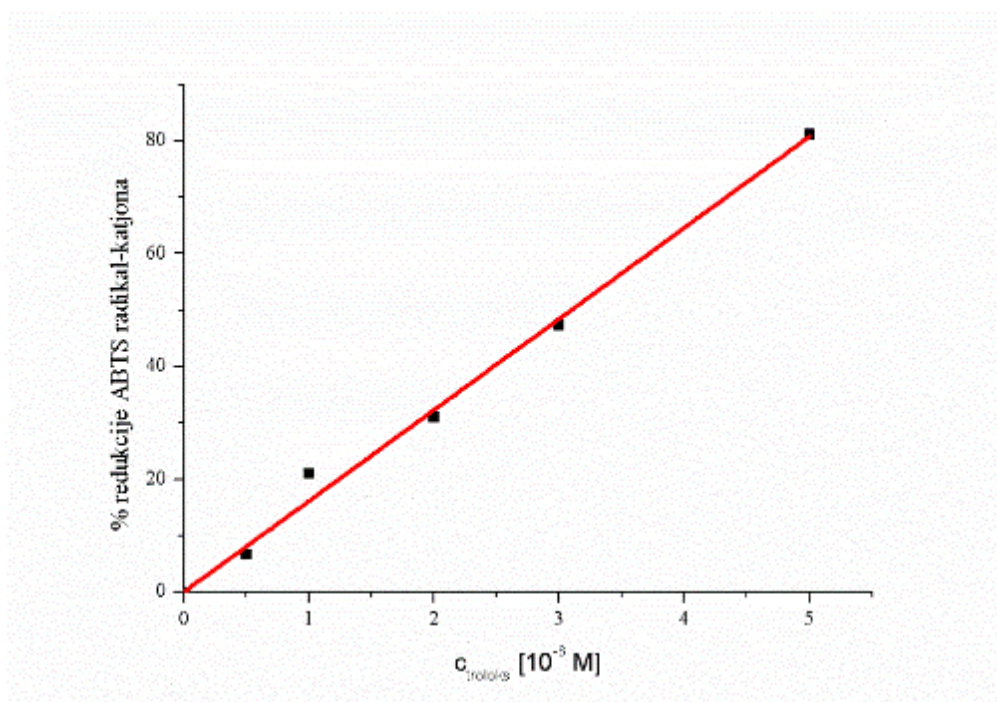
Reakcija	$\Delta G^{\ddagger}_{ETE}$ [kJ/mol]	ΔG^0_{ETE} [kJ/mol]	λ [kJ/mol]	k_{TST} [M ⁻¹ s ⁻¹]	$k_{app} \times 10^6$ [M ⁻¹ s ⁻¹]
L-DOPA ⁻ + DPPH [•]	2,7	-64,5	43,0	$2,11 \times 10^{12}$	3,33
DopaminA ⁻ + DPPH [•]	22,6	-102,3	41,2	$6,85 \times 10^8$	3,32
EpinefrinA ⁻ + DPPH [•]	25,6	-106,3	41,3	$2,02 \times 10^8$	3,29
NorepinefrinA ⁻ + DPPH [•]	31,0	-107,5	38,4	$2,27 \times 10^7$	2,91

Rezultati prikazani u tabeli 17 pokazuju da su vrednosti konstanti brzina reakcija prenosa elektrona reda veličine 10⁶ M⁻¹s⁻¹ za sve ispitivane molekule. Vrednosti za različite kateholamine su uporedive što potvrđuje da nema značajnije razlike u njihovoj aktivnosti, kao što je eksperimentalno i pokazano. Poređenjem konstanti brzina dobijenih iz teorije prelaznog stanja i Markusove teorije (tabele 16 i 17) može se zaključiti da su

slobodne energije reakcije manje u slučaju reakcija prenosa elektrona dok su konstante brzina veće (10^6 u poređenju sa $10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ovakav rezultat dokazuje da su reakcije prenosa elektrona brže od prenosa atoma vodonika. Zajedno sa nižom vrednošću promene entalpije za prvi korak SPLET mehanizma, opšti zaključak je da se reakcije dopamina, epinefrina, norepinefrina i L-DOPA sa DPPH radikalom u metanolu odigravaju prema SPLET mehanizmu. Dobijeni rezultat se može, zbog strukturne sličnosti sa ostalim kateholaminima, generalizovati i na druge ispitivane supstance.

7.2.2. ABTS^{•+}

Aktivnost odabranih supstanci prema ABTS radikal-katjonu je određena spektrofotometrijski i izražena u TEAC vrednostima. Prilikom određivanja antiradikalske aktivnosti jedinjenja posmatran je uticaj koncentracije ispitivanih jedinjenja i trajanja reakcije na intenzitet apsorpcije radikal. Apsorbancije ABTS^{•+} rastvora nakon dodatka supstanci supstance u šestom minutu su uzete kao merilo koncentracije preostalog radikala. TEAC vrednosti su dobijene kao količnik nagiba grafika zavisnosti procenta redukcije od koncentracije ispitivanih supstanci i troloksa. Zbog velikog procenta redukcije radikala, pri malim koncentracijama ispitivanih supstanci, ispitivani su samo linearni delovi grafika. Kalibraciona kriva za troloks je prikazan na slici 37, a TEAC vrednosti date u tabeli 18.



Slika 37 Kalibracioni grafik procenat redukcije ABTS^{•+} troloksom

$$\% \text{ redukcije} = 16,1(\pm 0,4) \cdot c_{\text{troloks}} \quad (62)$$

Na osnovu TEAC vrednosti može se zaključiti da ispitivane supstance pokazuju različitu aktivnost prema ABTS radikal-katjonu. Najveći procenat redukcije je dobijen za DOPAC i L-DOPA i to 58 i 50, respektivno. Druga grupa molekula uključuje dopamin, epinefrin i norepinefrin sa TEAC vrednostima 15,5, 28,0 i 26,7. Smanjenje broja

hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu dodatno smanjuje TEAC vrednost. Kod tiramina je ova vrednost dva puta manja nego kod dopamina, dok je kod tirozina oko deset puta manja nego kod molekula L-DOPA. Ukoliko je jedna hidroksilna grupa zamenjena metoksilnom grupom aktivnost se takođe višestruko smanjuje što pokazuju TEAC vrednosti za DOPAC i HVA. Molekuli koji u strukturi nemaju hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu, feniletilamin i fenilalanin, pokazuju niske TEAC vrednosti. U ovim eksperimentima je ponovo pokazano da kateholna jedinica ima važnu ulogu u antiradikalskoj aktivnosti ispitivanih jedinjenja. Pored ove grupe, karboksilna grupa na alifatičnom nizu dodatno povećava aktivnost što objašnjava relativni raspored ispitivanih molekula. Hidroksilne grupe na alifatičnom nizu, u strukturi epinefrina i norepinefrina, dvostruko povećavaju aktivnost prema ABTS radikal-katjonu.

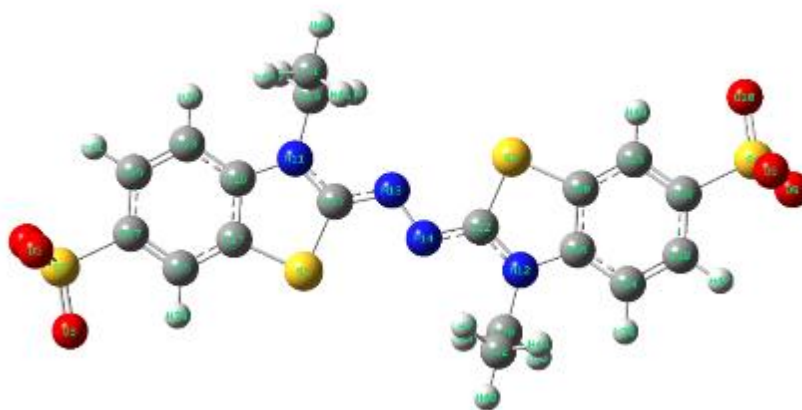
Tabela 18 TEAC vrednosti za redukciju ABTS radikal-katjona odabrim neurotransmiterima, njihovim prekursorima i metabolitima

Molekul	TEAC [$\times 10^{-6}$ M]
DOPAC	$58,00 \pm 2,00$
L-DOPA	$50,00 \pm 2,00$
Norepinefrin	$28,00 \pm 1,00$
Epinefrin	$26,70 \pm 0,90$
Dopamin	$15,50 \pm 0,50$
Tiramin	$5,70 \pm 0,20$
Tirozin	$5,10 \pm 0,20$
HVA	$3,20 \pm 0,10$
Feniletilamin	$0,100 \pm 0,003$
Fenilalanin	$0,020 \pm 0,002$

ABTS radikal-katjon se redukuje prenosom elektrona sa molekula antioksidansa. U literaturi je poznato nekoliko vrsta koje mogu nastati od ABTS molekula pri različitim pH vrednostima. Prema rezultatima Skota (Scott) i saradnika [293], prikazanom spektru i na pH vrednostima na kojima su rađeni eksperimenti, prisutni radikal je monoanjon radikal ABTS molekula. Ovo je dva puta deprotonovana vrsta sa sulfatnih grupa, koja gubitkom jednog elektrona prelazi u monoanjon radikal. Zbog nedostatka jednog elektrona u literaturi se označava kao radikal-katjon, $ABTS^{*+}$. Pre detaljne analize mogućeg mehanizma sa neurotransmiterima, njihovim prekursorima i metabolitima, prodiskutovana je struktura ovog radikala zbog toga što u literaturi nema njegove

detaljnije kvantno-mehaničke analize, iako se intenzivno koristi u ispitivanju antioradikalske aktivnosti pojedinačnih molekula i njihovih smeša u prirodnim proizvodima.

Struktura optimizovanog ABTS radikal-katjona i numeracija atoma su prikazane na slici 38. Struktura molekula je preuzeta iz rada Kristijansena (*Christensen*) i Kepa (*Kepp*) [205] i optimizovana na M062-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije. U tabeli 19 su data naelektrisanja i spinske gustine na atomima u $\text{ABTS}^{+\cdot}$, ABTS^{2-} i H_2ABTS kao i numeracija atoma kako bi se prodiskutovala stabilnost formiranog radikala.



Slika 38 Struktura optimizovanog $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radikal-katjona i numeracija atoma (struktura optimizovana na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

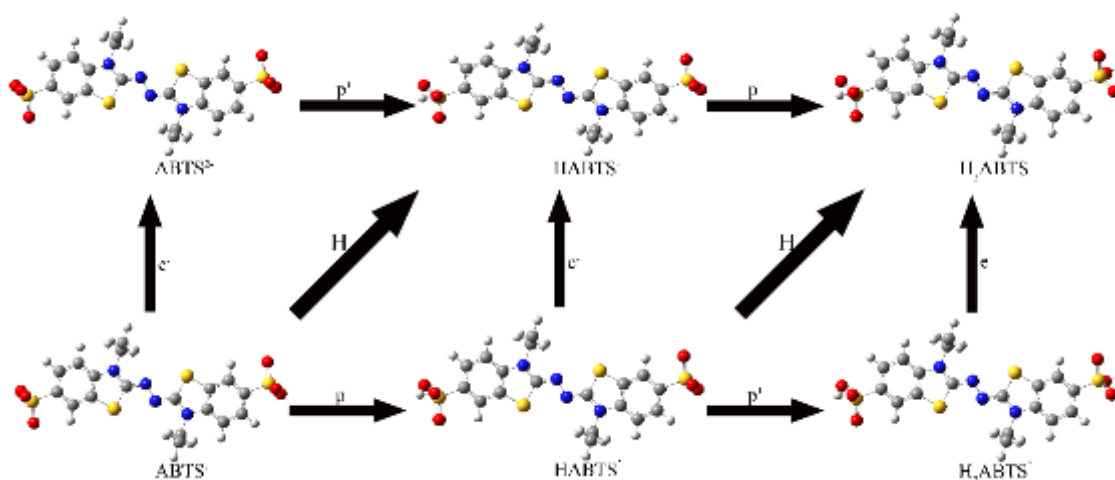
Tabela 19 Naelektrisanja i spinske gustine atoma značajnih za stabilnost H_2ABTS , $\text{ABTS}^{+\cdot}$ i ABTS^{2-} (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Atom	H_2ABTS	$\text{ABTS}^{+\cdot}$		ABTS^{2-}
	Naelektrisanje	Naelektrisanje	Spinska gustina	Naelektrisanje
N11	-0,471	-0,385	0,143	-0,479
C21	0,334	0,316	-0,025	0,332
S1	0,365	0,473	0,067	0,348
N13	-0,443	-0,332	0,255	-0,454
N14	-0,443	-0,332	0,255	-0,454
C22	0,336	0,316	-0,025	0,335
S2	0,364	0,474	0,067	0,351
N12	-0,471	-0,385	0,143	-0,479

Na osnovu prikazanih naelektrisanja i spinske gustine u tabeli 19 zaključeno je da nakon gubitka dva protona sa sulfatnih grupa nema promene naelektrisanja na atomima

azota i sumpora. U ovom delu molekula postoji delokalizacija elektronske gustine koja stabilizuje molekul i formirane anjone. Formiranjem radikala, spinska gustina je raspoređena duž niza atoma N11–C21–N13–N14–C22–N12, uz male promene naelektrisanja. Usled delokalizacije u molekulu struktura je stabilizovana.

U nastavku, slika 39, su prikazani mogući koraci u procesima prenosa elektrona, protona i atoma vodonika. Zbog eksperimentalnih uslova rada prodiskutovan je samo prvi deo slike, odnosno prelazak $ABTS^{+•}$ u $HABTS^{-}$. Reakcije su ispitane termodinamički dok su za procese prenosa elektrona određene konstatne brzina. Kao što je objašnjeno u delu Računarske metode, konstante brzina ovakvih procesa se mogu izračunati korišćenjem Markusove teorije. U rastvoru ova vrsta može postojati u nekoliko oblika koji zavise od pH vrednosti. Na slici 39 su date optimizovane strukture na različitim pH vrednostima. Termodinamički parametri reakcija su prikazani u tabeli 20.



Slika 39 ABTS vrste prisutne na različitim pH vrednostima (optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Prikazani rezultati u tabeli 20 ukazuju na konkurentnost HAT i SET-PT mehanizma zbog bliskih vrednosti promene entalpija za prvi korak procesa. Vrednosti ΔH_{PA} su više za 40 kJ/mol od ostala dva parametra. Značajno je primetiti da je, za razliku od ostalih ispitivanih radikalskih vrsta, SET-PT mehanizam, u ovom slučaju, termodinamički povoljan. U ispitivanju reakcija ABTS radikal-katjona ovaj mehanizam neće biti dalje diskutovan. Vrednost parametra ΔH_{IP} je za 5-7 kJ/mol veća od ΔH_{BDE} . Za molekule sa kateholnom strukturom vrednost parametara ΔH_{BDE} su oko 70 kJ/mol. Ukoliko se jedna hidroksilna grupa zameni metoksilnom grupom vrednosti ΔH_{BDE} su

veće za 15 kJ/mol. Kod tiramina i tirozina ΔH_{BDE} su 96 i 100 kJ/mol, respektivno. Za molekule koji nemaju hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu, fenilalanin i feniletilamin, ΔH_{BDE} parametar iznosi preko 125 kJ/mol. Drugi korak SET-PT mehanizma je termodinamički povoljan. Konstatne brzina prenosa elektrona za prvi korak SET-PT su takođe prikazane u tabeli 20.

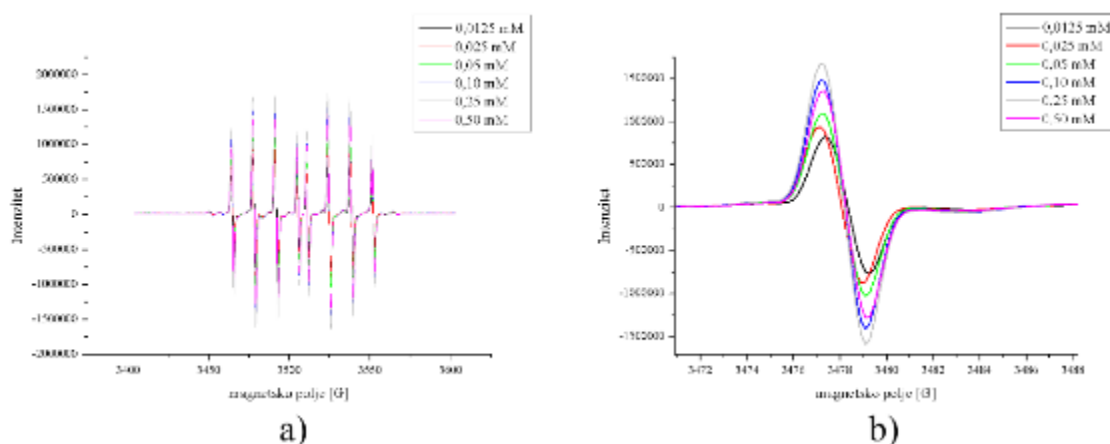
Tabela 20 Promena entalpije, u kJ/mol, reakcija odabranih molekula sa ABTS radikal-katjonom (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Molekul	HAT	SET-PT			SPLET	
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	k_{app} [$M^{-1}s^{-1}$]	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
DOPAC	75	82	$7,6 \times 10^{-3}$	-7	121	-35
L-DOPA	62	67	$6,1 \times 10^{-3}$	-5	113	-63
Epinefrin	73	78	$5,2 \times 10^{-2}$	-5	121	-37
Norepinefrin	75	79	$2,2 \times 10^{-2}$	-4	122	-36
Dopamin	72	74	$5,7 \times 10^{-1}$	-3	125	-42
Tiramin	96	93	$1,4 \times 10^{-4}$	2	140	-33
Tirozin	100	101	$1,4 \times 10^{-8}$	-2	138	-27
HVA	83	77	$1,4 \times 10^{-1}$	6	136	-42
Feniletilamin	139	99	/	40	/	/
Fenilalanin	125	129	/	/	/	/

Konstante brzina ispitivanih procesa su od 10 do $10^{-3} M^{-1} s^{-1}$ što je uporedivo sa eksperimentalnim podacima koji pokazuju da se reakcija sa ABTS radikal-katjonom završava do šestog minuta. Konstante brzina za prvi korak SET-PT mehanizma i termodinamički parametri za drugi korak istog mehanizma se mogu iskoristi za objašnjavanje eksperimentalnih TEAC vrednosti. Najreaktivniji molekuli, L-DOPA, DOPAC, epinefrin, norepinefrin i dopamin imaju konstante brzina koje dobro reprodukuju eksperimentalne rezultate i druge korake SET-PT mehanizma koji su egzotermni. Kod slabijih antioksidanasa entalpije procesa prenosa elektrona su endotermne i time uslovljavaju manju reaktivnost. Kod fenilalanina i feniletilamina reakcije su termodinamički nepovoljne, što je u saglasnosti sa eksperimentalnim rezultatima. Na osnovu prikazanih podataka, kinetičkih i termodinamičkih parametara, može se zaključiti da se redukcija ABTS radikal-katjona odvija putem SET-PT mehanizma.

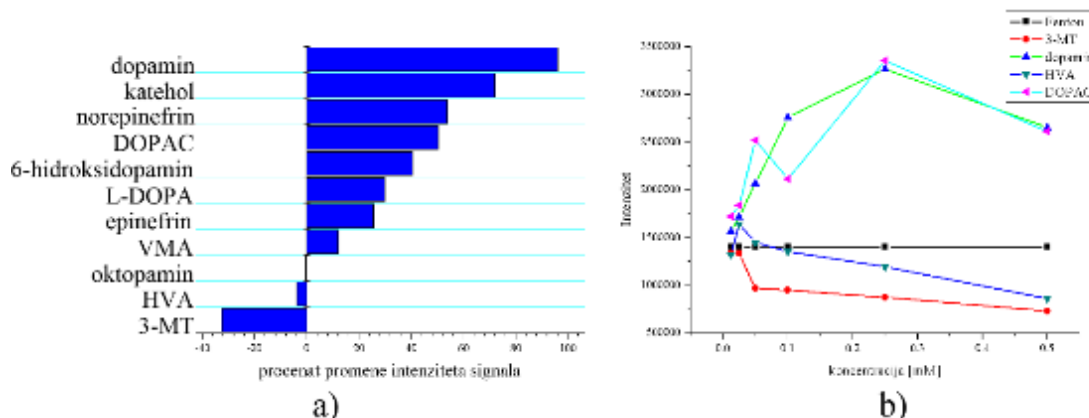
7.2.3. Hidroksi-radikal

Reakcije odabranih neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita sa hidroksi-radikalom su ispitivane EPR spektroskopijom. Za analizu su iskorišćeni dopamin, epinefrin, norepinefrin, DOPAC, L-DOPA, homovanilnska kiselina, 3-MT, VMA, katehol, oktopamin i 6-hidroksidopamin kako bi se detaljno prodiskutovao uticaj strukturnih parametara. Koncentracije ispitivanih supstanci su bile od 0,5 do 0,0125 mM. Na slici 40a su prikazani EPR spektri DEPMPO-OH^{*} adukta u rastvorima različitih koncentracija dopamina.



Slika 40 EPR spektar DEPMPO-OH^{*} adukta pri različitim koncentracijama dopamina, u drugom minutu od početka Fentonove reakcije a) ceo spektar i b) uvećan maksimum na 3478 G

Na osnovu prikazanog spektra može se zaključiti da visina signala adukta u drugom minutu zavisi kod količine prisutnog dopamina. Intenzitet signala raste do koncentracije dopamina od 0,1 mM nakon čega počinje da opada. Na slici 40b je prikazan uvećan najintenzivniji maksimum na manjim vrednostima magnetskog polja kako bi se bolje uočila promena intenziteta signala sa koncentracijom dopamina. U nastavku je dat grafički prikaz promene intenziteta signala adukta DEPMPO-OH^{*} prilikom dodavanja ispitivanih supstanci čija je koncentracija bila 0,1 mM. Promena intenziteta je računata kao odnos signala adukta pri dodatku supstance i čistog adukta. Visina signala je određena kao srednja vrednost visina dva najintenzivnija maksimuma na nižim vrednostima magnetskog polja. Pretpostavljeno je da ovako izračunata visina signala dobro reprodukuje površinu ispod signala.

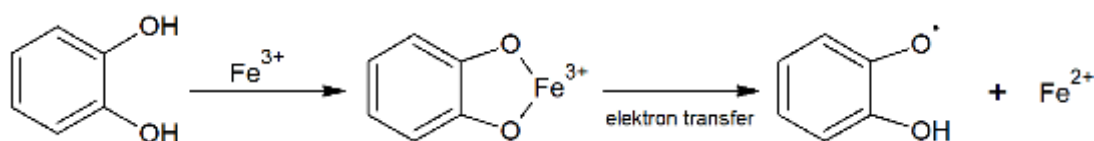


Slika 41 a) Promene srednjeg intenziteta signala DEPMPO-OH^{*} adukta u rastvorima ispitivanih supstanci koncentracije 0,1 mM b) Uporedni prikaz intenziteta signala DEPMPO-OH^{*} adukta u drugom minutu za različite koncentracije dodatih supstanci

Sa slike 41a se vidi da je promena srednjeg intenziteta signala DEPMPO-OH^{*} adukta različita kod svih ispitivanih supstanci. Povećanje intenziteta signala adukta je uočeno kod molekula sa kateholnom jedinicom kao što su: dopamin, katehol, norepinefrin, DOPAC, 6-hidroksidopamin, L-DOPA i epinefrin. Kod analoga ovih molekula koji imaju metoksilnu i hidroksilnu grupu postoji neznatno povećanje (VMA) ili smanjenje (3-MT i HVA) intenziteta signala adukta. U rastvoru oktopamina takođe postoji smanjenje signala. Uporedni prikaz intenziteta signala, slika 41b, pokazuje razliku u delovanju molekula sa i bez kateholne jedinice. U prvom delu grafika intenzitet signala DEPMPO-OH^{*} adukta raste sa porastom koncentracije dopamina i DOPAC-a, nakon čega dostiže zasićenje za koncentraciju analita od 0,1 mM. Daljim povećanjem koncentracije intenzitet signala adukta opada. Pretpostavka je da do kritične koncentracije glavni efekat predstavlja pro-oksidaciona aktivnost supstanci, odnosno mogućnost redukcije Fe(III). Dodatne količine dopamina i DOPAC-a počinju antioksidaciono da deluju prema formiranom hidroksi-radikalu što se manifestuje smanjenjem intenziteta signala adukta. HVA i 3-metoksitiramin pokazuju antioksidacionu aktivnost i pri manjim koncentracijama zbog smanjene mogućnosti kompleksiranja gvožđa, odnosno njegove redukcije.

U radu Melina (*Melin*) i saradnika [98] konstatovano je da se pri dodatku molekula kateholne strukture u Fentonovoj reakciji feri joni, Fe(III), redukuju do fero jona, Fe(II), prelaskom elektrona sa kateholne jedinice. U okviru teze, eksperimenti su izvođeni u

reakcionom sistemu bez pufera kako bi se isključile dodatne reakcije sa prisutnim radikalom. Određena pH vrednost ovakvog reakcionog sistema je bila 3,3. Na pH vrednostima ispod 5,5 pretpostavlja se formiranje bidentatnog mono-kompleksa, prvenstveno zbog helirajućeg efekta liganda. Zbog toga je potrebno dodatno ispitivanje na fiziološkim pH vrednostima kada je očekivano formiranje bis-kompleksa, u kojima se kateholamini ponašaju kao antioksidansi [98]. Mehanizam redukcije Fe(III) jona se može prikazati sledećom reakcijom:

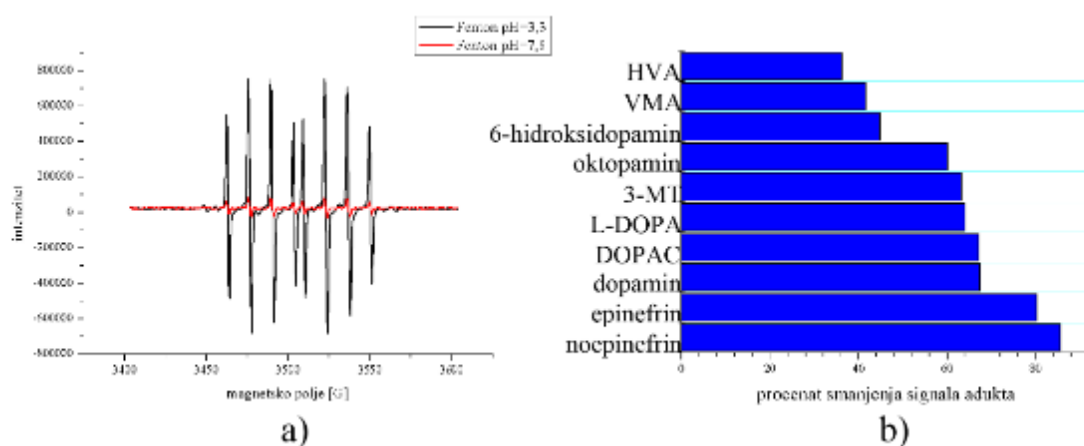


Slika 42 Mehanizam redukcije Fe(III) u prisustvu katehola

Na brzinu prenosa elektrona takođe utiču i ostale grupe na aromatičnom prstenu. Proces redukcije Fe(III) u reakciji sa ispitivanim jedinjenjima zavisi od uticaja supstituenta. Poređenjem promene konstante brzine nastanka hidroksi-radikala, za sisteme sa elektron-akceptorskim i elektron-donorskim grupama, sa Hametovim parametrima zaključeno je da se mehanizam najverovatnije menja zavisno od osobina grupe [97]. Isti autori [97] su predložili mogućnost građenja različitih kompleksa Fe(II) sa molekulima sa kateholnom strukturom. Pretpostavljeno je da molekuli sa hidroksilnom i metoksilnom grupom na aromatičnom prstenu mogu takođe graditi komplekse sa Fe(II) jonima, ali da su takvi kompleksi manje stabilni.

U fiziološkim uslovima kompleksiranje gvožđa iz proteina sa kateholaminima je favorizovano što može predstavljati jedan od načina aktiviranja gvožđa u Fentonovoj reakciji. Kako bi se ispitao uticaj pH vrednost eksperimenti su ponovljeni pri pH=7,8, što odgovara fiziološkim uslovima. Promena pH vrednosti nije zapažena nakon dodatka supstanci. Na slici 43a se uočava da je intenzitet adukta DEPMPO-OH[•] u Fentonovoj reakciji opada sa povećanjem pH vrednosti što ukazuje na važnost ovog parametra na prinos reakcije. Antioksidaciona aktivnost molekula je određena pri ukupnoj koncentraciji molekula od 0,5 mM. Procenat redukcije signala, izračunat kao relativno smanjenje intenziteta dva najintenzivnija maksimuma u čistoj Fentonovoj reakciji i nakon dodatka molekula, je prikazan na slici 43b. Najveći procenat redukcije, preko 80%, je određen za epinefrin i norepinefrin. Dopamin, DOPAC, L-DOPA imaju procenat

redukcije do 64%, što ih takođe karakteriše kao veoma reaktivne molekule prema ovom radikalu. U slučaju 6-hidroksidopamina je dobijen niži procenat redukcije najverovatnije zbog olakšane oksidacije ovog molekula i polimerizacije na višim pH vrednostima. Svi ispitivani metaboliti neurotransmitera, oktopamin, 3-MT, HVA i VMA pokazuju aktivnost od 36 do 63% redukcije. Ovakav rezultat dovodi do zaključka da i metaboliti lako stupaju u reakciju sa hidroksi-radikalom. Značaj kateholne grupe, ali i hidroksilnih grupa aromatičnog prstena i alifatičnog niza, je pokazan za antiradikalnu aktivnost prema hidroksi-radikalu.



Slika 43 Eksperimentalno ispitivanje reakcija sa hidroksi-radikalom a) poređenje intenziteta signala adukta DEPMPO-OH• u Fentonovoj reakciji pri različitim pH vrednostima i b) procenat smanjenja signala adukta DEPMPO-OH• u drugom minutu nakon dodatka supstanci ukupne koncentracije 0,5 mM

Antioksidaciona aktivnost odabranih supstanci prema hidroksi-radikalu je ispitana i teorijski prema opisanim mehanizmima. U tabeli 21 su date vrednosti termodinamičkih parametara samo za prethodno određeno najaktivnije mesto, hidroksilnu grupu u *p*-položaju u vodi.

Vrednosti prikazane u tabeli 21 ukazuju na činjenicu da je hidroksi-radikal veoma reaktivan u reakcijama sa ispitivanim molekulima. Ukoliko se uporede prikazane vrednosti sa vrednostima parametara za ostale radikale može se zaključiti da su reakcije sa hidroksi-radikalom termodinamički povoljnije. Parametar ΔH_{BDE} ima najnižu vrednost u odnosu na ostale parametre prvog koraka mehanizma, ΔH_{IP} i ΔH_{PA} . Vrednosti parametra ΔH_{BDE} su od -132 do -171 kJ/mol zavisno od broja hidroksilnih grupa na

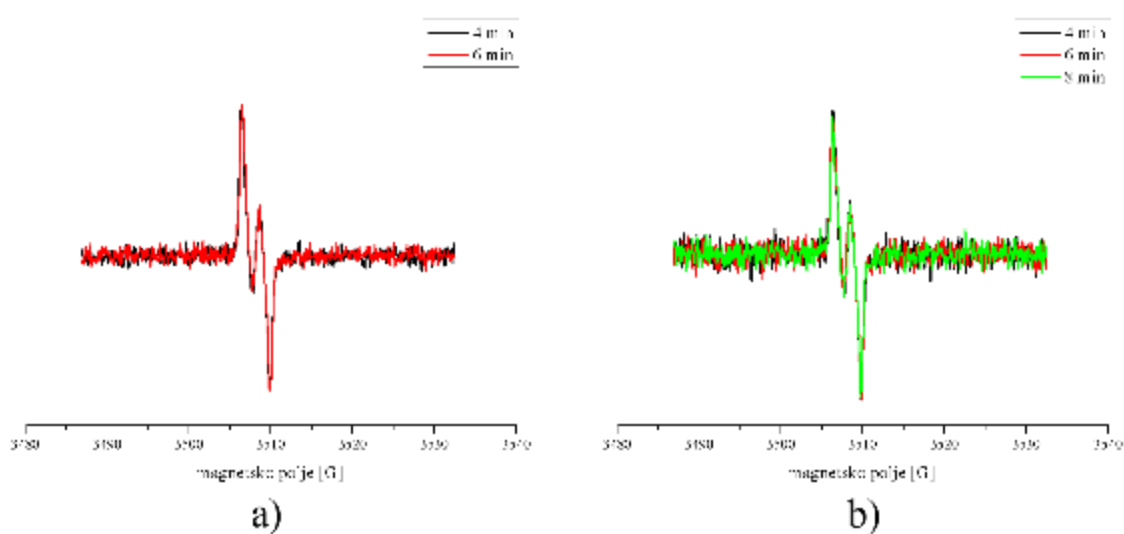
aromatičnom prstenu. Zbog građenja jake vodonične veze vrednost ΔH_{BDE} kod molekula sa kateholnom strukturom iznosi između -155,2 i -171,2 kJ/mol. Postojanje slabe vodonične veze u formiranom radikalu i anjonu je pokazano poređenjem sa oktopaminom kod koga postoji samo jedna hidroksilna grupa u *p*-položaju. Vrednosti potencijala jonizacije su između 15 i 49 kJ/mol, što ukazuje na mogućnost odigravanja ovog mehanizma prenosom elektrona sa molekula na radikal. Egzoternost drugog koraka je definisana afinitetom OH^- prema protonu. SPLET mehanizam je takođe termodinamički spontan ukoliko se uzmu u obzir parametri za oba koraka. Na osnovu vrednosti parametra ΔH_{PA} ispitivani molekuli se mogu podeliti na dve grupe. U prvu spadaju DOPAC, L-DOPA, dopamin, norepinefrin, epinefrin i katehol sa vrednostima ΔH_{PA} parametra od -67,7 do -72 kJ/mol. Drugu grupu čine preostali molekuli sa vrednostima ovog parametra u intervalu od -53 do -62 kJ/mol. Većina ispitivanih molekula ima više reakcionih mesta sa kojih bi reakcija bila moguća, među kojima su posebno značajne karboksilna grupa i hidroksilna grupa u *m*-položaju. Na osnovu vrednosti prikazanih u tabeli 21 zaključeno je da su reakcije spontane za HAT i SPLET mehanizme, ali da je potrebno odrediti i kinetičke parametre reakcija kako bi se dodatno ispitalo koji od dva mehanizma je dominantan.

Tabela 21 Vrednost termodinamičkih parametara, u kJ/mol, za reakciju odabranih supstanci sa hidroksi-radikalom (optimizovane na M062-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Molekul	Vodena sredina				
	HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
DOPAC	-156,7	30,7	-187,4	-71,9	-84,8
L-DOPA	-171,2	15,3	-186,5	-79,3	-91,9
Dopamin	-161,3	22,9	-184,2	-67,7	-93,6
Norepinefrin	-158,3	27,2	-185,5	-70,7	-87,6
Epinefrin	-159,6	26,6	-186,1	-70,9	-88,7
Katehol	-155,2	33,8	-189,0	-71,2	-84,0
HVA	-149,8	25,7	-175,5	-56,2	-93,5
VMA	-144,9	32,2	-177,1	-61,5	-83,4
3-MT	-154,3	18,4	-172,7	-52,9	-101,4
Oktopamin	-132,2	49,5	-181,6	-57,3	-74,8

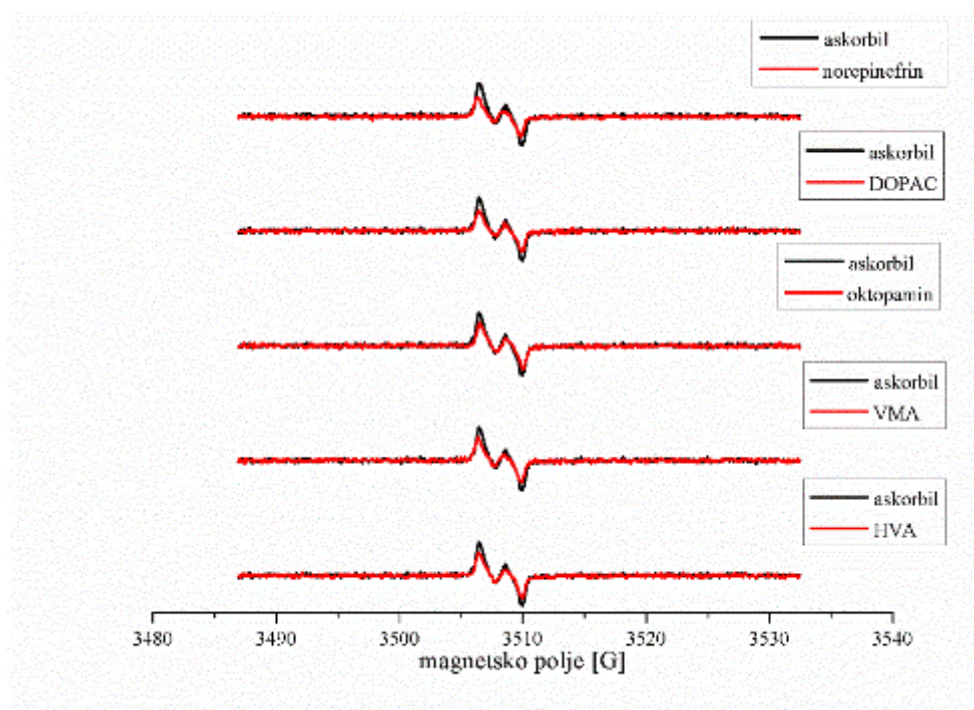
7.2.4. Askorbil-radikal

Biološki značaj askorbil-radikala je objašnjen u uvodnom delu teze. EPR spektroskopijom je praćena aktivnost odabranih supstanci prema ovom radikal. Na pH=7,4 određena količina askorbinske kiseline je prisutna u obliku askorbil-radikala. Zbog pretpostavljene brze reakcije neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita sa ovim radikalom, snimljeni su spektri rastvora čistog radikala nakon četvrtog i šestog minuta od pripreme. Ovi spektri su prikazani na slici 44a.



Slika 44 EPR spektar askorbil-radikala: a) u četvrtom i šestom minutu i b) nakon dodatka norepinefrina ($c=5 \times 10^{-3}$ M) u četvrtom, šestom i osmom minutu

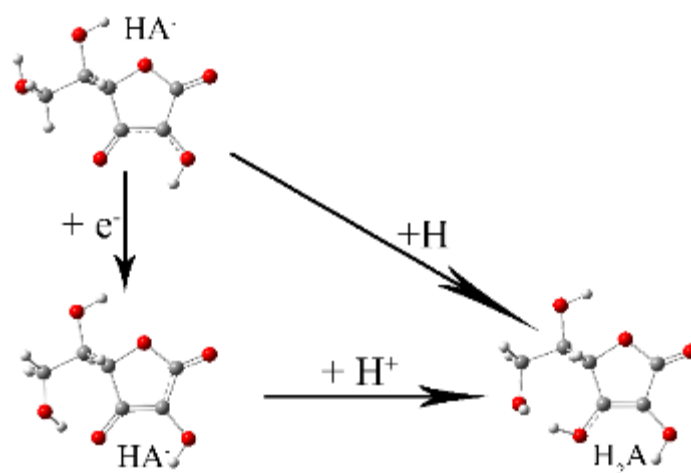
Na slici 44a se može uočiti da nema promene visine rezonantnih maksimuma u datom vremenskom okviru. Rastvori odabranih supstanci su pravljani tako da finalna koncentracija bude 5 mM kako bi se ispitaio uticaj različitih strukturnih parametara na aktivnost molekula. Pri dodatku supstanci nije bilo promene pH vrednosti rastvora, što je omogućilo poređenje njihovih spektara sa spektrom čistog askorbil-radikala. Spektri norepinefrina, snimljeni u četvrtom, šestom i osmom minutu, prikazani su na slici 44b. Prikazani spektri pokazuju da nema promene intenziteta u EPR spektru, odnosno da se reakcija između norepinefrina i prisutnog askorbil-radikala odvija u toku prva četiri minuta od početka reakcije. Isto ponašanje je uočeno i kod ostalih molekula. Na slici 45 su date relativne visine signala askorbil-radikala prilikom dodatka norepinefrina, DOPAC-a, oktopamina, VMA i HVA.



Slika 45 EPR spektri askorbil-radikala nakon dodatka odabranih supstanci

Na osnovu prikazanih spektara jasno je da postoji relativno smanjenje intenziteta signala prilikom dodatka supstanci, odnosno da svi odabrani molekuli redukuju radikal do askorbinske kiseline. Procenat redukcije radikala je sledeći: 35% za norepinefrin, 34% za DOPAC, 27% za VMA i HVA i 23% za oktopamin. Na osnovu reaktivnosti molekuli se mogu podeliti u dve grupe. Prvu grupu čine molekuli koji imaju kateholnu strukturu, za koju je i prethodno pokazano da je važan parametar aktivnosti. DOPAC se od norepinefrina razlikuje u karboksilnoj grupi na alifatičnom nizu i odustvu hidroksilne grupe. Na pH=7,4 većina molekula DOPAC-a je deprotonovana i zbog toga ova grupa nije značajan donor atoma vodonika, odnosno protona. Zbog toga aktivnost DOPAC-a i norepinefrina zavisi samo od prisustva kateholne strukture, što čini njihove aktivnosti uporedivim. Molekuli sa jednom hidroksilnom grupom (oktopamin) ili jednom hidroksilnom i jednom metoksilnom grupom (HVA i VMA) imaju za 10% manju redukciju. Rezultati za ova tri molekula takođe pokazuju da nema značajnog doprinosa karboksilne grupe u antiradikalskoj aktivnosti ovih molekula. Prisustvo hidroksilne grupe na alifatičnom nizu norepinefrina, oktopamina i VMA takođe ne predstavlja reaktivno mesto, najverovatnije zbog mogućnosti građenja jakih intramolekulskih vodoničnih veza sa deprotonovanom karboksilnom ili amino grupom.

Mogući mehanizam reakcija odabranih molekula prema askorbil-radikalu detaljnije je teorijski ispitan. U većini dosadašnjih teorijskih studija ispitivana je antiradikalska aktivnost askorbinske kiseline i mogući reakcioni mehanizmi, prema jednačinama 14-19. U ovom radu su nastabilniji konformeri askorbinske kiseline, askorbil-radikala i anjona preuzeti iz rada Tua (*Tu*) i saradnika [294]. Na slici 46 prikazani su mogući koraci u reakciji askorbil-radikala sa molekulima sa antiradikalском aktivnošću kao i optimizovne strukture vrsta nastalih od radikala u svakom koraku. Parametri reakcije ispitivanih molekula su dati za vodu, kako bi se objasnili eksperimentalno dobijeni rezultati, kao i za pentiletanoat, koji se koristi za opisivanje lipidne sredine [184,187]. Vrednosti termodinamičkih parametara za ispitivane molekule su prikazane u tabeli 22 (dopamin, L-DOPA, norepinefrin, VMA, HVA i oktopamin). Teorijski proračuni su dopunjeni podacima za L-DOPA i dopamin, iako eksperimentalni podaci za date molekule nisu dostupni kako bi se vrednosti parametara uporedile sa ostalim molekulima. Vrednosti termodinamičkih parametara se odnose na najreaktivnije mesto, hidroksilnu grupu u *p*-položaju.



Slika 46 Mogući mehanizmi prevođenja askorbil-radikala u askorbinsku kiselinu (strukture optimizovane na M062x/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 22 moguće je prodiskutovati termodinamički najpovoljniji mehanizam. Ukoliko se uporede vrednosti promene entalpije reakcija za prvi korak u svakom mehanizmu jasno je da je HAT mehanizam najverovatniji. Vrednost ΔH_{BDE} je negativna ili bliska nuli za L-DOPA, DOPAC,

dopamin i norepinefrin u oba rastvarača. Kod molekula bez kateholne strukture (HVA i VMA) ΔH_{BDE} parametar u vodi je oko 17 kJ/mol, dok je kod oktopamina 30,5 kJ/mol. Dobijeni rezultat ukazuje na značaj kateholne jedinice i pri reakciji sa askorbil-radikalom. Vrednosti ΔH_{IP} su od 59 do 93 kJ/mol zbog smanjene delokalizacije u formiranim radikal-katjonima, dok su vrednosti prilikom prenosa protona negativne. Prvi korak SPLET mehanizma je povoljniji od prvog koraka SET-PT mehanizma, ali i dalje mnogo manje povoljan od HAT mehanizma. U lipidnoj sredini, modelovanoj korišćenjem pentiletanoata, HAT je takođe termodinamički najpovoljniji. Dobijeni rezultat bi mogao da ukaže na mogućnost redukcije askorbil-radikala u mozgu od strane neurotransmitera, odnosno na mogućnost formiranja hinona i semihinona koji učestvuju u formiranju plaka kod Parkinsonove bolesti. Iako askorbinska kiselina ima zaštitnu antiradikalisku ulogu ona u daljim reakcijama sa prisutnim molekulima može ispoljavati pro-oksidaciono dejstvo i učestvovati u razvoju bolesti. Vrednosti termodinamičkih parametara za HAT mehanizam za VMA, HVA i oktopamin su oko 30 kJ/mol. Rezultati pokazuju da su prvi koraci u SET-PT i SPLET mehanizmu nepovoljniji u odnosu na procese u vodi, najverovatnije zbog smanjenje stabilizacije dobijenih struktura usled interakcija sa rastvaračem.

Tabela 22 Vrednosti promene entalpije, u kJ/mol, za reakcije odabranih molekula i askorbil-radikala (optimizovanih na M062x/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Molekul	Vodena sredina					Pentiletanoat				
	HAT	SET-PT		SPLET		HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
L-DOPA	-8,5	59,3	-67,9	39,3	-47,9	1,6	178,7	-177,1	61,8	-60,2
DOPAC	5,9	74,7	-68,8	46,8	-40,9	1,4	172,9	-171,4	66,5	-65,1
Dopamin	1,3	66,7	-65,5	50,9	-49,6	-2,1	162,6	-164,8	68,7	-70,8
Norepinefrin	4,4	71,2	-66,8	48,0	-43,6	-0,02	162,5	-162,5	71,1	-71,1
VMA	17,7	76,1	-58,4	57,1	-39,4	28,3	166,8	-138,3	101,2	-72,9
HVA	12,9	69,7	-56,8	62,4	-49,6	25,4	160,2	-134,8	111,8	-86,5
Oktopamin	30,5	93,5	-63,5	61,3	-30,8	30,5	182,3	-151,8	97,0	-66,6

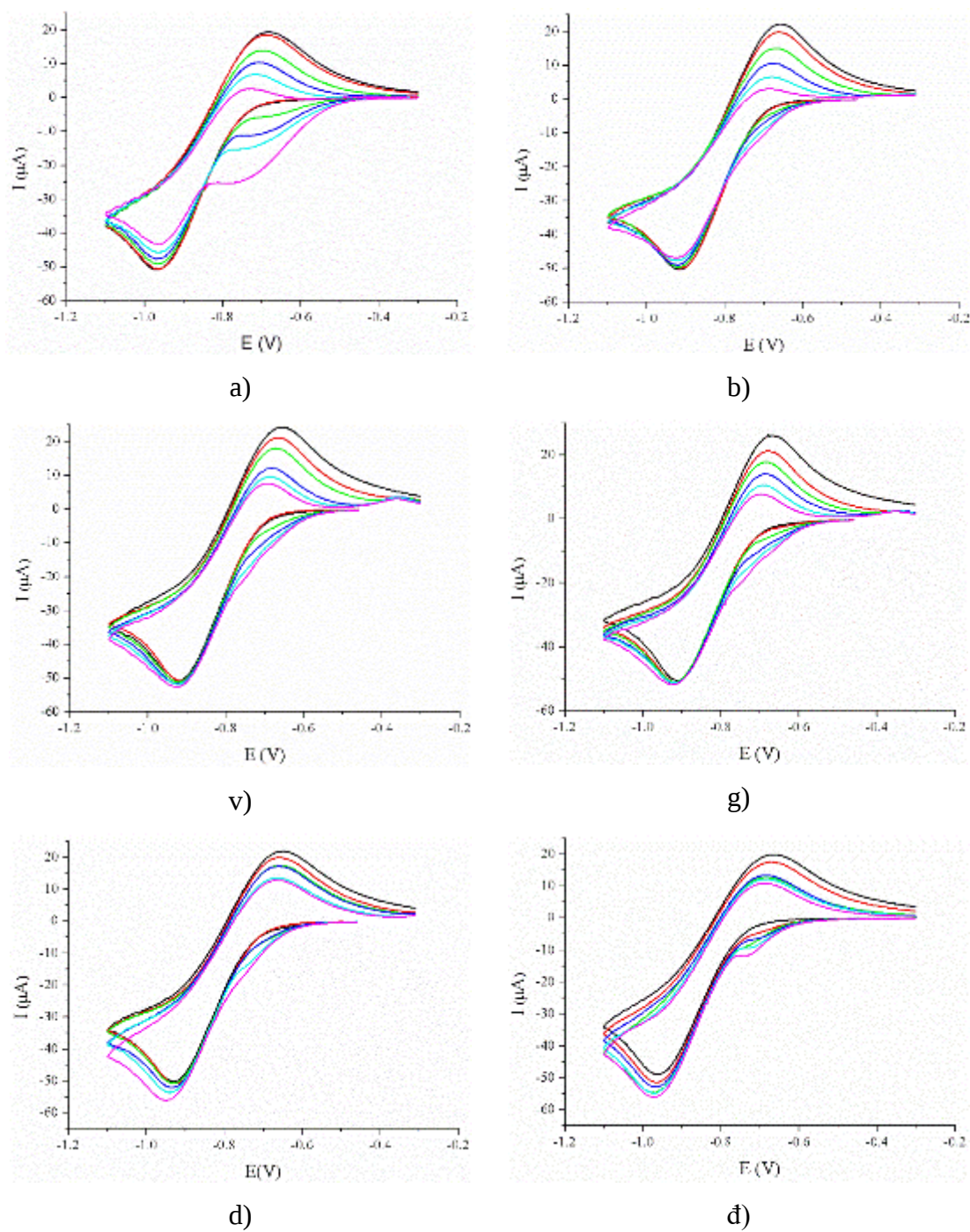
Niske vrednosti ΔH_{PDE} (tabela 22) objašnjene su stabilizacijom strukture askorbinske kiseline kada se elektron prenese na radikal i nastane anjon. Na osnovu slike 46 uočava se da u formiranom anjonu postoji vodonična veza, između hidroksilne grupe lanca sa kiseonikom petočlanog prstena, koja dodatno stabilizuje strukturu i time smanjuje promenu entalpije. Iako je na osnovu strukture askorbil-anjona evidentno da će postojati delokalizacija dominantan reakcioni put je prenos atoma vodonika.

7.2.5. Superoksid radikal-anjon

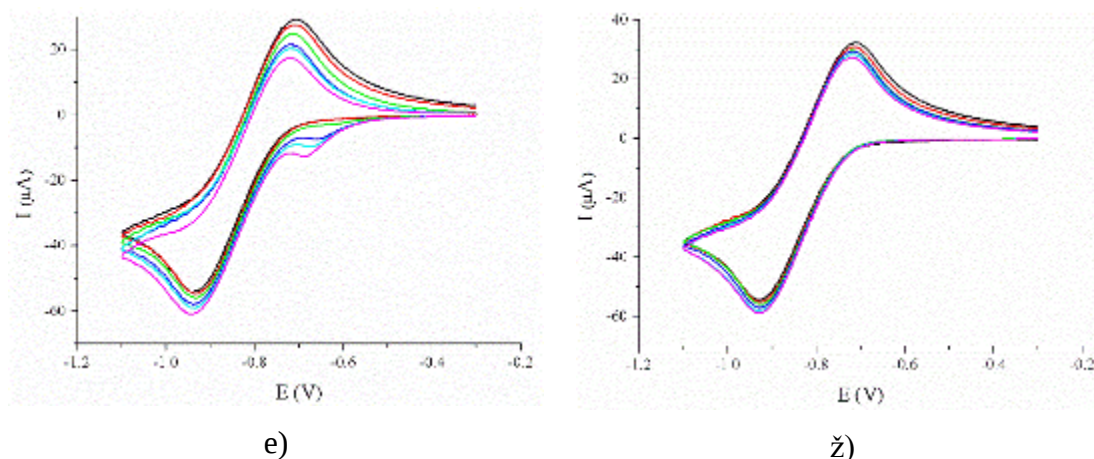
Antiradikalska aktivnost odabranih kateholamina je ispitana, cikličnom voltametrijom, i prema superoksid radikal-anjonu. Dopamin, norepinefrin, DOPAC, 6-hidroksidopamin, HVA, tiramin, oktopamin i 3-MT su odabrani kako bi se dobio uvid u značaj različitih strukturnih parametara za proces redukcije radikala. Sva merenja su urađena u DMSO kako bi se sprečilo disproporcionisanje dobijenog radikal-anjona. U nastavku su prikazani ciklovoltamogrami (CV) dobijeni sa povećanjem koncentracije odabranih supstanci (slika 47 i 47a).

Na ciklovoltamogramima se uočava da sa povećanjem koncentracije aktivne supstance dolazi do smanjenja struja i katodnog i anodnog maksimuma, ali da je smanjenje izraženije kod anodnog maksimuma. Redukcijom molekulskog kiseonika nastaje superoksid radikal-anjon, dok se u toku anodnog procesa ova vrsta redukuje do O_2 . Sa povećanjem koncentracije molekula koji imaju antiradikalske osobine smanjuje se količina prisutnog $O_2^{\cdot-}$. Svi ciklovoltamogrami, sem prilikom dodatka tiramina, pokazuju i pojavu predmaksimuma. U radu Renea (*René*) i saradnika prodiskutovano je da je pojava pred-maksimuma u ciklovoltamogramima odlika dobrih antioksidanasa polifenolne strukture [295], što, u ovom slučaju, karakteriše sve ispitivane supstance sem tiramina (slika 47). Kod 6-hidroksidopamina je ova promena najizraženija, sa dobro definisanim maksimumom.

Kao mera antiradikalske aktivnosti ispitivanih supstanci uzeta je brzina opadanja površine anodnog maksimuma sa povećanjem koncentracije ispitivanih supstanci [208,209]. Kako bi se normirale vrednosti površina ispod maksimuma, na grafiku za određivanje brzine prikazane su površine anodnih maksimuma ($Q_{a,o}$) podeljenje površinama ispod katodnih ($Q_{a,HA}$) (slika 48). Vrednosti nagiba su date u tabeli 23. Prema podacima iz tabele 23 može se zaključiti da odabrani molekuli pokazuju različitu aktivnost prema $O_2^{\cdot-}$. Molekuli DOPAC i 6-hidroksidopamin imaju najveću vrednost nagiba, od $57 \times 10^{-2} M^{-1}$ i $52 \times 10^{-2} M^{-1}$, što je u saglasnosti sa ostalim testovima antiradikalske aktivnosti. Dopamin i norepinefrin imaju iste vrednosti nagiba, $50 \times 10^{-2} M^{-1}$, što takođe ukazuje na istu aktivnost prema superoksid radikal-anjonu.



Slika 47 Ciklovoltamogrami redukcije O_2 u 0,1 M rastvoru Bu_4NPF_4 u DMSO sa sledećim koncentracijama (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 i 1,5 mM) 6-hidroksidopamina, b) DOPAC-a, v) dopamina, g) norepinefrina, d) HVA, đ) 3-MT

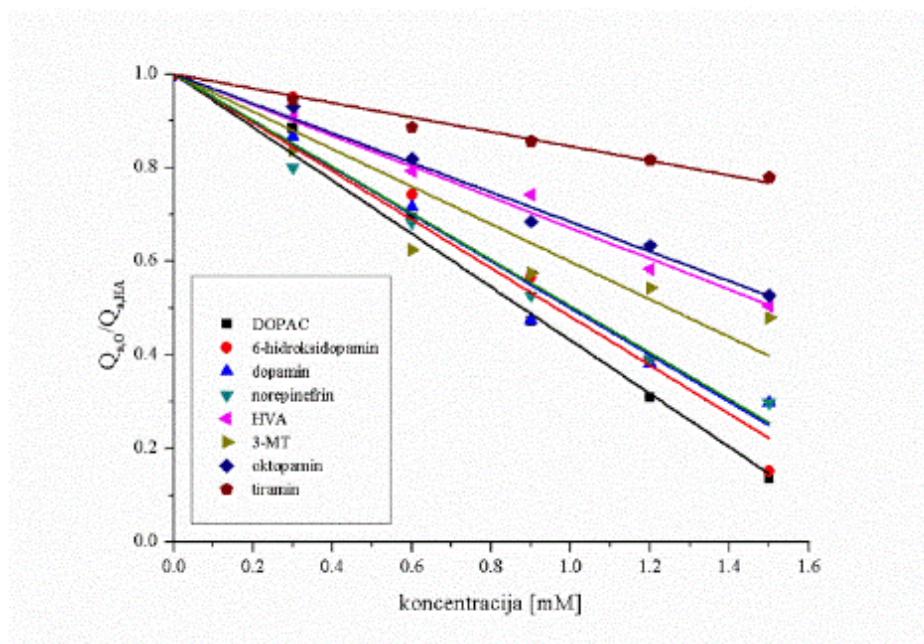


Slika 47a Ciklovoltamogrami redukcije O_2 u 0,1 M rastvoru Bu_4NPF_4 u DMSO sa sledećim koncentracijama (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 i 1,5 mM) e) oktopamina i ž) tiramina

Tabela 23 Vrednosti nagiba krivih zavisnosti $Q_{a,o}/Q_{a,HA}$ od koncentracije dodatih antioksidanasa

Molekul	Nagib [$\times 10^{-2} M^{-1}$]
DOPAC	(57 ± 2)
6-hidroksidopamin	(52 ± 3)
Dopamin	(50 ± 2)
Norepinefrin	(50 ± 2)
HVA	(33 ± 1)
3-MT	(40 ± 4)
Oktopamin	(32 ± 1)
Tiramin	$(15,5 \pm 0,6)$

Evidentno je i kod ovih molekula da dodatna hidroksilna grupa na alifatičnom nizu nema značajnijeg uticaja na aktivnost ni prema ovom radikalu. Ukoliko se uporede vrednosti relevantnih parametara za dopamin i 6-hidroksidopamin može se zaključiti da treća hidroksilna grupa na aromatičnom prstenu takođe ne menja značajno aktivnost molekula. Smanjenjem broja hidroksilnih grupa na prstenu i uvođenjem metoksilne grupe aktivnost se značajno smanjuje.



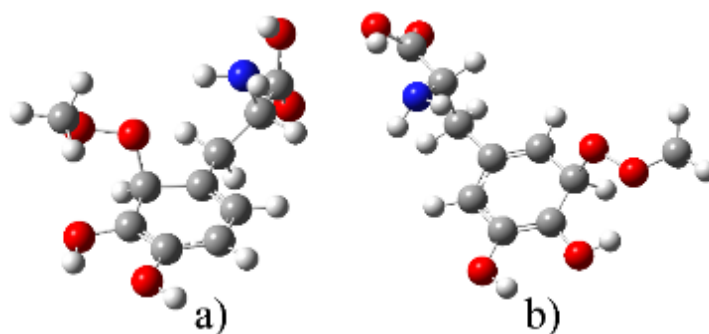
Slika 48 Zavisnost odnosa $Q_{a,0}$ i $Q_{a,HA}$ za različite koncentracije ispitivanih supstanci

Ovi rezultati su u saglasnosti sa određenom antiradikalskom aktivnošću prema DPPH i ostalim radikalima, tako da 3-MT i HVA imaju vrednost nagiba oko $30 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}$. Smanjenje broja hidroksilnih grupa, u slučaju tiramina u odnosu na dopamin, takođe dodatno smanjuje aktivnost oko tri puta. Aktivnost oktopamina je takođe manja od norepinefrina. Vrednosti nagiba za DOPAC, 6-hidroksidopamin, dopamin i norepinefrin su manje od istog parametra za kvercetin, fisetin i baikalein, koji predstavljaju dobre antioksidanse polifenolne strukture. Ovakav rezultat omogućava da se aktivnost poveže sa jednostavnijim strukturnim elementom kao što je kateholna jedinica, a ne sa složenom konjugovanom struktura [208,296].

7.2.6. Hlorovani metilperoksi-radikali

Reakcije kateholamina, njihovih prekursora i metabolita sa metilperoksi- (MP), hlorometilperoksi- (CMP), dihlormetilperoksi- (DMP) i trihlormetilperoksi-radikalima (TMP) su takođe teorijski ispitane. Svi reaktanti i proizvodi su optimizovani na M062-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije, dok je korišćeni model rastvarača bio SMD. Fukui funkcije su, kao što je opisano u Računarskim metodama, iskorišćene kako bi se odredila najverovatnija mesta reakcije za dobijanje radikal-adukta. Vrednosti Fukui funkcija za odabrane atome svakog od ispitivanih molekula su date u delu Dodatak (tabela S8).

Rezultati pokazuju da su najverovatnija mesta radikalskog napada *o*-ugljenikov atom (označen kao C1) i *m*-ugljenikov atom (označen kao C4) sa druge strane alifatičnog lanca. Ova dva položaja su ispitvana u nastavku i radikal-adukti optimizovani na datom nivou teorije. Strukture radikal-adukta molekula L-DOPA su prikani na slici 49 u nastavku. Na osnovu termodinamičkih parametara zaključeno je da su adukti formirani na položaju 4 stabilniji (tabela S9). Date vrednosti termodinamičkih parametara su korišćene za dalju analizu i diskusiju.



Slika 49 Strukture radikal-adukta između metilperoksi-radikala i molekula L-DOPA na položajima a) C1 i b) C4 (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Termodinamički parametri reakcija između dopamina i radikala u vodi, prema jednačinama 25-29 i 31, su prikazani u tabeli 24. Niže vrednosti termodinamičkih parametara prikazuju povoljniji reakcioni put.

Iako se spontanost reakcija prati preko promena Gibsove slobodne energije u daljem tekstu će se spontanost reakcija pratiti preko promene entalpije reakcija iz razloga

male razlike u izračunatim promenama Gibsove slobodne energije i entalpije. Prema rezultatima prikazanim u tabeli 24 može se zaključiti da svi predloženi mehanizmi daju endoterme reakcije (sem u slučaju formiranja radikal adukta sa MP i CMP), pri čemu tačna vrednost parametra zavisi i od oba reaktanta. Vrednosti parametra za HAT mehanizam pokazuju da sa porastom stepena hlorovanja metil-grupe raste i egzotermnost reakcije, pri čemu su razlike u promeni entalpije reakcije sa MP i TMP oko 40 kJ/mol. Treba istaći da je prvi korak SPLET mehanizma povoljan za MP i CMP, dok sa porastom stepena hlorovanja vrednost parametra ΔH_{PA} raste, što čini ovaj mehanizam termodinamički nepovoljnim. Stepem supstituisanosti metil-grupe hlorovim atomima značajno utiče na promenu entalpija reakcija sa dopaminom po RAF mehanizmu (od 29 do -19 kJ/mol). Kada se uporede vrednosti za parametre ΔH_{RAF} , ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} i ΔH_{PA} može se zaključiti da MP reaguje sa dopaminom i preko HAT i preko SPLET mehanizma. Sa povećanjem broja hlorovih atoma na metil-grupi HAT mehanizam postaje dominantan. Zbog ovakve promene posebno su ispitane reakcije prenosa elektrona u nastavku ovog odeljka.

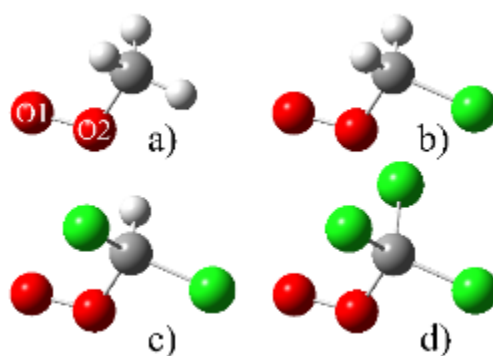
Tabela 24 Vrednosti termodinamičkih parametara, u kJ/mol, za reakciju između dopamina i hlorovanih metilperoksi-radikala (optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

	Vodeni rastvor					
	RAF	HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{RAF}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
MP	29	-24	120	-144	-29	5
CMP	0	-34	89	-123	-8	-26
DMP	-4	-53	51	-104	12	-65
TMP	-19	-63	27	-90	25	-88

NBO analiza radikala

Prema Bentovom pravilu s-karakter je skoncentrisan u orbitalama koje su usmerene prema eletropozitivnim supstituentima [297]. U slučaju ispitivanih radikala ugljenik je elektropozitivniji od hlora što ukazuje da veze između hlora i ugljenika imaju veći s-karakter oko atoma hlora, odnosno veći p-karakter oko atoma ugljenika u CMP, DMP i TMP. Dužine veza i uglovi su u ovim jedinjenjima pod uticajem s-karaktera

usmerenog prema hlorovim atomima. Veći *p*-karakter oko ugljenikovog atoma u ovim jedinjenjima jača veze ugljenik-hlor u poređenju sa vezama u ugljen-tetrahloridu. Prosečna dužina veza u molekulima CMP, DMP i TMP su 1,763, 1,759 i 1,753 Å respektivno. Kao što se može videti na osnovu dužine veza, sa povećanjem broja Cl atoma raste i jačina veze između atoma C i Cl. Različita reaktivnost radikala je objašnjena dalje NBO analizom radikala. Spinska gustina i raspored naelektrisanja na kiseonikovim atomima su dati u tabeli 25. Slika 50 pokazuje položaje atoma O1 i O2 i optimizovane strukture radikala.



Slika 50 Strukture ispitivanih radikala a) metilperoksi- (MP), hlorometilperoksi- (CMP), dihlorometilperoksi- (DMP) i trihlorometilperoksi- (TMP) (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Tabela 25 Spinska gustina i raspored naelektrisanja na kiseonikovim atomima u strukturi radikala (optimizovanih na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

	Spinska gustina		Naelektrisanje	
	O1 ¹	O2	O1	O2
MP	0,66	0,34	-0,22	-0,16
CMP	0,70	0,30	-0,17	-0,19
DMP	0,73	0,27	-0,13	-0,20
TMP	0,75	0,24	-0,10	-0,22

¹O1 predstavlja kiseonikov atom koji nije direktno veza za metil-grupu, dok je O2 kiseonikov atom direktno vezan za metil-grupu.

Spinska gustina i raspored naelektrisanja na kiseonikovim atomima se uniformno menjaju sa dodatkom Cl. Najelektronegativniji atom kiseonika je O1 kod molekula MP . Sa povećanjem broja hlorovih atoma naelektrisanje na atomu kiseonika O1 opada,

odnosno pomera ka drugom kiseonikovom atomu zbog dodatka elektronegativnih supstituenata. Isti trend se može uočiti kod promene spinske gustine. Rezultati iz tabele 25 pokazuju da reaktivnost radikalske vrste raste sa povećanjem broja Cl atoma zbog jakog induktivnog efekta i nedostatka elektrona u drugim delovima molekula. Spinska gustina je lokalizovana na kiseonikovom atomu daljem od metil-grupe, što ga čini najreaktivnijim atomom u molekulu. Promena spinske gustine i naelektrisanja nije velika, koliko bi se moglo očekivati, što je objašnjeno udaljenošću O1 i Cl atoma. Kada se uporede rezultati dobijeni NBO analizom dolazi se do zaključa da je reaktivnost radikala posledica i spinske gustine i raspodele naelektrisanja, koji mogu uticati na različite mehanizme antiradikalske aktivnosti kateholamina i njihovih metabolita, kao što se uočava u prethodnom poglavlju.

Uticaj strukturnih parametara na aktivnost molekula prema hlorovanim metilperoksi-radikalima

Termodinamički parametri reakcija ispitivanih molekula prema metilperoksi- i trihlormetilperoksi-radikalima su dati u tabelama 26 i 27. Ova dva radikala su odabrana kako bi se analizirale reakcije prema dva radikala koji pokazuju najveće strukturne razlike. Rezultati za druga dva radikala su dati u tabelama S10 i S11. Na osnovu podataka iz tabela 26 i 27 može se zaključiti da su ukupne reakcije prema radikalima u većini slučajeva egzotermne uz postojanje manjih varijacija u povoljnosti određenih mehanizama. Ukoliko se uporede vrednosti promena entalpija za formiranje radikal-adukta uočava se da je samo formiranje radikal-adukata sa MP endoterman proces, a da dolazi do promene znaka promene entalpije sa dodatkom hlorovih atoma. Rezultati pokazuju da je najreaktivniji molekul L-DOPA sa vrednošću BDE koja je 20 kJ/mol manja u odnosu na vrednost istog parametra za HVA. Formiranje intramolekulske vodonične veze nakon nastanka radikala antiradikalske vrste je jedan od razloga nižih vrednosti termodinamičkih parametara molekula sa kateholnom strukturom. Promena entalpije za prvi korak SPLET mehanizma je uporediva sa BDE vrednostima za ispitivane molekule i treba imati u vidu da je prenos protona brz proces i nikada nije limitirajući faktor. Ovo je posebno očekivano u polarnim rastvaračima u kojima je nastanak jonskih vrsta povoljan proces [184]. U sledećem delu je, sa mehanističkog stanovišta, dodatno

prodiskutovana povoljnost SPLET mehanizma. Najmanje povoljan mehanizam je SET-PT sa ΔH_{IP} vrednostima koje su oko 120 kJ/mol.

Tabela 26 Promena entalpije, u kJ/mol, za reakciju odabranih kateholamina i njihovih metabolita sa MP (*p*-OH, optimizovano na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Molekul	MP					
	RAF	HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{RAF}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
3-MT	29	-17	116	-133	-15	-3
HVA	39	-13	123	-136	-18	5
DOPAC	33	-20	128	-148	-34	12
Dopamin	29	-24	122	-146	-29	5
Katehol	39	-18	131	-149	-33	15
Epinephrin	39	-22	124	-146	-32	10
Norepinephrin	31	-21	125	-146	-32	11
L-DOPA	24	-34	113	-147	-41	7

Ukoliko se analiziraju rezultati sa TMP radikalom, tabela 27, može se zaključiti da se najpovoljniji mehanizam menja. Vrednosti ΔH_{BDE} su mnogo niže od vrednosti ΔH_{IP} i ΔH_{PA} , oko 40 kJ/mol, što ukazuje na to da je HAT najpovoljniji mehanizam. U suprotnosti sa prethodno ispitivanim radikalom, vrednosti za ΔH_{IP} i ΔH_{PA} su skoro jednake i pozitivne. Prema Bel-Evans-Polanijevom (*Bell-Evans-Polanyi*) principu reakcije koje su endotermne se ne dešavaju značajnom brzinom. Vrednosti parametra ΔH_{BDE} su manje za molekule koji sadrže kateholnu jedinicu, na primer L-DOPA. Dopamin, epinefrin i norepinefrin u reakciji sa TMP imaju vrednost promene entalpije reakcije koje su skoro jednake, što podržava eksperimentalne podatke o njihovoj sličnoj antiradikalnoj aktivnosti [179,204,287]. RAF mehanizam postaje sve značajniji sa dodatkom hlorovih atoma pri čemu su vrednosti termodinamičkih parametara koje opisuju ovaj mehanizam i dalje više od vrednosti za HAT. Zbog toga se može zaključiti da RAF ne predstavlja značajan mehanizam za ovaj model sistem i neće biti diskutovan u nastavku.

Na osnovu podataka prikazanih u tabelama 26 i 27 nije moguće jednostavno proceniti redosled aktivnosti ispitivanih jedinjenja zbog toga što su vrednosti termodinamičkih parametara vrlo bliske. Ovo ukazuje na to da korišćenje samo

termodinamičkih parametara za predviđanje aktivnosti može biti dvosmisleno. Prilikom analize u ovom slučaju treba imati u vidu i da molekuli sa kateholnom jedinicom mogu donirati vodonikov atom sa obe hidroksilne grupe. Raskidanje veze između vodonika i kiseonika sa ove grupe je dodatno ispitano a rezultati su prikazani u tabeli 28.

Tabela 27 Promena entalpije, u kJ/mol, za reakciju odabranih kateholamina i njihovih metabolita sa TMP (*p*-OH, strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Molekul	TMP					
	RAF	HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{RAF}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
3-MT	-20	-56	23	-79	40	-96
HVA	-9	-51	30	-81	37	-88
DOPAC	-9	-59	35	-94	22	-81
Dopamin	-19	-63	27	-90	25	-88
Katechol	-1	-57	38	-95	22	-79
Epinephrin	-7	-61	31	-92	22	-83
Norepinephrin	-13	-60	31	-91	22	-82

Tabela 28 Promena entalpije, u kJ/mol, za reakciju odabranih kateholamina i njihovih metabolita sa MP i TMP (*m*-OH, strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Molekul	MP					TMP				
	HAT	SET-PT		SPLET		HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{RAF}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{RAF}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}
DOPAC	-19	128	-148	-33	14	-58	35	-93	21	-79
Dopamin	-19	120	-139	-31	12	-58	27	-85	24	-81
Katechol	-18	131	-149	-33	15	-57	38	-95	22	-79
Epinephrin	-20	124	-144	-33	13	-59	31	-90	21	-80
Norepinephrin	-18	125	-142	-32	14	-56	32	-88	22	-79
L-DOPA	-31	113	-144	-42	11	-70	20	90	12	-82

Entalpije reakcija prikazane u tabeli 28 pokazuju da hidroksilna grupa u *m*-položaju u odnosu na alifatični niz takođe predstavlja značajno mesto za reakciju sa hlorovanim metilperoksi-radikalima pri čemu su vrednosti parametara uporedive sa hidroksilnom grupom u *p*-položaju. Vrednosti termodinamičkih parametara pokazuju da

su reakcije sa ovom grupom i dalje povoljnije nego u slučaju kada molekuli poseduju samo jednu hidroksilnu grupu, što dodatno potvrđuje važnost intramolekulske vodonične veze za stabilnost radikala i anjona. Kada se uporede vrednosti za ΔH_{PA} sa vrednostima iz tabela 26, 27 i 28 zaključuje se da su ovi položaji konkurentski i da se promena entalpije razlikuje za samo 1 kJ/mol. Za reakcije koje se dešavaju putem HAT mehanizma povoljniji je reakcioni put koji ide preko *p*-OH grupe zbog niže vrednosti ΔH_{BDE} . Iako je pokazano da je *m*-OH grupa značajna za antiradikalnu aktivnost kinetička ispitivanja, prikazana u narednom delu, su urađena samo za grupu u *p*-položaju iz razloga povoljnijeg reakcionog puta preko datog položaja. Međutim, ukupni rezultati za termodinamičke parametre ukazuju da bolju antiradikalnu aktivnost imaju molekuli sa kateholnom strukturom.

Ispitivanje kinetike reakcija prenosa elektrona u vodi prema metilperoksi-radikalu

Prema Markusovoj teoriji osnovni parametri za izračunavanje konstante reakcije elektronskog prelaza su promena Gibsove slobodne energije reakcije, energija reorganizacije jezgara i konstanta difuzije. Vrednosti ovih parametara za drugi korak SPLET mehanizma u reakciji sa MP su prikazane u tabeli 29. U Dodatku su date vrednosti konstanti brzine za prvi korak SET-PT mehanizma (tabla S12).

Tabela 29 Konstante brzina za reakciju ispitivanih molekula i MP (optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

MP				
Molekul	ΔG_{ET}^0 [kJ/mol]	λ [kJ/mol]	k_{ET} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{app} [M ⁻¹ s ⁻¹]
3-MT	-6	18,0	$3,0 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^9$
HVA	8	63,9	$1,8 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
DOPAC	13	67,7	$3,7 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
Dopamin	12	60,5	$9,9 \times 10^8$	$7,6 \times 10^8$
Katehol	15	66,9	$2,7 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
Epinefrin	12	71,0	$1,0 \times 10^9$	$3,4 \times 10^8$
Norepinefrin	12	70,2	$3,7 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
L-DOPA	7	68,2	$1,5 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$

Na osnovu podataka iz tabele 29 uočava se da su promene Gibsove slobodne energije reakcija pozitivne, sem u slučaju reakcije sa 3-MT, što je u saglasnosti sa

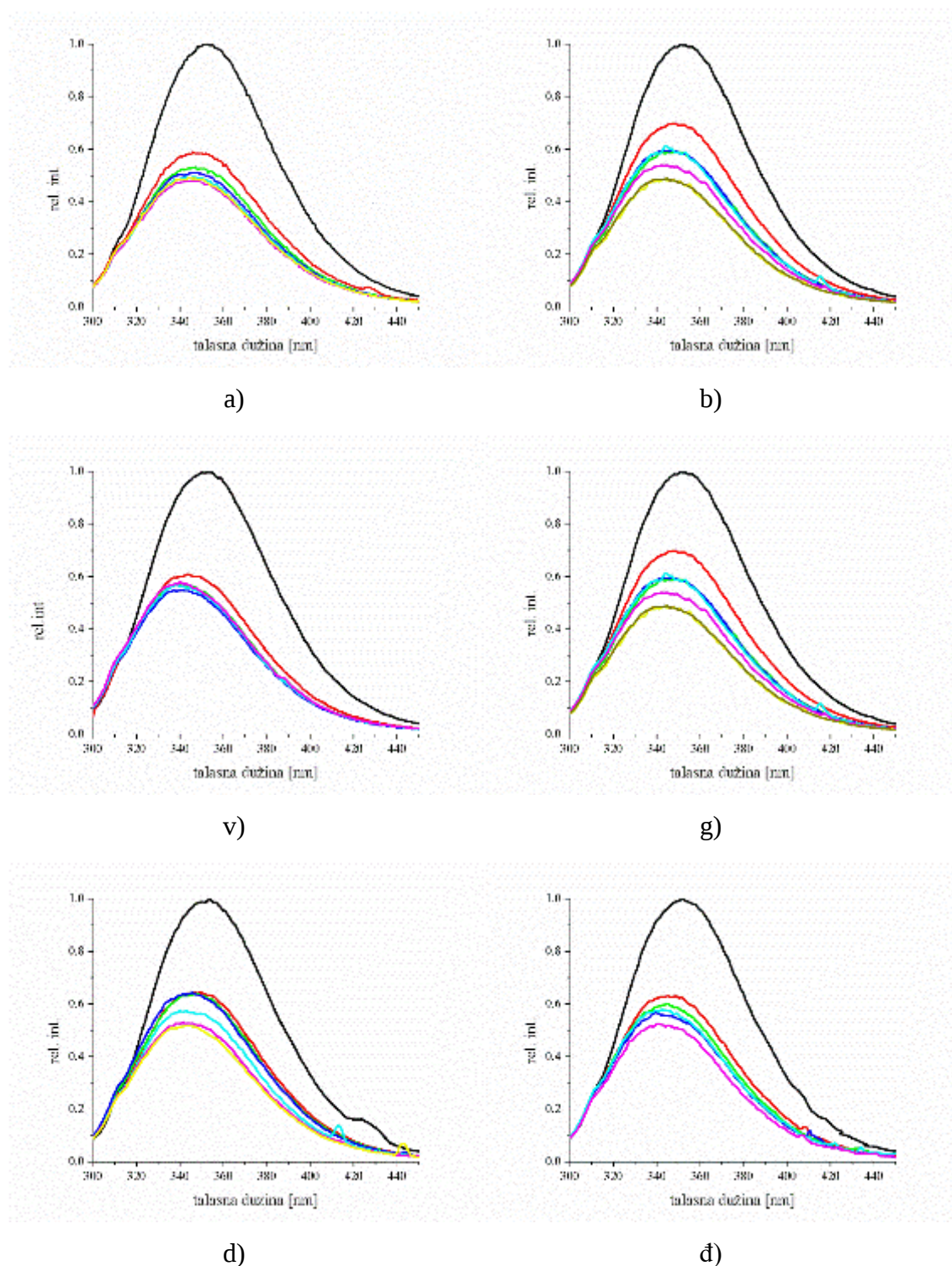
prethodno prikazanim tabelama u kojima su date promene entalpija reakcija. Ova promena termodinamičkih parametara ukazuje na to da reakcija nije spontana. Vrednosti konstanti brzina za molekule sa kateholnom jedinicom su reda veličine 10^8 - 10^9 M^{-1} , i 10^{10} - 10^{11} M^{-1} za molekule sa jednom hidroksilnu grupom. Kada je ova konstanta brzine korigovana za difuziju sve vrednosti konstante su postale reda veličine 10^9 M^{-1} . Rezultati ukazuju na to da je limitirajući faktor u ovim reakcijama difuzija, što navodi na zaključak da je ovo kinetički pokrenut proces. Konstanta brzine reakcija su istog reda veličine kao one izračunate od strane drugih autora koji su ispitivali reakcije protonovanih oblika dopamina, epinefrina i norepinefrina [184,187]. Dobijeni rezultat ukazuje da protonovanje/deprotonovanje nije značajan faktor iz razloga što navedene grupe nisu uključene u sam proces. Zajedno sa podacima za termodinamičke parametre (tabela 26) dokazano je da je SPLET najverovatniji mehanizam za reakciju sa MP. Podatak koji ide u prilog ovom zaključku su i vrednosti naelektrisanja i spinske gustine na kiseonikovom atomu u položaju 2. Zbog velike elektronegativnosti očekivano je da prvo proton bude prenesen na radikal, a nakon toga elektron u drugom koraku. Konstante brzina za reakciju prenosa elektrona u prvom koraku SET-PT mehanizma, date u tabeli S12, su reda veličine 10^{10} - 10^{11} M^{-1} . Male vrednosti konstanti brzina su u saglasnosti sa prethodno dobijenim podacima o maloj verovatnoći SET-PT mehanizma.

7.3. Spektrofluorimetrijsko ispitivanje vezivanja neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita za goveđi serum albumin

U cilju ispitivanja mogućnosti vezivanja, u uslovima *in vivo*, jedinjenja sa različitom antiradikalskom aktivnošću za molekule proteina spektrofluorimetrijski su praćene interakcije ispitivanih molekula sa goveđim serum albuminom. Rezultati su dodatno objašnjeni molekulskim dokingom ispitivanih molekula sa BSA proteinom a interakcije prodiskutovane na osnovu prisustva hidroksilnih grupa na prstenu i amino i karboksilne grupe na alifatičnom nizu. Zbog svojih strukturnih karakteristika u ovaj deo istraživanja su uključeni dopamin, DOPAC, 3-metoksitiramin, HVA, norepinefrin i oktopamin.

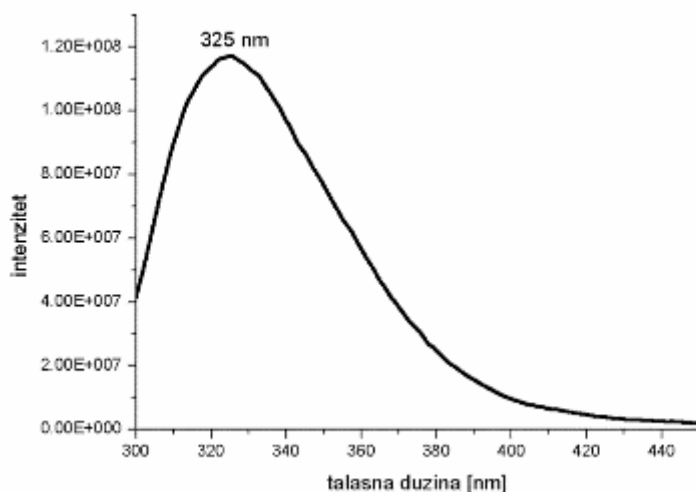
Emisioni spektar BSA pokazuje maksimum na 350 nm prilikom pobuđivanja zračenjem talasne dužine od 280 nm, koje odgovara apsorpciji triptofana i tirozina. Koncentracije odabranih supstanci su bile veoma niske kako bi se uočio efekat smanjenja intenziteta fluorescenije. Na spektrima gašenja kod svih ispitivanih supstanci može se uočiti hipsohromno pomeranje talasne dužine maksimuma što je dokaz vezivanja supstanci i konformacionih promena u strukturi molekula BSA (slika 51). Važno je napomenuti da ispitivani neurotransmiteri i njihovi metaboliti takođe poseduju fluorescentnu emisiju u ispitivanoj oblasti, sa maksimumom emisije na 325 nm (slika 52) što je posledica strukturne sličnosti sa aminokiselinama koje su aktivna mesta u proteinu. Takođe, talasna dužina pobuđivanja zavisi od pH vrednosti sredine i polarnosti sredine [298]. Na $\text{pH} < 8,5$ talasna dužina pobuđivanja je 280 nm dok na većim pH vrednostima raste i iznosi 296 nm. U rastvorima sa $\text{pH} > 10$ konstatovano je da se fluorescencija se gasi najverovatnije usled oksidacije kateholne grupe u alkalnoj sredini [298].

Na osnovu analize Zanga (Zhang) i saradnika [189] pokazano je da se proces vezivanja dopamina za BSA dešava prema Štern-Folmerovom mehanizmu, odnosno da postoji linearan pad intenziteta fluorescencije sa porastom koncentracije dopamina. U okviru teze ovakvi rezultati nisu ponovljeni i nakon višestrukih pokušaja. Zbog toga je odlučeno da se ispita maksimalni pad intenziteta fluorescentne emisije pri dodatku neurotransmitera i njihovih metabolita.



Slika 51 Promena intenziteta fluorescencije BSA (6×10^{-8} M, pH=7,4) sa različitim koncentracijama ($2, 3, 4, 5, 6 \times 10^{-8}$ M) : a) DOPAC-a, b) HVA, v) dopamina, g) 3-MT, d) norepinefrina i đ) oktopamina

Nakon prvog dodatka primetan je veći pad intenziteta fluorescencije, do 0,6 relativnih jedinica intenziteta za dopamin i DOPAC, do 0,64 za norepinefrin i oktopamin, i do 0,7 za HVA i 3-MT. Daljim dodavanjem supstanci intenzitet opada, ali nepravilno, odnosno pad nije primetan pri svakom dodatku. Koncentracije ispitivanih supstanci su bile manje od koncentracije BSA. Može se pretpostaviti da nakon prvog dodatka dopamin, DOPAC, HVA, 3-MT, norepinefrin i oktopamin indukuju promene u strukturi proteina, pri čemu se vezuju za aktivna mesta različitim interakcijama zbog prisustva različitih grupa. Kako ispitivani neurotransmiteri i njihovi metaboliti predstavljaju molekule koji su prirodno prisutni u organizmu to je njihova interakcija sa proteinom očekivana. Prilikom vezivanja menja se konformacija proteina, odnosno izloženost fluorescentno-aktivnih mesta u proteinu, čime se menja intenzitet fluorescencije. Pri svakom narednom povećanju koncentracije analita promene u strukturi dozvoljavaju vezivanje za aktivna mesta proteina pri čemu promene u spektrima više nisu tako uočljive kao pri prvom dodavanju. U ispitivanom opsegu koncentracija neurotransmitera i njihovih metabolita opadanje intenziteta fluorescencije se završava na 0,5 jedinica relativnog intenziteta od početne vrednosti. Daljim dodatkom supstanci nije uočeno opadanje intenziteta.

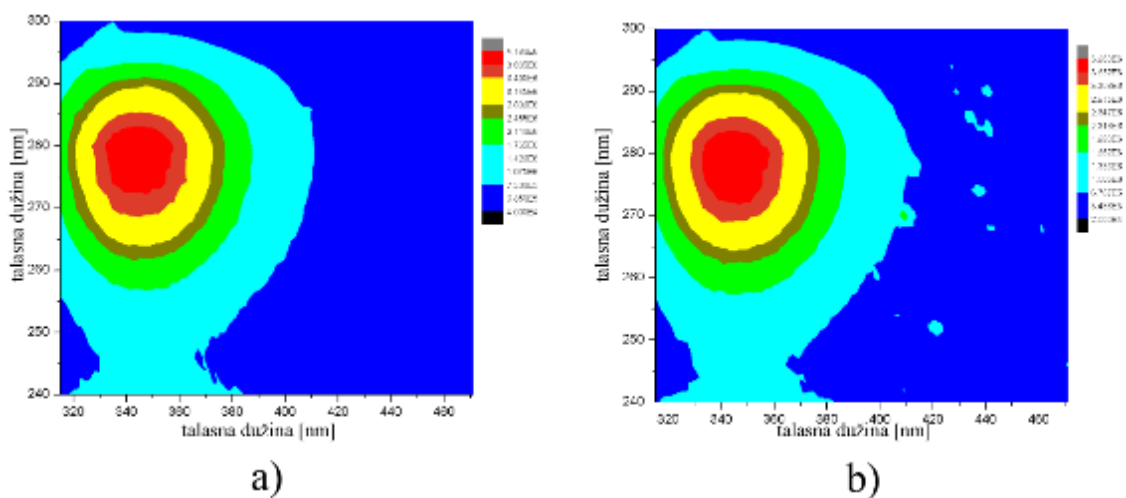


Slika 52 Emisioni spektar rastvora dopamina koncentracije $9,5 \times 10^{-5}$ M na pH=7,4

3D spektri smeša DOPAC-a i HVA sa BSA su prikazani na slici 53. Ovakvim tipom spektra se pokazuje zavisnost intenziteta emitovanog zračenja različitih talasnih

dužina od talasne dužine pobuđujućeg zračenja. Intenzitet emitovanog zračenja je prikazan bojama od sive do plave i crne. Oblast najintenzivnijeg zračenja je označena sivom i crvenom bojom. Na osnovu 3D spektara može se zaključiti da dodate količine DOPAC-a i HVA ne menjaju položaj maksimuma emisije koji odgovara čistom BSA (od 275 do 295 nm za pobuđujuće zračenje i 330 do 350 za emitovano zračenje). Takođe, poređenjem dva spektra uočava se da nema značajnih razlika između dodatka DOPAC-a i HVA, što dodatno potvrđuje da razlike u supstituentima ova dva jedinjenja ne utiču na proces vezivanja za protein i gašenje fluorescentne emisije.

Na osnovu dobijenih vrednosti smanjenja intenziteta fluorescencije može se zaključiti da su za vezivanje ispitivanih molekula važne krajnje grupe alifatičnog niza, amino i karboksilna grupa, kao i hidroksilne grupe aromatičnog prstena, ali da njihov broj i raspored ne utiče značajno na jačinu vezivanja. Kako bi se ovaj rezultat potvrdio metodama molekulskog dokinga je dodatno ispitano vezivanje odabranih supstanci za goveđi serum albumin.



Slika 53 3D spektar smeše BSA (8×10^{-8} M, pH=7,4) i: a) DOPAC-a (7×10^{-8} M) i b) HVA (7×10^{-8} M)

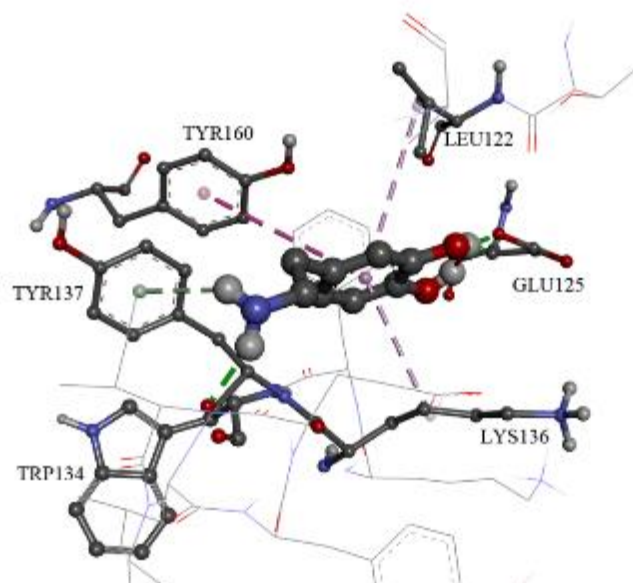
Odabrani deo prostora u kome se posmatraju interakcije, metodom molekulskog dokinga, je postavljen tako da bude obuhvaćen ceo molekul ($120 \times 76 \times 96$ tačaka, položaj centra $x=64,296$ Å, $y=25,811$ Å, $z=32,102$ Å, korak 1 Å) i bude određeno 25 najstabilnijih položaja u strukturi proteina. U tabeli 30 su date vrednosti energija vezivanja i konstante inhibicije za po dve najstabilnije konformacije svakog od ispitivanih molekula. Uočava

se da su energije interakcija do -13 kJ/mol i da su najveće za dopamin i DOPAC. Molekuli koji imaju metoksilnu i hidroksilnu grupu imaju manje energije vezivanja od ova dva molekula, pri čemu su razlike od 1 do 4 kJ/mol. Niže vrednosti za norepinefrin i oktopamin su dobijene najverovatnije usled postojanja jake vodonične veze u strukturi alifatičnog niza koja ograničava fleksibilnost molekula. Na osnovu detaljne analize zapaženo je da su u različitim modelima molekuli u različitim položajima i da nije moguće jednoznačno upoređivanje jačina interakcija.

Tabela 30 Vrednosti energija vezivanja i konstante inhibicije za interakcije odabranih molekula sa BSA

Molekul	Ceo BSA				Lokalizovano TRP134			
	1		2		1		2	
	Ei [kJ/mol]	Ki [mM]	Ei [kJ/mol]	Ki [mM]	Ei [kJ/mol]	Ki [mM]	Ei [kJ/mol]	Ki [mM]
Dopamin	-12,7	5,85	-12,6	6,24	-18,2	0,6	-16,2	1,4
3-MT	-8,9	27,5	-8,3	34,7	-13,6	4,1	-12,0	7,8
DOPAC	-10,1	16,7	-8,7	29,7	-13,8	3,7	-13,5	4,3
HVA	-8,8	28,4	-8,7	30,1	-14,8	2,6	13,1	4,9
Norepinefrin	-3,8	213	-3,8	214	-11,5	9,6	-10,9	12,2
Oktopamin	-5,5	106	-5,5	110	-12,3	6,8	-11,7	8,9

Zbog toga je veličina kutije u kojoj se ispituju interakcije smanjena na 60×60×60 tačaka i postavljena oko triptofana 134 (TRP134) koji se smatra aktivnim mestom proteina (položaj $x=45,654 \text{ \AA}$, $y=35,381 \text{ \AA}$, $z=26,612 \text{ \AA}$, korak $0,375 \text{ \AA}$). Energije vezivanja i konstante inhibicije su prikazane u istoj tabeli. Rezultati pokazuju da su interakcije, ukoliko se ograniči kretanje odabranog molekula na oblast oko TRP134, jače za 2-5 kJ/mol, pri čemu se sve vrednosti nalaze u opsegu od 12 do 18 kJ/mol. Ovakav rezultat dodatno podržava hipotezu da su moguće interakcije ispitivanih molekula sa aktivnim mestom BSA što ima za posledicu smanjenje intenziteta fluorescentne emisije. Zbog sličnosti strukturnih parametara ispitivanih molekula energije vezivanja i konstante inhibicije imaju bliske vrednosti. Slika 54 prikazuje moguće interakcije dopamina sa aminokiselinama aktivnog mesta BSA, u okolini TRP134. Važno je primetiti da je struktura dopamina u okruženju proteina izdužena, odnosno da su međumolekulske interakcije jače od katjon- π interakcija koje stabilišu strukturu u gasnoj fazi.



Slika 54 Moguće interakcije dopamina sa aminokiselinama aktivnog mesta BSA (vodonične veze sa GLU125 i TYR137, π -alkil sa alifatičnim nizom LEU125 i LIS136 i π - π steking sa TYR160)

Uspostavljene interakcije između ispitivanih molekula su: vodonične veze između dopamina i polarnih grupa glicina (GLU125) i tirozina (TYR137), π -alkil sa alifatičnim nizom leucina (LEU125) i lizina (LIS136) i π - π steking sa TYR160. Na osnovu vrednosti konstante inhibicije zaključeno je da je vezivanje molekula slabo i da su potrebne veće koncentracije odabranih molekula što je uočeno i eksperimentalno, usled prestanka pada intenziteta fluorescencije nakon nekoliko uzastopnih dodavanja analita.

7.4. Spektroskopsko i strukturno ispitivanje 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona

Analiza kristalografske strukture

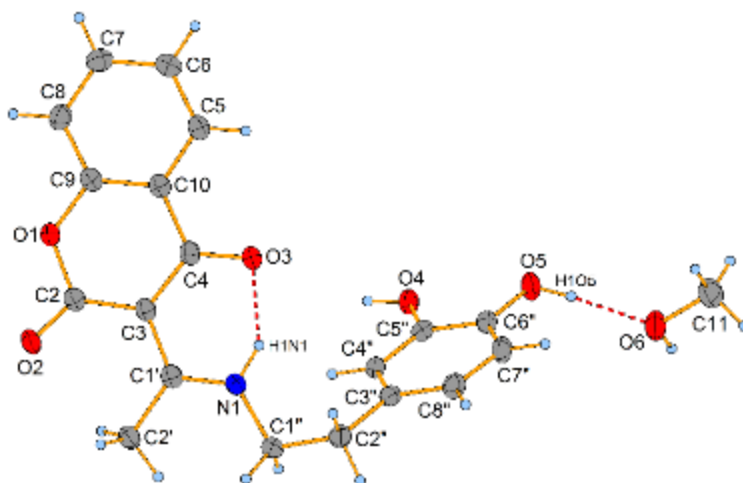
Podaci o kristalnoj strukturi za sintetisani derivat kumarina i dopamina (3×MeOH) su dati u tabeli 31. Analiza dobijenog kristala difrakcijom X-zraka je pokazala da sintetisano jedinjenje kristališe u trikliničnoj *P*-1 prostornoj grupi. Na osnovu rezultata zaključeno je da u strukturi jedinjenja postoje biciklični kumarin i 3,4-dihidroksifenilet-il-fragmenti povezani aminoetilidinskim lancem, dok se kao molekul rastvarača pojavljuje metanol. Diedarski ugao između dva fragmenta iznosi 61,46(3)°.

Tabela 31 Kristalni podaci o strukturi derivata kumarina i dopamina (3×MeOH) dobijeni difrakcijom X-zraka

Jedinjenje	Derivat kumarina i dopamina (×MeOH)
Empirijska formula	C ₂₀ H ₂₁ NO ₆
Molekulska masa	371,38
Temperatura	120 (2) K
Talasna dužina	1,54184 Å
Kristalni sistem	Triklinični
Prostorna grupa	<i>P</i> -1
Dimenzije jedinične ćelije	$a = 7,9449(3) \text{ Å}$ $\alpha = 82,538(3)^\circ$ $b = 8,8742(3) \text{ Å}$ $\beta = 82,296(3)^\circ$ $c = 13,1920(5) \text{ Å}$ $\gamma = 70,039(3)^\circ$
Zapremina	862,79(6) Å ³
Z, gustina (izračunato)	2; 1,430 g/cm ³
Koeficijent apsorpcije	0,883 mm ⁻¹
F(000)	392
Kristalni oblik, boja	Prizma, bela
Veličina kristala	0,311 × 0,201 × 0,072 mm ³
Θ oblast za dobijanje podataka	3,395 – 67,361 °
Oblast indeksa	$-9 \leq h \leq 6, -10 \leq k \leq 10, -15 \leq l \leq 15$

Za derivate kumarina ovog tipa karakteristično je formiranje intramolekulske vodonične veze N–H···O koja omogućava nastajanje stabilne šestočlane strukture i postojanje molekula u obliku keto i enolnog tautomera. Na slici 55 je prikazana kristalna

struktura sintetisanog jedinjenja. Vodonična veza i postojanje šestočlanog prstena dovodi do izjednačenja dužine veza C3–C4 i C3=C1' na 1,422(2) Å. Ovaj rezultat se objašnjava delokalizacijom π -elektrona u sistemu u kome se vodonična veza može opisati kao tzv. rezonancom potpomognuta vodonična veza (*resonance assisted hydrogen bond*) [299]. Usled ovog efekta veza C4=O3 (1,248(2) Å) postaje duža od C2=O2 (1,223(2) Å) dok veza C1'=N1 (1,309(2) Å) postaje kraća nego što je očekivano. U kristalu su takođe uočena i još dva tipa vodoničnih veza, O–H $\cdots$ O i C–H $\cdots$ O. Molekuli rastvarača stabilizuju strukturu takođe građenjem vodoničnih veza. Zbog ovoga su derivat kumarina i dopamina i MeOH vezani tako da formiraju paralelne lance, u pravcu [011], koji su međusobno povezani $\pi \rightarrow \pi$ interakcijama između piran-2,4-diona (py) i fenil-prstena (ph) kumarinskog ostatka. Ove interakcije karakterišu $C_{g_{piridin}} \cdots C_{g_{piridin}}$ i $C_{g_{piridin}} \cdots C_{g_{fenil}}$ rastojanja od 3,6479(1) i 3,7569(1) Å, respektivno (slika 56).

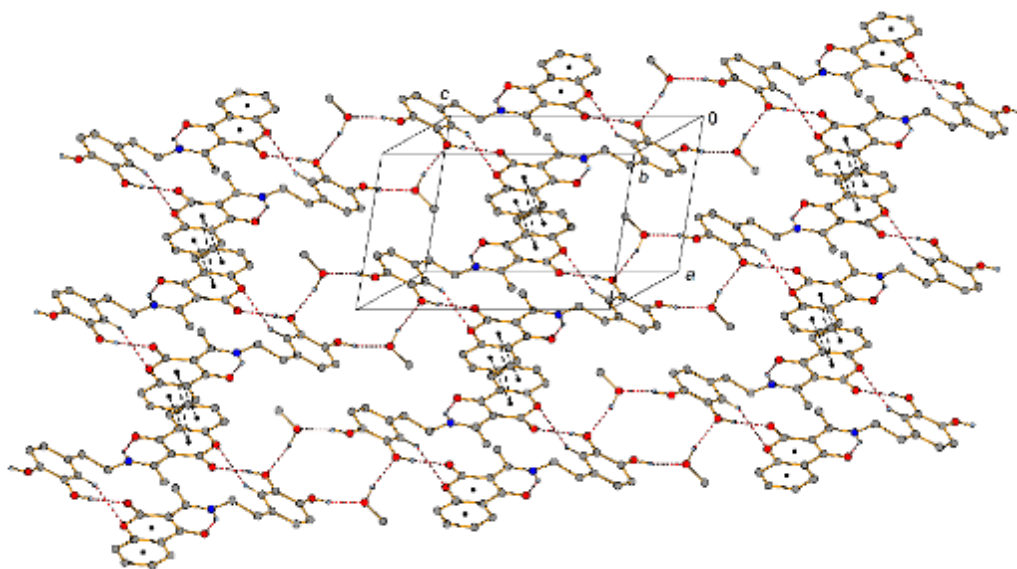


Slika 55 Kristalna struktura 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona

Teorijska analiza strukture

Kako bi se odredio najbolji funkcional za predviđanje spektara novosintetisanog molekula kristalografska struktura je optimizovana pomoću najčešće korišćenih funkcionala: B3LYP, B3LYP-D3BJ, B3PQ91, M06-2X i M05-2X sa istim bazisnim skupom 6-311++G(d,p). Procena kvaliteta dobijenih teorijskih vrednosti je određena

pomoću MEA i R vrednosti koje su date u tabeli 32, a vrednosti eksperimentalnih i teorijskih dužina i uglova veza su date u tabeli S13.



Slika 56 Molekulsko pakovanje derivata kumarina i dopamina ($\times$ MeOH) na kome su prikazane π - π interakcije (crne tačkice) između susednih lanaca formiranih vodoničnim vezama (crvene tačkice). Vodonikovi atomi koji nisu uključeni u vodonične veze nisu prikazani

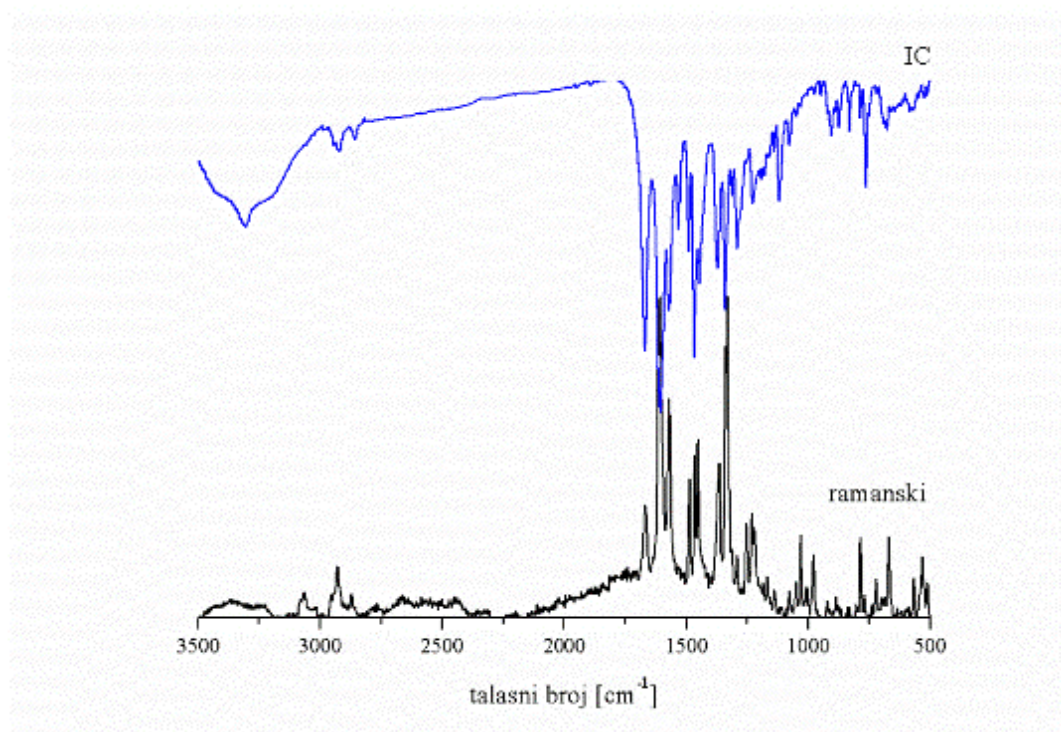
Kao što se može videti u tabeli 32 svi odabrani funkcionali dobro opisuju eksperimentalnu strukturu. MEA vrednosti su oko 0,007 za dužine veza dok su vrednosti koeficijenta korelacije i srednjih apsolutnih grešaka za dužine veza međusobno skoro jednake za sve funkcionalne. Ovakav rezultat dovodi do zaključa da se vrednosti dužina veza ne mogu koristiti za odabir najpogodnijeg funkcionala za simulaciju spektralnih podataka. S druge strane najveća vrednost R, a istovremeno najniža MAE, dobijena je kada se uporede vrednosti uglova veza izračunatih pomoću M06-2X funkcionala i eksperimentalnih podataka. Treba napomenuti da i drugi korišćeni funkcionali dobro reprodukuju eksperimentalne vrednosti. Uzimajući u obzir vrednosti R i MEA za dužine i uglove veza (tabela 32) može se zaključiti da M06-2X funkcional najbolje reprodukuje eksperimentalne vrednosti dužina i uglova veza za sintetisani derivat kumarina

Tabela 32 Parametri za poređenje struktura dobijenih optimizacijom, primenom različitih funkcionala sa 6-311++G(d,p) bazisnim skupom, na osnovu kristalografske strukture

	Funkcional	M06-2X	M05-2X	B3LYP	B3LYP-D3BJ	B3PW91
Dužine veza	MEA	0,007	0,007	0,008	0,008	0,007
	R	0,991	0,992	0,992	0,991	0,991
Uglovi veza	MEA	0,622	0,868	0,698	0,777	0,715
	R	0,970	0,932	0,957	0,944	0,953

Analiza vibracionih spektara

Karakterizacija sintetisanog jedinjenja je urađena i uz pomoć vibracionih, IC i ramanskog spektra (slika 57). Široka traka na oko 3305 cm^{-1} potiče od istežućih N–H i O–H vibracija. Usled građenja vodonične veze trake su pomerene ka manjim vrednostima talasnih brojeva. Ova traka se preklapa i sa istežućim vibracijama aromatičnih C–H vibracija. Traka niskog intenziteta na 2900 cm^{-1} (IC) i 2930 cm^{-1} (R) potiče od istežućih alifatičnih C–H vibracija na C2'', C1'' i C2' atomima.

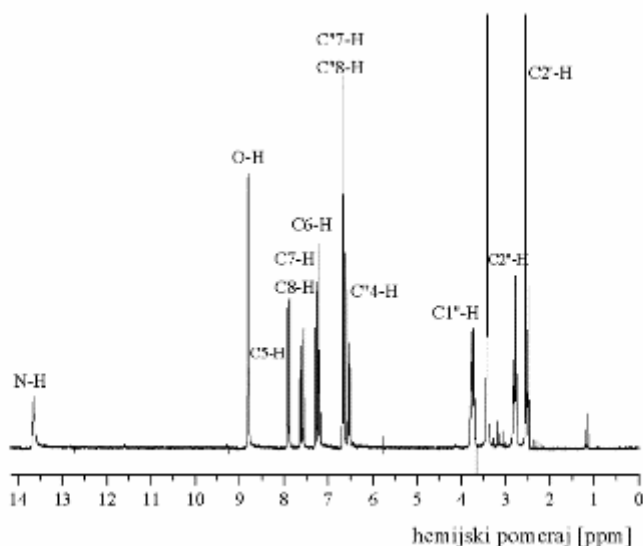


Slika 57 Vibracioni spektri 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona

Trake karbonilne grupe su prisutne na 1668 i 1605 cm^{-1} . Niža vrednost talasnog broja vibracije C4–O3 je posledica građenja vodonične veze sa N–H grupom. Traka na 1118 cm^{-1} potiče od C–O vibracije. Aromatični delovi strukture molekula su potvrđeni velikim brojem traka u oblasti otiska prsta. Trake ispod 1600 cm^{-1} u ramanskom spektru ukazuju na vibracije kumarinskog dela molekula i aromatičnog prstena.

Analiza NMR spektara

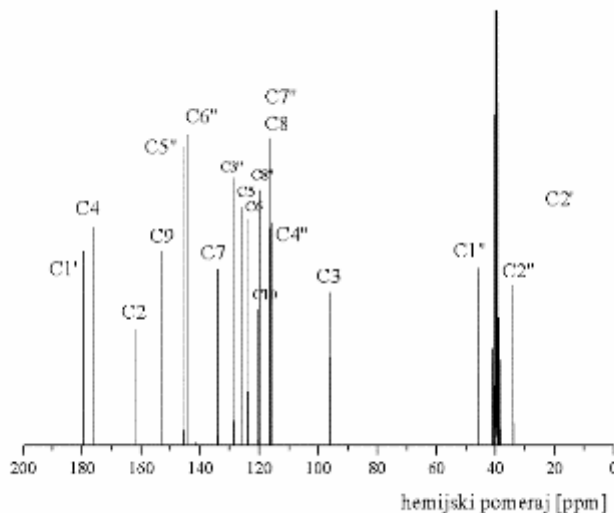
Eksperimentalni NMR spektri (slike 58 i 59) su upoređeni sa teorijskim kako bi se ispitala primenljivost odabranog funkcionala za opisivanje strukture. U tabeli 33 su prikazani eksperimentalni i teorijski hemijski pomeraji.



Slika 58 ^1H NMR spektar 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona

U ^{13}C NMR spektru najmanji hemijski pomeraj, od 18,4 ppm, ima metil-grupa dok se ugljenikovi atomi etilidenskog dela nalaze na 34,1 i 45,7 ppm. Na većim hemijskim pomerajima su aromatični ugljenikovi atomi. Atomi C6'' i C5'' dopaminskog dela vezani za kiseonikove atome imaju, zbog negativnog induktivnog efekta atoma kiseonika, veće hemijske pomeraje, 144,2 i 145,5 ppm. Isti efekat je uključen i u hemijski pomeraj atoma na položajima 9 i 2. Najveći hemijski pomeraji su određeni za ugljenike C4 i C1' koji su deo rigidnog dela molekula i šestočlanog prstena O3–C4–C3–C1'–N1–H u kome postoje dva elektronegativna atoma i jaka vodonična veza koja dodatno povećava negativno naelektrisanje na ovim atomima. Eksperimentalne vrednosti hemijskih

pomeraja su dobro reprodukovane na odabranom nivou teorije sa koeficijentom korelacije od 0,996 i srednjom apsolutnom greškom od 2,9 ppm.



Slika 59 ^{13}C NMR spektar 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona

Tabela 33 Eksperimntalni i teorijski hemijski pomeraji (optimizovane na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije) u NMR spektrima

$\delta(^1\text{H})$ [ppm]			$\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]		
	Teorijski	Eksperimentalni		Teorijski	Eksperimentalni
C2'-H	2,55	2,30	C2'	18,4	22,1
C2'-H	2,55	2,30	C2''	34,1	35,4
C2'-H	2,55	2,30	C1''	45,7	45,5
C2''-H	2,80	2,83	C3	96,2	98,1
C2''-H	2,80	2,83	C4''	115,9	115,2
C1''-H	3,76	3,29	C7''	116,4	116,5
C1''-H	3,76	3,29	C8	116,5	119,4
C4''-H	6,50	6,86	C8''	119,7	125,8
C7''-H	6,67	6,68	C10	120,4	122,3
C8''-H	6,67	7,06	C6	123,8	125,7
C6-H	7,25	7,29	C5	125,9	129,7
C8-H	7,60	7,29	C3''	128,1	134,1
C7-H	7,60	7,71	C7	134,1	137,3
C5-H	7,91	8,09	C6''	144,2	139,5
R		0,993	C5''	145,5	141,3
MAE		0,22	C9	153,2	151,9
			C2	162,1	154,0
			C4	176,3	174,7
			C1'	179,6	177,6
			R		0,996
			MAE		2,9

Vrednosti hemijskih pomeraja u ^1H NMR spektru, za protone vezane za ugljenikove atome, su u opsegu od 2,5 do 7,9 ppm. Hemijski pomeraji protona u N–H i O–H iznose 13,66 i 8,81 ppm, respektivno. Najmanji hemijski pomeraj je uočen za protone metil-grupe i etil-grupa alifatičnog niza koji povezuje kumarinski i kateholni deo molekula. Vrlo dobro reprodukovanje hemijskih pomeraja je očekivano za rigidne delove molekula i aromatične prstenove. Najveći hemijski pomeraj se javlja kod protona vezanih za atome C8, C7 i C5, zbog delokalizacije unutar rigidnog kumarinskog dela. Koeficijent korelacije eksperimentalnih i teorijskih vrednosti iznosi 0,993, dok je srednja vrednost apsolutne greške 0,22 ppm.

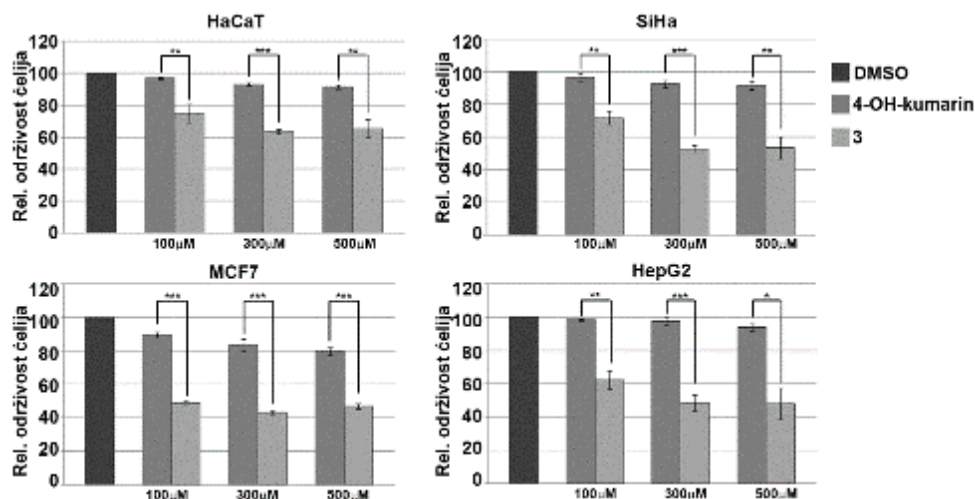
Test citotoksičnosti

Aktivnost 4-hidroksikumarina (4-OH-kumarin) i sintetisanog derivata je ispitivana prema ćelijama zdravih keratinocita HaCaT, cervikalnog karcinoma SiHa, karcinoma dojke MCF7 i hepatocelularnog karcinoma HepG2 u DMSO. Kao što je prikazano na slici 60, ova dva molekula pokazuju različite efekte prema odabranim ćelijama. 4-OH-Kumarin ima slab efekat na vijabilnost ćelija za sve testirane linije. Maksimalni efekat 4-OH-kumarin je pokazao prema MCF7 ćelijama, kod kojih je, nakon 48 časova i pri koncentraciji od 500 μM , postignuto smanjenje od 20% u odnosu na početni broj ćelija. Sintetisani derivat kumarina pokazuje znatno jači uticaj i na zdrave i na ćelije tumora. Najjači efekat postoji u slučaju MCF7 ćelijske linije. Rastvor sintetisanog derivata kumarina i dopamina (slika 60), koncentracije 100 μM dovodi do smanjenja vijabilnosti ćelija na 75% HaCaT ($p = 0,023$), 72% SiHa ($p = 0,008$), 49% MCF7 ($p = 0,008$) i 62% HepG2 ćelija ($p = 0,005$). Broj preživelih ćelija zavisi od koncentracije molekula i pri višim koncentracijama se smanjuje. Kada se koristi 300 μM rastvor derivata kumarina i dopamina samo 43% MCF7 ćelija preživljava. Uočena je i statistička značajnost kada su upoređeni efekti 4-OH-kumarina i derivata, pri čemu je zaključeno da novi derivat ima veću aktivnost i prema zdravim ćelijama i ćelijama tumora.

Uticaj dobijenog derivata kumarina i dopamina na vijabilnost ćelija je pokazana i prema zdravim i prema ćelijama tumora. Sličan efekat je primećen i kod drugih derivata kojima su tretirane ćelije karcinoma jajnika, pluća, hepatokarcinoma, kancera dojke i

debelog creva [300–304]. Zavisno od svoje strukture, kumarini mogu različitim reakcionim putevima da utiču na ćelije. Poznato je da su u te procese uključeni enzimi telomeraze, protein kinaze i indukovanje kaspasa-9 apoptoze [302].

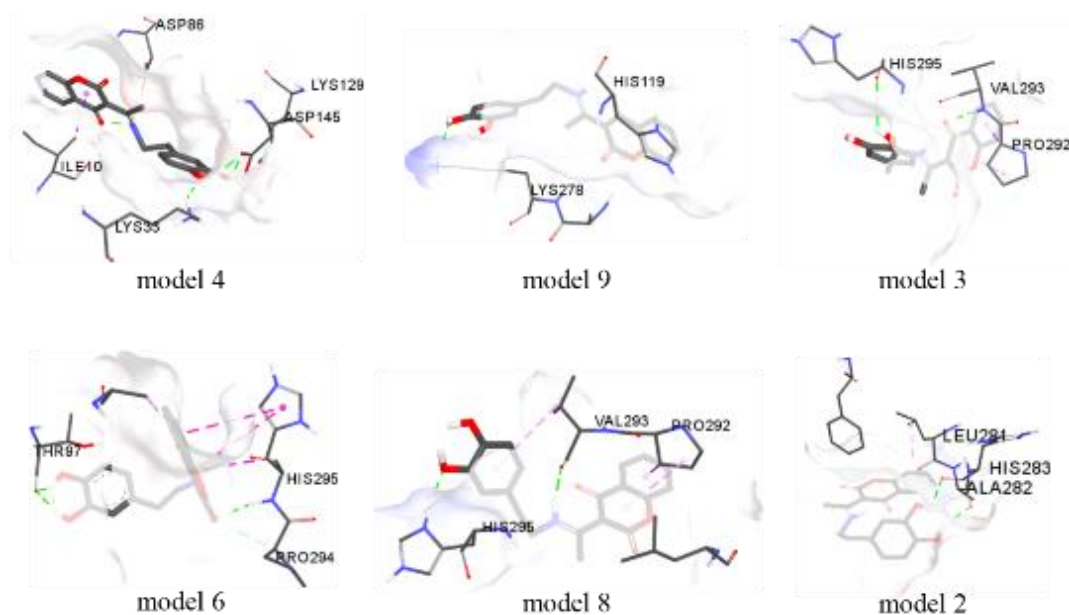
Dodatno su ispitane i moguće razlike u interakcijama 4-OH-kumarina i derivata kumarina i dopamina sa proteinima značajnim za istraživanja tumora metodama molekulske mehanike. Ciklin-zavisna kinaza (*Cyclin-Dependent Kinase*, CDK, PDB ID: 1KE9) je odabrana kao model sistem. Ovaj protein spada u grupu važnih molekula za ćelijsku deobu [305] i usled deregulacije može dovesti do razvoja bolesti među kojima su i tumori [306,307]. Smanjenje aktivnosti ovog proteina može predstavljati značajan put za anti-tumorsku terapiju [308].



Slika 60 Ispitivanje vijabilnosti ćelija (HaCaT, SiHa, MCF7 i HepG2) nakon 48h od tretiranja 4-OH-kumarinom ili derivatom kumarina i dopamina (*vijabilnost ćelija je izračunata kao procenat ukupnog broja živih ćelija u odnosu na broj pre tretiranja. Vrednosti su upoređene Studentovom t-raspodelom za * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$*)

Roditeljski molekul, 4-OH-kumarin sadrži nekoliko polarnih grupa: hidroksilnu grupu u položaju 4, karboksilnu grupu i atom kiseonika na pironskom prstenu. Ostatak strukture je benzenov prsten. Najveći broj interakcija se mogu okarakterisati kao π -alkil i π - σ hidrofobne interakcije sa leucinom, valinom, alaninom, argininom i fenilalaninom. Karakteristika ovih interakcija su mala energija i velika međuatomska rastojanja ($\geq 2,5$ Å). Pored ovih mogu se uočiti i dva tipa vodoničnih veza. Kod prvog tipa hidroksilna grupa molekula se ponaša kao donor protona sa treoninom (THR97) i glutaminskom kiselinom (GLU195 i GLU257). Drugu grupu čine interakcije u kojima je pomenuta

grupa akceptor protona sa pozitivno naelektrisanim amino kiselinama (lizin, histidin i arginin).



Slika 61 Moguće konformacije 3-(1-((3,4-dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona u CDK proteinu

Razlika u aktivnosti 4-OH-kumarina i derivata kumarina i dopamina je posledica broja aktivnih grupa u strukturi. Dodatkom dopaminskog dela povećava se broj hidroksilnih grupa uz dodatak i amino grupe, a i menja se pokretljivost različitih delova molekula. Pretpostavka je da amino grupa ne utiče na vezivanje sa aminokiselinama zbog rigidnog šestočlanog prstena. Preko aromatičnog prstena se takođe može ostvariti niz nekovalentnih interakcija sa aromatičnom aminokiselinama. Na osnovu strukturnih parametara može se zaključiti da se tip interakcija ne menja i da su to interakcije tipa vodonične veze, π -alkil i π - σ interakcije. Hidrofobne π - σ interakcije su uočene sa izoleucinom (ILE10) i prolinom (PRO292). Ove nekovalentne interakcije imaju širok opseg vrednosti međuatomskih rastojanja (3,50 do 4,40 Å). Vodonične veze se mogu ostvariti sa asparaginskom kiselinom (ASP145 i ASP86), treoninom (THR97), valinom (VAL293), alaninom (ALA282) i histidinom (HIS293). Jačine ostvarenih vodoničnih veza i međuatomska rastojanja su u istom opsegu vrednosti kao kod 4-OH-kumarina. Na osnovu ovoga se može zaključiti da je reaktivnost kumarinskog dela sačuvana i da dodatne grupe samo povećavaju broj ostvarenih interakcija. Na slici 60 prikazani su neke od mogućih konformera i interakcija sa aminokiselinama u ciklin-zavisnoj kinaza proteinu.

8. Zaključak

Prvi deo rezultata u tezi predstavlja potpuno spektroskopsko i teorijsko ispitivanje metabolita neurotransmitera: 3-metoksitiramina, oktopamina, 6-hidroksidopamina i VMA.

Struktura najvažnijeg metabolita dopamina, **3-metoksitiramina**, je optimizovana na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou teorije koji najbolje opisuje eksperimentalno određenu strukturu. Vrednosti apsolutnih grešaka i koeficijenata korelacije za uglove i dužine veza, kao i hemijski pomeraji u ^1H i ^{13}C NMR spektrima potvrđuju da se pomenuti nivo teorije može koristiti za opisivanje eksperimentalne strukture. Pored toga, i IC i ramanski spektri su vrlo dobro reprodukovani sa koeficijentom korelacije između eksperimentalnih i teorijskih vrednosti položaja vibracionih traka od 0,99. Prilikom predviđanja elektronskih spektara dva maksimuma na manjim talasnim dužinama pokazuju dobro slaganje sa eksperimentalnim vrednostima. Razlika između izračunate i određene talasne dužine najdugotalasnijeg elektronskog prelaza je objašnjena dodatnim interakcijama sa rastvaračem, koje nisu uključene u SMD model rastvarača. Optimizovanu strukturu najstabilnijeg konformera karakteriše π -katjon interakcija između NH_3^+ grupe i elektronskog oblaka aromatičnog prstena, što je potvrđeno izduženjem jedne N–H veze.

Oktopamin je strukturno opisan pomoću B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) nivoa teorije, koji najbolje reprodukuje kristalografske vrednosti za dužine i uglove veza. Dodatni dokaz za primenljivost odabranog nivoa teorije u opisivanju eksperimentalne strukture je dobijen poređenjem vrednosti hemijskih pomeraja u eksperimentalnim i simuliranim NMR spektrima, za koje su dobijeni koeficijenti korelacije 0,994, za ^{13}C NMR, i 0,998 za ^1H NMR. Teorijski izračunate talasne dužine prelaza u elektronskom spektru oktopamina su bliske eksperimentalno određenim talasnim dužinama. Razlika od 30 nm koja je uočena kod prelaza na 280 nm je posledica stabilizacionih interakcija između polarnih grupa na alifatičnom nizu i rastvarača koje dovode do sniženja energije prelaza. Najstabilniji konformer ovog jedinjenja karakteriše i postojanje vodonične veze između hidroksilne i amino grupe alifatičnog niza.

Dodatkom jedne hidroksilne grupe u *orto*-položaju dopamina dobija se **6-hidroksidopamin**, čija struktura je optimizovana M06-2X/6-311++G(d,p) teorijskim modelom. Predložena struktura je potvrđena korelacijom teorijskih i eksperimentalnih

vrednosti hemijskih pomeraja u ^1H i ^{13}C NMR spektrima, kao i talasnih brojeva vibracionih traka u IR i ramanskim eksperimentalnim i simuliranim spektrima. U strukturi najstabilnijeg konformera 6-hidroksidopamina postoji jaka vodonična veza između amino grupe alifatičnog niza i hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu. Vrednost talasne dužine elektronskog prelaza od 200 nm je vrlo dobro opisana teorijskom vrednošću, dok je kod prelaza sa talasnom dužinom od 280 nm uočena razlika od 40 nm u odnosu na teorijsku. Zbog postojanja većeg broja polarnih grupa u molekulu 6-hidroksidopamina očekivano je građenje intermolekulskih vodoničnih veza sa molekulima rastvarača koje dovode do dodatne stabilizacije strukture.

Struktura **vanililbademove kiseline** je optimizovana na M05-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije nakon poređenja strukturnih parametara za različite funkcionalne sa kristalografskim podacima. Detaljna analiza vibracionih spektara je pokazala da parametri korelacije i srednja vrednost apsolutne greške prilikom poređenja talasnih brojeva vibracionih traka iznose 0,9997 i 15 cm^{-1} (IC), odnosno 0,9995 i 27 cm^{-1} (ramanski), što je još jedna potvrda primenljivosti odabranog funkcionala. Ovaj nivo teorije dobro reprodukuje i NMR spektre, sa srednjom apsolutnom vrednošću greške određivanja hemijskih pomeraja od 0,1 i 19 ppm za ^1H i ^{13}C NMR spektre respektivno. Elektronski prelazi na 199 nm i 230 nm su u saglasnosti sa eksperimentalnim podacima. Uočena razlika od 40 nm između eksperimentalne i teorijske vrednosti talasne dužine osnovnog elektronskog prelaza (HOMO→LUMO prelaz) je objašnjena mogućim interakcijama sa rastvaračem. Na osnovu strukture najstabilnijeg konformera zaključeno je da je vodonična veza, formirana između kiseonika karboksilne i hidroksilne grupe alifatičnog niza, važan faktor stabilizacije.

Antiradikalska aktivnost prema DPPH radikalu je eksperimentalno određena spektrofotometrijski i primenom EPR spektroskopije za 16 jedinjenja kako bi se ispitao uticaj različitih strukturnih parametara na aktivnost molekula. Pokazano je da molekuli sa kateholnom strukturom, dopamin, epinefrin, norepinefrin, L-DOPA i DOPAC imaju EC_{50} vrednost koja je uporediva sa vrednostima za dobre antioksidanse, kvercetin i galnu kiselinu. Zamena jedne hidroksilne grupe metoksilnom grupom smanjuje aktivnost molekula više od tri puta zbog nepostojanja vodonične veze u formiranom radikalu antioksidansa. Takođe je uočena smanjena antiradikalska aktivnost kod molekula sa jednom hidroksilnom grupom u *para*-položaju (tiramin, tirozin i oktopamin). Važan

strukturni parametar za aktivnost molekula je i karboksilna grupa na alifatičnom nizu zbog lakoće otpuštanja protona. Vreme reakcije sa DPPH radikalom raste za red veličine kod molekula sa jednom hidroksilnom ili jednom hidroksilnom i jednom metoksilnom grupom u odnosu na molekule sa kateholnom grupom.

Teorijska ispitivanja molekula sa kateholnom strukturom su pokazala da najniže vrednosti BDE parametra, oko 340 kJ/mol, imaju hidroksilne grupe u *para*-položaju. Ovo se može smatrati posledicom građenja vodonične veze između kiseonika sa nesparenim elektronom i hidroksilne grupe koja dovodi do značajnog smanjenja BDE vrednosti, od oko 20 kJ/mol. Daljom analizom je utvrđeno da molekuli kod kojih je formirana slaba vodonična veza između metoksilne i hidroksilne grupe imaju više BDE vrednost, oko 350 kJ/mol. Vrednosti potencijala jonizacije za sve ispitivane molekule su značajno veće od vrednosti za druge termodinamičke parametre, što ukazuje da SET-PT mehanizam nije povoljan reakcioni put pri ovim uslovima. Uočeno je da karboksilna grupa alifatičnog niza ima najnižu vrednost afiniteta prema protonu (70 do 100 kJ/mol) u odnosu na hidroksilne (130 do 160 kJ/mol) i amino grupe (300 do 320 kJ/mol). Teorijska analiza aktivnosti navodi na zaključak da se molekuli sa kateholnom strukturom i karboksilnom grupom na alifatičnom nizu mogu smatrati najboljim gasiocima radikalskih vrsta, što je eksperimentalno potvrđeno za molekule L-DOPA i DOPAC. Na osnovu vrednosti termodinamičkih parametara može se zaključiti da je u vodi HAT mehanizam najpovoljniji, dok su u benzenu HAT i SPLET konkurentski reakcioni putevi. Konstante brzina, za reakcije DPPH radikala sa molekulima L-DOPA, dopamin, epinefrin i norepinefrin, izračunate preko teorije prelaznog stanja, imaju vrednost od 10^{-10} do 10^{-12} s⁻¹, dok su konstante brzina reakcija prenosa elektrona 10^6 M⁻¹s⁻¹, što dodatno potvrđuje termodinamičku pretpostavku da je SPLET mehanizam dominantan reakcioni put u ovom slučaju.

Reaktivnost prema ABTS radikal-katjonu je određena za DOPAC, L-DOPA, epinefrin, norepinefrin, dopamin, tiramin, tirzin, homovanilinsku kiselinu, feniletilamin i fenilalanin. Postojanje kateholne strukture i stabilizacija vodoničnom vezom u formiranom radikalu, ili anjonu antioksidansa, su se pokazali kao važani strukturni parametri. TEAC vrednosti su najviše za molekule DOPAC i L-DOPA što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim DPPH testom. Ovakav rezultat pokazuje da su isti strukturni parametri značajni za antiradikalnu aktivnost ovih jedinjenja. Zaključeno je da zamena

karboksilne grupe amino grupom, koja je slabiji donor protona, dovodi do smanjenja aktivnosti (norepinefrin, epinefrin i dopamin). Rezultati takođe ukazuju na to da gubitak jedne hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu smanjuje aktivnost molekula dva puta. Zbog strukture ABTS radikal-katjona dominantan mehanizam je SET-PT, za koji je konstanta brzine prvog koraka od 10^{-4} do $10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, što odgovara eksperimentalno određenom vremenu trajanja reakcije. Prenos protona u drugom koraku nije ograničavajući faktor zbog egzotermnosti samog procesa.

Zbog velike biološke važnosti **hidroksil-radikala** ispitana je aktivnost 11 odabranih neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita prema ovom radikalu. Prooksidaciona aktivnost molekula sa kateholom strukturom je bila dominantna na $\text{pH}=3,3$. Ovo je objašnjeno prenosom elektrona sa kateholne jedinice na Fe(III) jone koji se redukuju do Fe(II) jona. Ovakav rezultat pokazuje da se pod datim uslovima stvara veća količina radikala koja zavisi od koncentracije molekula sa kateholnom jedinicom. Za koncentracije molekula iznad $0,1 \text{ mM}$ intenzitet rezonantnog maksimuma $\text{DEPMPO-OH}^{\bullet}$ adukta je opadao zbog izraženije antiradikalske aktivnosti, odnosno veće količine nekompleksiranih molekula. Pokazano je da homovanilinska kiselina, oktopamin i VMA ne kompleksiraju Fe(III) jone i da pri malim koncentracijama dominantno ispoljavaju antiradikalnu aktivnost. Prilikom ispitivanja reakcija u fosfatnom puferu, na $\text{pH}=7,8$, pokazano je smanjenje intenziteta rezonantnog maksimuma $\text{DEPMPO-OH}^{\bullet}$ adukta pri dodatku odabranih supstanci nezavisno do prisustva kateholne jedinice. Najveću reaktivnost, smanjenje intenziteta rezonantnog maksimuma od 64 do 80%, su pokazali norepinefrin, epinefrin, dopamin, L-DOPA i DOPAC. Metaboliti neurotransmitera takođe su pokazali značajnu reaktivnost prema hidroksi-radikalu sa smanjenjem intenziteta rezonantnog maksimuma adukta od 40 do 60%. Dobijeni rezultati ukazuju na značaj hidroksilnih grupa alifatičnog i aromatičnog dela molekula i veliku reaktivnost ispitivanog radikala prema biološki važnim molekulima. Reaktivnost ispitivanih supstanci prema hidroksi-radikalu je dokazana i teorijski kroz izračunavanje promene entalpija reakcija u različitim mehanizmima, uz pretpostavku da je hidroksilnu grupu u *para*-položaju grupa koja reaguje. Rezultati ukazuju da su HAT i SPLET mehanizmi termodinamički povoljni, pri čemu su vrednosti za ΔH_{BDE} između -130 i -157 kJ/mol a za ΔH_{PA} između -57 i -79 kJ/mol . Zaključeno je da bi bilo potrebno izračunati i kinetičke

parametre kako bi se odredio najpovoljniji mehanizam reakcije hidroksi-radikala sa ispitivanim molekulima.

Rezultati određivanja antiradikalske aktivnosti prema **askorbil-radikal**u primenom EPR spektroskopije pokazuju da je procenat redukcije ovog radikala 35% za norepinefrin, 34% za DOPAC, 27% za VMA i homovanilinsku kiselinu i 23% za oktopamin. Poređenjem strukturnih parametara jedinjenja zaključeno je da zamena jedne hidroksilne grupe metoksilnom grupom smanjuje procenat redukcije za 8%. Rezultati teorijske analize ukazuju na to da su reakcije sa pomenutim radikalom, prema HAT mehanizmu i u oba rastvarača, termodinamički povoljne za L-DOPA, DOPAC, dopamin i norepinefrin, što potvrđuju i eksperimentalni rezultati. Povećanje vrednosti termodinamičkih parametara koje je izračunato kod ostalih molekula dokazuje važnost kateholne strukture i u reakcijama sa askorbil-radikalom. Ovaj rezultat je značajan zato što može biti indikacija mogućnosti odigravanja reakcije između askorbil-radikala i neurotransmitera *in vivo*. U datim reakcijama nastaju hinoni i semi-hinoni koji se usko povezuju sa nastankom neuromelanina kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću.

Cikličnom voltametrijom je pokazano je da postoji linearna zavisnost smanjenja površine anodnog maksimuma redukcije **superoksid radikal-anjona** od koncentracije dodatog gasioca. Na ciklovoltamogramima je primećeno i postojanje predmaksimuma koji ukazuje na mehanizam prenosa atoma vodonika, koji je posebno izražen kod molekula sa kateholnom strukturom i kod 6-hidroksidopamina. Na osnovu bliske vrednosti nagiba zavisnosti promene površine anodnog maksimuma od koncentracije zaključeno je da dodatna hidroksilna grupa na aromatičnom prstenu ili alifatičnom nizu, kao i prisustvo karboksilne grupe, ne utiču značajno na aktivnost molekula prema ovom radikal. Rezultati pokazuju i da zamena, ili gubitak jedne hidroksilne grupe kateholne jedinice metoksilnom grupom, dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti prema superoksid radikal-anjonu.

Na osnovu termodinamičkih parametara reakcija sa hlorovanim **metilperoksi-radikalima** je konstatovano da spinska gustina opada, a naelektrisanje raste, sa povećanjem broja hlorovih atoma što uslovljava najveću reaktivnosti trihlormetilperoksi-radikala. Vrednosti promene entalpije pri nastanku radikal-adukta opadaju sa brojem atoma hlora, pri čemu su te vrednosti veće od termodinamičkih parametara za prve korake ostalih mehanizama. Na osnovu promene entalpije reakcija ispitivanih jedinjenja sa

metilperoksi-radikalom zaključeno je da su HAT i SPLET konkurentski mehanizmi u vodi. Vrednosti konstante brzine reakcija za prvi korak SPLET mehanizma su $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, na osnovu čega je zaključeno da je ovo kinetički i termodinamički najpovoljniji reakcioni put. Raspodela naelektrisanja na metilperoksi-radikalu takođe objašnjava proces prenosa protona praćen prenosom elektrona. Konstatovano je da je, u slučaju trihlormetilperoksi-radikala, HAT termodinamički najpovoljniji mehanizam u vodi. Za proračune u benzenu pokazano je da je SPLET mehanizam dominantan za metilperoksi-radikal, dok je HAT dominantan za ostale radikale.

Vezivanje odabranih neurotransmitera i njihovih metabolita za **goveđi serum albumin** je praćeno spektrofotometrijski. Na osnovu brzog zasićenja i prestanka pada intenziteta fluorescentne emisije može se zaključiti da se ispitivne supstance relativno slabo vezuju za BSA. Pretpostavljeno je da pri niskim koncentracijama supstanci razlike u strukturnim parametrima ne utiču značajno na proces gašenja fluorescencije BSA. Metodom molekuskog dokinga je teorijski analizirana mogućnost vezivanja ispitivanih molekula za BSA. Rezultati ukazuju da dopamin, norepinefrin, DOPAC, homovanilinska kiselina, 3-MT i oktopamin, imaju bliske energije vezivanja, između -3,3 i -12,7 kJ/mol, ukoliko se posmatraju interakcije sa celim proteinom, odnosno između -11,5 i -16,2 kJ/mol, ukoliko su interakcije ograničene na aktivno mesto proteina u okolini triptofana (TRP134). Rezultati pokazuju da na aktivnom mestu proteina ovi molekuli grade vodonične veze preko polarnih grupa. Značajan doprinos vezivanju ovih molekula za proteine daju i π -alkil i π - π steking interakcije, koje ne zavise značajno od prisustva druge hidroksilne grupe. Pomenute interakcije dovode do promene konformacije molekula neurotransmitera i njihovih metabolita u okruženju proteina.

Kristalografska struktura novosintetisanog jedinjenja, **3-(1-((3,4-Dihidroksifenil)amino)etiliden)-hroman-2,4-diona**, je iskorišćena kao polazna geometrija za optimizaciju funkcionalima B3LYP, B3LYP-D3BJ, B3PQ91, M06-2X i M05-2X. Funkcional M05-2X je pokazao najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima dobijenim za dužine i uglove veza. Poređenje eksperimentalnih i izračunatih NMR spektara je pokazalo da odabrani funkcional dobro opisuje strukturu jedinjenja, sa srednom vrednošću apsolutne greške određivanja hemijskog pomeraja od 0,22 i 2,9 ppm za ^1H i ^{13}C NMR spektre, respektivno. Antitumorska aktivnost, novosintetisanog jedinjenja i 4-hidroksikumarina, je određena prema ćelijskim linijama: zdravi keratinociti

HaCaT, cervikalni karcinom SiHa, kacinom dojke MCF7 i hepatocelularni karcinom HepG2. Molekul 4-hidroksikumarina smanjuje procenat zdravih ćelija za 15% dok. Najveću aktivnost, pri koncentraciji od 500 μ M, 4-hidroksikumarin ispoljava prema MCF7 ćelijama čiji broj smanjuje za 20%. Sintetisani derivat ima veću aktivnost i prema zdravim i prema ćelijama tumora. Pri koncentraciji od 500 μ M smanjenje broja ćelija je 45% za SiHa, 57% za MCF7 i 57% za HepG2. Rezultati molekulskog dokinga sa ciklin-zavisnom kinazom su pokazali da je razlika u reaktivnosti 4-hidroksikumarina i dobijenog derivata posledica povećane fleksibilnosti derivata, odnosno većeg broja interakcija koje derivat ostvaruje sa aminokiselinama aktivnog mesta proteina. Na osnovu analize interakcija zaključeno je da su najznačajnije hidrofobne π - σ interakcije uočene sa izoleucinom i prolinom, kao i vodonične veze sa asparaginskom kiselinom, treoninom, valinom, alaninom i histidinom.

9. Literatura

- [1] B. Halliwell, B. Halliwell, Free Radicals and Other Reactive Species in Disease, in: ELS, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2015: pp. 1–9.
- [2] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Clarendon Press, Oxford, 1999.
- [3] A. Gomes, E. Fernandes, J.L.F.C. Lima, Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, J. Biochem. Biophys. Methods. 65 (2005) 45–80.
- [4] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, Br. J. Pharmacol. 142 (2004) 231–255.
- [5] S.I. Liochev, Reactive oxygen species and the free radical theory of aging, Free Radic. Biol. Med. 60 (2013) 1–4.
- [6] C.L. Murrant, M.B. Reid, Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle, Microsc. Res. Tech. 55 (2001) 236–248.
- [7] B. Uttara, A. V. Singh, P. Zamboni, R.T. Mahajan, Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options, Curr. Neuropharmacol. 7 (2009) 65–74.
- [8] M. Deborde, U. von Gunten, Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—Kinetics and mechanisms: A critical review, Water Res. 42 (2008) 13–51.
- [9] E. Niki, Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects, Free Radic. Biol. Med. 47 (2009) 469–484.
- [10] R.S. Pardini, Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants, Arch. Insect Biochem. Physiol. 29 (1995) 101–118.
- [11] A. Galano, Free Radicals Induced Oxidative Stress at a Molecular Level: The Current Status, Challenges and Perspectives of Computational Chemistry Based Protocols, J. Mex. Chem. Soc. 59 (2015) 231–262.

- [12] V.A. Roginsky, H.B. Stegmann, Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities, *Free Radic. Biol. Med.* 17 (1994) 93–103.
- [13] P. Wardman, Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 995–1022.
- [14] M.J. Gray, W.-Y. Wholey, U. Jakob, Bacterial responses to reactive chlorine species., *Annu. Rev. Microbiol.* 67 (2013) 141–160.
- [15] Y.-R. Zhang, X.-P. Chen, Jing-Shao, J.-Y. Zhang, Q. Yuan, J.-Y. Miao, B.-X. Zhao, A ratiometric fluorescent probe for sensing HOCl based on a coumarin-rhodamine dyad, *Chem. Commun. (Camb)*. 50 (2014) 14241–14244.
- [16] C.C. Winterbourn, A.J. Kettle, Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome, *Antioxid Redox Signal*. 18 (2013) 642–660.
- [17] A.C. Carr, M.C. Vissers, N.M. Domigan, C.C. Winterbourn, Modification of red cell membrane lipids by hypochlorous acid and haemolysis by preformed lipid chlorohydrins., *Redox Rep.* 3 (1996) 263–271.
- [18] T.F. Slater, Free Radicals as Reactive Intermediates in Tissue Injury, in: *Biol. React. Intermed. Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer US, 1982: pp. 575–589.
- [19] M.G. Simic, D.S. Bergtold, L.R. Karam, Generation of oxy radicals in biosystems, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 214 (1989) 3–12.
- [20] T.J. Hill, E.J. Land, D.J. McGarvey, W. Schalch, J.H. Tinkler, T.G. Truscott, Interactions between Carotenoids and the $\text{CCl}_3\text{O}_2^{\bullet}$ Radical, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 8322–8326.
- [21] M.P. Germanò, R. Santogo, C. Costa, R. Fulco, V. D’Angelo, E.A. Torre, M.G. Viscomi, R. De Pasquale, Hepatoprotective Properties in the Rat of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae), *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999) 729–734.
- [22] T.F. Slater, *Biochemical mechanisms of liver injury*, Academic Press, New York, 1978.

- [23] F.F. Ahmad, D.L. Cowan, A.Y. Sun, Detection of free radical formation in various tissues after acute carbon tetrachloride administration in gerbil, *Life Sci.* 41 (1987) 2469–2475.
- [24] Y. Ohta, K. Nishida, E. Sasaki, M. Kongo, I. Ishiguro, Attenuation of disrupted hepatic active oxygen metabolism with the recovery of acute liver injury in rats intoxicated with carbon tetrachloride, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 95 (1997) 191–207.
- [25] F. Ozturk, M. Ucar, I.C. Ozturk, N. Vardi, K. Batcioglu, Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats, *Urology.* 62 (2003) 353–356.
- [26] L.G. Forni, J.E. Packer, T.F. Slater, R.L. Willson, Reaction of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: A pulse radiolysis study, *Chem. Biol. Interact.* 45 (1983) 171–177.
- [27] J.E. Packer, J.S. Mahood, R.L. Willson, B.S. Wolfenden, Reactions of the Trichloromethylperoxy Free Radical ($\text{Cl}_3\text{COO}^\bullet$) with Tryptophan, Tryptophanyl-tyrosine and Lysozyme, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Physics, Chem. Med.* 39 (1981) 135–141.
- [28] M.R. Cholbi, M. Paya, M.J. Alcaraz, Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl_4 -induced microsomal lipid peroxidation, *Experientia.* 47 (1991) 195–199.
- [29] Z. Yaping, Q. Suping, Y. Wenli, X. Zheng, S. Hong, Y. Side, W. Dapu, Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$, *Food Chem.* 77 (2002) 209–212.
- [30] K.-O. Hiller, P.L. Hodd, R.L. Willson, Antiinflammatory drugs: Protection of a bacterial virus as an in vitro biological measure of free radical activity, *Chem. Biol. Interact.* 47 (1983) 293–305.
- [31] P. Neta, R.E. Huie, P. Maruthamuthu, S. Steenken, Solvent effects in the reactions of peroxy radicals with organic reductants: evidence for proton-transfer-mediated electron transfer, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 7654–7659.

- [32] P.T. Lynett, K. Butts, V. Vaidya, G.E. Garrett, D.A. Pratt, The mechanism of radical-trapping antioxidant activity of plant-derived thiosulfates, *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 3320–3330.
- [33] R. Serwa, T. Nam, L. Valgimigli, S. Culbertson, C.L. Rector, B.-S. Jeong, D.A. Pratt, N.A. Porter, Preparation and Investigation of Vitamin B6-Derived Aminopyridinol Antioxidants, *Chem. - A Eur. J.* 16 (2010) 14106–14114.
- [34] G.I. Giles, K.M. Tasker, C. Jacob, Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1279–1283.
- [35] M.C.H. Gruhlke, A.J. Slusarenko, The biology of reactive sulfur species (RSS), *Plant Physiol. Biochem.* 59 (2012) 98–107.
- [36] J. Li, F.L. Huang, K.P. Huang, Glutathiolation of proteins by glutathione disulfide S-oxide derived from S-nitrosoglutathione. Modifications of rat brain neurogranin/RC3 and neuromodulin/GAP-43, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 3098–3105.
- [37] R.S. Glass, J.L. Broeker, E. Anklam, K.-D. Asmus, Formation of sulfur-centered cation radicals by photofragmentation, *Tetrahedron Lett.* 33 (1992) 1721–1724.
- [38] G. Wenska, P. Filipiak, K.-D. Asmus, K. Bobrowski, J. Koput, B. Marciniak, Formation of a Sandwich-Structure Assisted, Relatively Long-Lived Sulfur-Centered Three-Electron Bonded Radical Anion in the Reduction of a Bis(1-substituted-uracilyl) Disulfide in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 10045–10053.
- [39] Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, D. Offen, Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier, *Neuropharmacology.* 40 (2001) 959–75.
- [40] M. Raiteri, R. Del Carmine, A. Bertollini, G. Levi, Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine, *Eur. J. Pharmacol.* 41 (1977) 133–143.
- [41] B. Borowsky, N. Adham, K.A. Jones, R. Raddatz, R. Artymyshyn, K.L. Ogozalek, M.M. Durkin, P.P. Lakhlani, J.A. Bonini, S. Pathirana, N. Boyle, X. Pu, E. Kouranova, H. Lichtblau, F.Y. Ochoa, T.A. Branchek, C. Gerald, Trace amines:

Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 8966–8971.

[42] A.A. Boulton, Trace Amines and Mental Disorders, *Can. J. Neurol. Sci. / J. Can. Des Sci. Neurol.* 7 (1980) 261–263.

[43] J. Bergman, S. Yasar, G. Winger, Psychomotor stimulant effects of β -phenylethylamine in monkeys treated with MAO-B inhibitors, *Psychopharmacology (Berl)*. 159 (2001) 21–30.

[44] B.A. Davis, A.A. Boulton, The trace amines and their acidic metabolites in depression — an overview, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 18 (1994) 17–45.

[45] T.A. Branchek, T.P. Blackburn, Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3 (2003) 90–97.

[46] M. Seydou, G. Grégoire, J. Liquier, J. Lemaire, J.P. Schermann, C. Desfrancois, Experimental Observation of the Transition between Gas-Phase and Aqueous Solution Structures for Acetylcholine, Nicotine, and Muscarine Ions, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 4187–4195.

[47] C. Muñoz-Caro, A. Niño, M. Mora, S. Reyes, F.J. Melendez, M.E. Castro, Conformational population distribution of acetylcholine, nicotine and muscarine in vacuum and solution, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 726 (2005) 115–124.

[48] G. Liapakis, J.A. Ballesteros, S. Papachristou, W.C. Chan, X. Chen, J.A. Javitch, The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 37779–88.

[49] V. Katritch, K.A. Reynolds, V. Cherezov, M.A. Hanson, C.B. Roth, M. Yeager, R. Abagyan, Analysis of full and partial agonists binding to β 2-adrenergic receptor suggests a role of transmembrane helix V in agonist-specific conformational changes, *J. Mol. Recognit.* 22 (2009) 307–318.

[50] M. Yoshimi, G. Yoshio, Is l-dopa an endogenous neurotransmitter?, *Trends Pharmacol. Sci.* 14 (1993) 119–123.

- [51] F. Tison, N. Mons, S. Rouet-Karama, M. Geffard, P. Henry, Endogenous L-DOPA in the rat dorsal vagal complex: an immunocytochemical study by light and electron microscopy, *Brain Res.* 497 (1989) 260–270.
- [52] N. Cheng, T. Maeda, T. Kume, S. Kaneko, H. Kochiyama, A. Akaike, Y. Goshima, Y. Misu, Differential neurotoxicity induced by l-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons, *Brain Res.* 743 (1996) 278–283.
- [53] J.W. Olney, C.F. Zorumski, G.R. Stewart, M.T. Price, G. Wang, J. Labruyere, Excitotoxicity of l-DOPA and 6-OH-DOPA: Implications for Parkinson's and Huntington's diseases, *Exp. Neurol.* 108 (1990) 269–272.
- [54] T. Maeda, N. Cheng, T. Kume, S. Kaneko, H. Kouchiyama, A. Akaike, M. Ueda, M. Satoh, Y. Goshima, Y. Misu, l-DOPA neurotoxicity is mediated by glutamate release in cultured rat striatal neurons, *Brain Res.* 771 (1997) 159–162.
- [55] J.R. Cooper, F.E. Bloom, R.H. Roth, *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Oxford University Press, New York, 1986.
- [56] W. Birkmayer, P. Riederer, *Understanding the Neurotransmitters: Key to the Workings of the Brain*, Springer-Verlag, New York, 1989.
- [57] M. Goodall, H. Alton, Metabolism of 3-hydroxytyramine (dopamine) in human subjects., *Biochem. Pharmacol.* 17 (1968) 905–914.
- [58] D.J. Erdelyi, M. Elliott, B. Phillips, Urine catecholamines in paediatrics, *Arch. Dis. Child. - Educ. Pract.* 96 (2011) 107–111.
- [59] K. Sadilkova, K. Dugaw, D. Benjamin, R.M. Jack, Analysis of vanillylmandelic acid and homovanillic acid by UPLC-MS/MS in serum for diagnostic testing for neuroblastoma, *Clin. Chim. Acta.* 424 (2013) 253–257.
- [60] L.J. Gregianin, A.C. McGill, C.M. Pinheiro, A.L. Brunetto, Vanilmandelic acid and homovanillic acid levels in patients with neural crest tumor: 24-hour urine collection versus random sample., *Pediatr. Hematol. Oncol.* 14 (1997) 259–265.
- [61] F.W. Sunderman, Measurements of vanilmandelic acid for the diagnosis of pheochromocytoma and neuroblastoma, *Am. J. Clin. Pathol.* 42 (1964) 481–497.

- [62] C.F. Geiser, M.L. Efron, Cystathioninuria in patients with neuroblastoma or ganglioneuroblastoma. Its correlation to vanilmandelic acid excretion and its value in diagnosis and therapy, *Cancer*. 22 (1968) 856–860.
- [63] J. Segura-Aguilar, P. Muñoz, I. Paris, Aminochrome as New Preclinical Model to Find New Pharmacological Treatment that Stop the Development of Parkinson's Disease, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 346–359.
- [64] I.J. Kopin, Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance., *Pharmacol. Rev.* 37 (1985) 333–364.
- [65] W. Ambroziak, R. Pietruszko, Human aldehyde dehydrogenase: Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13011–13018.
- [66] Y. Tang, S. Nakashima, S. Saiki, Y. Myoi, N. Abe, S. Kuwazuru, B. Zhu, H. Ashida, Y. Murata, Y. Nakamura, 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides, *Food Res. Int.* 89 (2016) 716–723.
- [67] A.R. Rechner, G. Kuhnle, P. Bremner, G.P. Hubbard, K.P. Moore, C.A. Rice-Evans, The metabolic fate of dietary polyphenols in humans, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 220–235.
- [68] J. Laranjinha, E. Cadenas, Oxidation of DOPAC by nitric oxide: effect of superoxide dismutase, *J. Neurochem.* 81 (2002) 892–900.
- [69] C. Nunes, L. Almeida, J. Laranjinha, Synergistic inhibition of respiration in brain mitochondria by nitric oxide and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC): Implications for Parkinson's disease, *Neurochem. Int.* 47 (2005) 173–182.
- [70] Q. Cui, Y. Pan, W. Zhang, Y. Zhang, S. Ren, D. Wang, Z. Wang, X. Liu, W. Xiao, Metabolites of Dietary Acteoside: Profiles, Isolation, Identification, and Hepatoprotective Capacities, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 2660–2668.
- [71] P. Luliński, M. Dana, D. Maciejewska, Synthesis and characterization of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid imprinted polymers, *Polym. Int.* 61 (2012) 631–638.

- [72] M.D. Armstrong, A. McMillan, K.N. Shaw, 3-Methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine, *Biochim. Biophys. Acta.* 25 (1957) 422–423.
- [73] J. Axelrod, J.K. Inscoe, S. Senoh, B. Witkop, O-methylation, the principal pathway for the metabolism of epinephrine and norepinephrine in the rat, *Biochim. Biophys. Acta.* 27 (1958) 210–211.
- [74] R.B. Young, A.M. Bongiovanni, C.E. Koop, W.R. Eberlein, Urinary vanilmandelic acid (VMA) excretion in children .Use of a simple semiquantitative test, *J. Pediatr.* 62 (1963) 844–854.
- [75] S.E. Gitlow, M. Mendlowitz, S. Khassis, G. Cohen, J. Sha, The diagnosis of pheochromocytoma by determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid, *J. Clin. Invest.* 39 (1960) 221–6.
- [76] F. Karoum, S.J. Chrapusta, M.F. Egan, 3-Methoxytyramine Is the Major Metabolite of Released Dopamine in the Rat Frontal Cortex: Reassessment of the Effects of Antipsychotics on the Dynamics of Dopamine Release and Metabolism in the Frontal Cortex, Nucleus Accumbens, and Striatum by a Simple T, *J. Neurochem.* 63 (2002) 972–979.
- [77] T.D. Sotnikova, J.-M. Beaulieu, S. Espinoza, B. Masri, X. Zhang, A. Salahpour, L.S. Barak, M.G. Caron, R.R. Gainetdinov, The dopamine metabolite 3-methoxytyramine is a neuromodulator, *PLoS One.* 5 (2010) e13452.
- [78] J.C. Fitzgerald, H. Plun-Favreau, Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: Autosomal-recessive genes in Parkinson's disease - A common pathway?, *FEBS J.* 275 (2008) 5758–5766.
- [79] S.W. Kim, H.S. Ko, V.L. Dawson, T.M. Dawson, Recent advances in our understanding of Parkinson's disease, *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 2 (2005) 427–433.
- [80] B.H.C. Westerink, S.J. Spaan, On the Significance of Endogenous 3-Methoxytyramine for the Effects of Centrally Acting Drugs on Dopamine Release in the Rat Brain, *J. Neurochem.* 38 (1982) 680–686.

- [81] G. Eisenhofer, D.S. Goldstein, R. Stull, Simultaneous liquid-chromatographic determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, catecholamines, and 3,4-dihydroxyphenylalanine in plasma, and their responses to inhibition of monoamine oxidase, *Clin. Chem.* 32 (1986) 3030–3033.
- [82] M. Peitzsch, D. Pelzel, S. Glöckner, A. Prejbisz, M. Fassnacht, F. Beuschlein, A. Januszewicz, G. Siegert, G. Eisenhofer, Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites, *Clin. Chim. Acta.* 418 (2013) 50–58.
- [83] J.W. Lenders, G. Eisenhofer, M. Mannelli, K. Pacak, Pheochromocytoma, *Lancet.* 366 (2005) 665–675.
- [84] G. Eisenhofer, J.W.M. Lenders, G. Siegert, S.R. Bornstein, P. Friberg, D. Milosevic, M. Mannelli, W.M. Linehan, K. Adams, H.J. Timmers, K. Pacak, Plasma methoxytyramine: A novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status, *Eur. J. Cancer.* 48 (2012) 1739–1749.
- [85] G. Eisenhofer, M. Peitzsch, Laboratory Evaluation of Pheochromocytoma and Paraganglioma, *Clin. Chem.* 60 (2014) 1486–1499.
- [86] J.W.M. Lenders, Q.-Y. Duh, G. Eisenhofer, A.-P. Gimenez-Roqueplo, S.K.G. Grebe, M.H. Murad, M. Naruse, K. Pacak, W.F. Young, Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) 1915–1942.
- [87] J.E. Stratton, R.W. Hutkins, S.L. Taylor, Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: A Review, *J. Food Prot.* 54 (1991) 460–470.
- [88] D.M. Linares, M. Martín, V. Ladero, M.A. Alvarez, M. Fernández, Biogenic Amines in Dairy Products, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51 (2011) 691–703.
- [89] I. Al Bulushi, S. Poole, H.C. Deeth, G.A. Dykes, Biogenic Amines in Fish: Roles in Intoxication, Spoilage, and Nitrosamine Formation—A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49 (2009) 369–377.
- [90] S.H. Snyder, *Drugs and the Brain*, Scientific American Library, New York, 1999.

- [91] G. Jonsson, K. Fuxe, T. Hökfelt, M. Goldstein, Resistance of central phenylethanolamine-n-methyl transferase containing neurons to 6-hydroxydopamine, *Med. Biol.* 54 (1976) 421–426.
- [92] R.N. Adams, Stein and Wise theory of schizophrenia: A possible mechanism for 6-hydroxydopamine formation In Vivo, *Behav. Biol.* 7 (1972) 861–866.
- [93] C.L. Blank, R.L. McCreery, R.M. Wightman, W. Chey, R.N. Adams, J.R. Reid, E.E. Smismán, Intracyclization rates of 6-hydroxydopamine and 6-aminodopamine analogs under physiological conditions, *J. Med. Chem.* 19 (1976) 178–180.
- [94] D. Richardson, L.W. Vitolo, E. Baker, J. Webb, Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues. Study of their stability in acidic, neutral and basic aqueous solutions by ultraviolet-visible spectrophotometry, *Biol. Met.* 2 (1989) 69–76.
- [95] J. Emerit, M. Edeas, F. Bricaire, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Biomed. Pharmacother.* 58 (2004) 39–46.
- [96] J.K. Andersen, Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?, *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (2004) S18–S25.
- [97] P. Salgado, V. Melin, Y. Durán, H. Mansilla, D. Contreras, The Reactivity and Reaction Pathway of Fenton Reactions Driven by Substituted 1,2-Dihydroxybenzenes, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 3687–3693.
- [98] V. Melin, A. Henríquez, C. Radojkovic, B. Schwederski, W. Kaim, J. Freer, D. Contreras, Reduction reactivity of catecholamines and their ability to promote a Fenton reaction, *Inorganica Chim. Acta.* 453 (2016) 1–7.
- [99] H. Watanabe, Y. Muramatsu, R. Kurosaki, M. Michimata, M. Matsubara, Y. Imai, T. Araki, Protective effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in mouse brain against MPTP neurotoxicity: an immunohistological study, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14 (2004) 93–104.
- [100] Y. Watanabe, H. Kato, T. Araki, Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease, *Metab. Brain Dis.* 23 (2008) 51–69.

- [101] M.A. Pappolla, Y.J. Chyan, R.A. Omar, K. Hsiao, G. Perry, M.A. Smith, P. Bozner, Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo, *Am. J. Pathol.* 152 (1998) 871–877.
- [102] M. Sano, C. Ernesto, R.G. Thomas, M.R. Klauber, K. Schafer, M. Grundman, P. Woodbury, J. Growdon, C.W. Cotman, E. Pfeiffer, L.S. Schneider, L.J. Thal, A Controlled Trial of Selegiline, Alpha-Tocopherol, or Both as Treatment for Alzheimer's Disease, *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 1216–1222.
- [103] G.P. Reynolds, Developments in the drug treatment of schizophrenia, *Trends Pharmacol. Sci.* 13 (1992) 116–121.
- [104] L.I. Bruijn, M.K. Houseweart, S. Kato, K.L. Anderson, S.D. Anderson, E. Ohama, A.G. Reaume, R.W. Scott, D.W. Cleveland, Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1., *Science.* 281 (1998) 1851–1854.
- [105] R.F. Jameson, G. Hunter, T. Kiss, ¹H nuclear magnetic resonance study of the deprotonation of the catecholamines in solution: the microconstants for the deuteriation of L-dopa in D₂O, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1978) 768-769.
- [106] P. Šolmajer, Conformational Study of Catecholamines in Solution, *Zeitschrift Für Naturforsch. C.* 38 (1983) 758–762.
- [107] P.I. Nagy, G. Alagona, C. Ghio, Theoretical Studies on the Conformation of Protonated Dopamine in the Gas Phase and in Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 4804–4815.
- [108] J.J. Urban, C.J. Cramer, G.R. Famini, A Computational Study of Solvent Effects on the Conformation of Dopamine, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 8226–8231.
- [109] B. Pullman, J.L. Coubeils, P. Courrière, J.P. Gervois, Quantum mechanical study of the conformational properties of phenethylamines of biochemical and medicinal interest., *J. Med. Chem.* 15 (1972) 17–23.
- [110] L.B. Kier, E.B. Truitt, The preferred conformation of dopamine from molecular orbital theory, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 174 (1970) 94-98.

- [111] M.P. Aliste, B.K. Cassels, Computational study on the conformations of dopamine, its α - and ortho-methylated derivatives and their N-protonated forms, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2001) 906–915.
- [112] D. Dougherty, D. Stauffer, Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition, *Science* 250 (1990) 1558–1560.
- [113] J.J. Urban, C.W. Cronin, R.R. Roberts, G.R. Famini, Conformational preferences of 2-phenethylamines. A computational study of substituent and solvent effects on the intramolecular amine-aryl interactions in charged and neutral 2-phenethylamines, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 12292–12299.
- [114] C. Cabezas, I. Peña, J.C. López, J.L. Alonso, Seven Conformers of Neutral Dopamine Revealed in the Gas Phase, *J. Phys. Chem. Lett.* 4 (2013) 486–490.
- [115] S.K. Callear, A. Johnston, S.E. McLain, S. Imberti, Conformation and interactions of dopamine hydrochloride in solution, *J. Chem. Phys.* 142 (2015) 014502.
- [116] S. Corona-Avendaño, G. Alarcón-Angeles, G. a. Rosquete-Pina, A. Rojas-Hernández, A. Gutierrez, M.T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardavé, New insights on the nature of the chemical species involved during the process of dopamine deprotonation in aqueous solution: Theoretical and experimental study, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 1640–1647.
- [117] H. Lu, X. Chen, C.-G. Zhan, First-Principles Calculation of pKa for Cocaine, Nicotine, Neurotransmitters, and Anilines in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 10599–10605.
- [118] P.I. Nagy, K. Takács-Novák, Tautomeric and conformational equilibria of biologically important (hydroxyphenyl)alkylamines in the gas phase and in aqueous solution, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 2838–2848.
- [119] S.A. Andujar, R.D. Tosso, F.D. Suvire, E. Angelina, N. Peruchena, N. Cabedo, D. Cortes, R.D. Enriz, Searching the “Biologically Relevant” Conformation of Dopamine: A Computational Approach, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 99–112.

- [120] A. Lagutschenkov, J. Langer, G. Berden, J. Oomens, O. Dopfer, Infrared spectra of protonated neurotransmitters: dopamine, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 2815–2823.
- [121] N. Misra, Vibrational Dynamics and Potential Energy Distribution of Two Well-Known, *J. Theor. Comput. Chem.* 8 (2009) 433–450.
- [122] O. Jha, T.K. Yadav, R.A. Yadav, Structural and vibrational study of a neurotransmitter molecule: Dopamine [4-(2-aminoethyl) benzene-1,2-diol], *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 189 (2018) 473–484.
- [123] T. Yadav, V. Mukherjee, Interpretation of IR and Raman spectra of dopamine neurotransmitter and effect of hydrogen bond in HCl, *J. Mol. Struct.* 1160 (2018) 256–270.
- [124] G. Alagona, C. Ghio, Competitive H-bonds in vacuo and in aqueous solution for N-protonated adrenaline and its monohydrated complexes, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 811 (2007) 223–240.
- [125] T. van Mourik, The shape of neurotransmitters in the gas phase: A theoretical study of adrenaline, pseudoadrenaline, and hydrated adrenaline, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 2827–2837.
- [126] P. ÇarÇabal, L.C. Snoek, T. Van Mourik, A computational and spectroscopic study of the gas-phase conformers of adrenaline, *Mol. Phys.* 103 (2005) 1633–1639.
- [127] T. van Mourik, On the relative stability of two noradrenaline conformers, *Chem. Phys. Lett.* 414 (2005) 364–368.
- [128] L.C. Snoek, T. van Mourik, P. ÇarÇabal, J.P. Simons, Neurotransmitters in the gas phase: hydrated noradrenaline, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5 (2003) 4519–4526.
- [129] P.I. Nagy, G. Alagona, C. Ghio, K. Takács-Novák, Theoretical Conformational Analysis for Neurotransmitters in the Gas Phase and in Aqueous Solution. Norepinephrine, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 2770–2785.

- [130] L.C. Snoek, T. Van Mourik, J.P. Simons, Neurotransmitters in the gas phase: a computational and spectroscopic study of noradrenaline, *Mol. Phys.* 101 (2003) 1239–1248.
- [131] W. Chin, F. Piuze, I. Dimicoli, M. Mons, Probing the competition between secondary structures and local preferences in gas phase isolated peptide backbones, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 1033–1048.
- [132] E.G. Robertson, J.P. Simons, Getting into shape: Conformational and supramolecular landscapes in small biomolecules and their hydrated clusters, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001) 1–18.
- [133] J.P. Simons, Good vibrations: probing biomolecular structure and interactions through spectroscopy in the gas phase, *Mol. Phys.* 107 (2009) 2435–2458.
- [134] D.M. Benoit, Fast vibrational calculation of anharmonic OH-stretch frequencies for two low-energy noradrenaline conformers, *J. Chem. Phys.* 129 (2008) 234304.
- [135] H. Wako, S. Ishiuchi, D. Kato, G. Féraud, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, M. Fujii, A conformational study of protonated noradrenaline by UV–UV and IR dip double resonance laser spectroscopy combined with an electrospray and a cold ion trap method, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 10777–10785.
- [136] G. Alagona, C. Ghio, Interplay of intra- and intermolecular H-bonds for the addition of a water molecule to the neutral and N-protonated forms of noradrenaline, *Int. J. Quantum Chem.* 90 (2002) 641–656.
- [137] T. Yadav, V. Mukherjee, Structural confirmation and spectroscopic study of a biomolecule: Norepinephrine, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 202 (2018) 222–237.
- [138] S. Ishiuchi, H. Mitsuda, T. Asakawa, M. Miyazaki, M. Fujii, Conformational reduction of DOPA in the gas phase studied by laser desorption supersonic jet laser spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 7812–7820.
- [139] B. Edwin, I. Hubert Joe, Vibrational spectral analysis of anti-neurodegenerative drug Levodopa: A DFT study, *J. Mol. Struct.* 1034 (2013) 119–127.

- [140] S.A.K. Elroby, M.S.I. Makki, T.R. Sobahi, R.H. Hilal, Toward the understanding of the metabolism of levodopa I. DFT Investigation of the equilibrium geometries, acid-base properties and levodopa-water complexes, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 4321–4339.
- [141] G.M. Sukker, S.A. Elroby, R. Hilal, Gas-phase acidity and dynamics of the protonation processes of carbidopa and levodopa. A QM/QD study, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 34 (2016) 2268–2280.
- [142] S.A.K. Elroby, A.A. Ahmed, R.H. Hilal, Conformational preference and mechanism of decarboxylation of levodopa. A quantum dynamics/quantum mechanics study, *Int. J. Quantum Chem.* 113 (2013) 1966–1974.
- [143] A.J. Lopes Jesus, S. Jarmelo, R. Fausto, I. Reva, Conformational preferences of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 140 (2015) 54–64.
- [144] W. Forner, H.M. Badawi, Analysis of the vibrational spectra of 3,4-dihydroxy- and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acids and the ring breathing mode in their raman spectra, *J. Theor. Comput. Chem.* 10 (2011) 711–730.
- [145] H. Mitsuda, M. Miyazaki, I.B. Nielsen, P. Çarçabal, C. Dedonder, C. Jouvet, S. Ishiuchi, M. Fujii, Evidence for Catechol Ring- Induced Conformational Restriction in Neurotransmitters, *J. Phys. Chem. Lett.* 1 (2010) 1130–1133.
- [146] Y. Shimozone, K. Yamada, S. Ishiuchi, K. Tsukiyama, M. Fujii, Revised conformational assignments and conformational evolution of tyrosine by laser desorption supersonic jet laser spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 5163–5175.
- [147] Y. Inokuchi, Y. Kobayashi, T. Ito, T. Ebata, Conformation of l-Tyrosine Studied by Fluorescence-Detected UV–UV and IR–UV Double-Resonance Spectroscopy, *J. Phys. Chem A* 111 (2007) 3209–3215.
- [148] A. Lindinger, J.P. Toennies, A.F. Vilesov, High resolution vibronic spectra of the amino acids tryptophan and tyrosine in 0.38 K cold helium droplets, *J. Chem. Phys.* 110 (1999) 1429.
- [149] L.I. Grace, R. Cohen, T. Dunn, D.M. Lubman, M.S. de Vries, The R2PI Spectroscopy of Tyrosine: A Vibronic Analysis, *J. Mol. Spectrosc.* 215 (2002) 204–219.

- [150] S. Ishiuchi, H. Sone, M. Fujii, Laser Desorption Supersonic Jet Spectroscopy of Octopamine by Its Hydrochloride Salt, *Chem. Lett.* 42 (2013) 1166–1167.
- [151] S.A. Siddiqui, A. Dwivedi, N. Misra, N. Sundaraganesan, Computational note on vibrational spectra of Tyramine hydrochloride: DFT study, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 847 (2007) 101–102.
- [152] K. Makara, K. Misawa, M. Miyazaki, H. Mitsuda, S. Ishiuchi, M. Fujii, Vibrational Signature of the Conformers in Tyramine Studied by IR Dip and Dispersed Fluorescence Spectroscopies, *J. Phys. Chem. A.* 112 (2008) 13463–13469.
- [153] I. Yoon, K. Seo, S. Lee, Y. Lee, B. Kim, Conformational Study of Tyramine and Its Water Clusters by Laser Spectroscopy, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 1800–1807.
- [154] S. Melandri, A. Maris, Intramolecular hydrogen bonds and conformational properties of biogenic amines: A free-jet microwave study of tyramine, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 2863–2866.
- [155] R. Quevedo, N. Nuñez-Dallos, K. Wurst, Á. Duarte-Ruiz, A structural study of the intermolecular interactions of tyramine in the solid state and in solution, *J. Mol. Struct.* 1029 (2012) 175–179.
- [156] P.R. Richardson, S.P. Bates, A.C. Jones, A Molecular Orbital Study of the Conformational Properties of Tyramine and Phenethylamine, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 1233–1241.
- [157] M. Samsonowicz, M. Kowczyk-Sadowy, E. Regulska, W. Lewandowski, Molecular structure and spectroscopic analysis of homovanillic acid and its sodium salt – NMR, FT-IR and DFT studies, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 118 (2014) 1068–1074.
- [158] M. Samsonowicz, M. Kowczyk-Sadowy, J. Piekut, E. Regulska, W. Lewandowski, Spectroscopic characteristic (FT-IR, FT-Raman, UV, ¹H and ¹³C NMR), theoretical calculations and biological activity of alkali metal homovanillates, *J. Mol. Struct.* 1109 (2016) 1–12.

- [159] P.D. Godfrey, L.D. Hatherley, R.D. Brown, The Shapes of Neurotransmitters by Millimeter-Wave Spectroscopy: 2-Phenylethylamine, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 8204–8210.
- [160] J.A. Dickinson, M.R. Hockridge, R.T. Kroemer, E.G. Robertson, J.P. Simons, J. McCombie, M. Walker, Conformational Choice, Hydrogen Bonding, and Rotation of the $S_1 \leftarrow S_0$ Electronic Transition Moment in 2-Phenylethyl Alcohol, 2-Phenylethylamine, and Their Water Clusters, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 2622–2632.
- [161] S. Sun, E.R. Bernstein, Spectroscopy of Neurotransmitters and Their Clusters. 1. Evidence for Five Molecular Conformers of Phenethylamine in a Supersonic Jet Expansion, *J. Am. Chem. So.* 118 (1996) 5086–5095.
- [162] J.C. López, V. Cortijo, S. Blanco, J.L. Alonso, Conformational study of 2-phenylethylamine by molecular-beam Fourier transform microwave spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 4521–4527.
- [163] M.R. Hockridge, E.G. Robertson, Hydrated Clusters of 2-Phenylethyl Alcohol and 2-Phenylethylamine: Structure, Bonding, and Rotation of the $S_1 \leftarrow S_0$ Electronic Transition Moment, *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 3618–3628.
- [164] M. Mons, E.G. Robertson, L.C. Snoek, J.P. Simons, Conformations of 2-phenylethanol and its singly hydrated complexes: UV–UV and IR–UV ion-dip spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* 310 (1999) 423–432.
- [165] A. Bouchet, M. Schütz, B. Chiavarino, M. Elisa Crestoni, S. Fornarini, O. Dopfer, IR spectrum of the protonated neurotransmitter 2-phenylethylamine: dispersion and anharmonicity of the $\text{NH}_3^+ - \pi$ interaction, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 25742–25754.
- [166] M. Xie, Y. Qi, Y. Hu, Conformational Equilibrium and Hydrogen Bonding in Liquid 2-Phenylethylamine Explored by Raman Spectroscopy and Theoretical Calculations, *J. Phys. Chem. A.* 115 (2011) 3060–3067.
- [167] L.. Snoek, E.. Robertson, R.. Kroemer, J.. Simons, Conformational landscapes in amino acids: infrared and ultraviolet ion-dip spectroscopy of phenylalanine in the gas phase, *Chem. Phys. Lett.* 321 (2000) 49–56.

- [168] A. Kaczor, I. D. Reva, L. M. Proniewicz, R. Fausto, Importance of Entropy in the Conformational Equilibrium of Phenylalanine: A Matrix-Isolation Infrared Spectroscopy and Density Functional Theory Study, *J. Phys. Chem. A*. 110 (2006) 2360–2370.
- [169] K.T. Lee, J. Sung, K.J. Lee, Y.D. Park, S.K. Kim, Conformation-Dependent Ionization Energies of L-Phenylalanine, *Angew. Chemie Int. Ed.* 41 (2002) 4114–4117.
- [170] T. Hashimoto, Y. Takasu, Y. Yamada, T. Ebata, Anomalous conformer dependent S₁ lifetime of l-phenylalanine, *Chem. Phys. Lett.* 421 (2006) 227–231.
- [171] Jaime A. Stearns, Sébastien Mercier, Caroline Seaiby, Monia Guidi, Oleg V. Boyarkin, T.R. Rizzo, Conformation-Specific Spectroscopy and Photodissociation of Cold, Protonated Tyrosine and Phenylalanine, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 11814–11820.
- [172] K.T. Lee, J. Sung, K.J. Lee, S.K. Kim, Y.D. Park, Resonant two-photon ionization study of jet-cooled amino acid: L-phenylalanine and its monohydrated complex, *J. Chem. Phys.* 116 (2002) 8251.
- [173] İ. Gülçin, Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure–activity insight, *Chem. Biol. Interact.* 179 (2009) 71–80.
- [174] G. Cosa, J.C. Scaiano, Reactivity of adrenaline toward alkoxyl radicals and carbonyl triplet states, *Org. Biomol. Chem.* 6 (2008) 4609–4614.
- [175] T. Kawashima, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, Radical Scavenging Reactivity of Catecholamine Neurotransmitters and the Inhibition Effect for DNA Cleavage, *J. Phys. Chem. B*. 114 (2010) 675–680.
- [176] K. Ohkubo, Y. Moro-oka, S. Fukuzumi, Hydrogen abstraction from neurotransmitters by active oxygen species facilitated by intramolecular hydrogen bonding in the radical intermediates, *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 999–1001.
- [177] T. Shimizu, Y. Nakanishi, M. Nakahara, N. Wada, Y. Moro-Oka, T. Hirano, T. Konishi, S. Matsugo, Structure Effect on Antioxidant Activity of Catecholamines toward Singlet Oxygen and Other Reactive Oxygen Species in vitro, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 47 (2010) 181–190.

- [178] A. Kładna, P. Berczyński, I. Kruk, T. Michalska, H.Y. Aboul-Enein, Scavenging of hydroxyl radical by catecholamines, *Luminescence*. 27 (2012) 473–477.
- [179] C. Sârbu, D. Casoni, Comprehensive evaluation of biogenic amines and related drugs' antiradical activity using reactive 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, *Open Chem*. 11 (2013) 679–688.
- [180] K. Mukai, K. Nagai, Y. Egawa, A. Ouchi, S.I. Nagaoka, Kinetic Study of Aroxyl-Radical-Scavenging and α -Tocopherol-Regeneration Rates of Five Catecholamines in Solution: Synergistic Effect of α -Tocopherol and Catecholamines, *J. Phys. Chem. B*. 120 (2016) 7088–7097.
- [181] K. Jodko-Piórecka, G. Litwinienko, Antioxidant activity of dopamine and L-DOPA in lipid micelles and their cooperation with an analogue of α -tocopherol, *Free Radic. Biol. Med.* 83 (2015) 1–11.
- [182] P. Salgado, V. Melin, M. Albornoz, H. Mansilla, G. Vidal, D. Contreras, Effects of pH and substituted 1,2-dihydroxybenzenes on the reaction pathway of Fenton-like systems, *Appl. Catal. B Environ.* 226 (2018) 93–102.
- [183] A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy, A computational methodology for accurate predictions of rate constants in solution: Application to the assessment of primary antioxidant activity, *J. Comput. Chem.* 34 (2013) 2430–2445.
- [184] C. Iuga, J.R. Alvarez-Idaboy, A. Vivier-Bunge, ROS initiated oxidation of dopamine under oxidative stress conditions in aqueous and lipidic environments, *J. Phys. Chem. B*. 115 (2011) 12234–46.
- [185] W.L. Porter, E.D. Black, A.M. Drolet, Use of Polyamide Oxidative Fluorescence Test on Lipid Emulsions: Contrast in Relative Effectiveness of Antioxidants in Bulk Versus Dispersed Systems, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 615–624.
- [186] M.-E. Cuvelier, V. Bondet, C. Berset, Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: structure-Activity relationship, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 819–824.
- [187] R. Álvarez-Diduk, A. Galano, Adrenaline and Noradrenaline: Protectors against Oxidative Stress or Molecular Targets?, *J. Phys. Chem. B*. 119 (2015) 3479–3491.

- [188] Q. Zhang, Y. Ni, S. Kokot, Combined voltammetric and spectroscopic analysis of small molecule–biopolymer interactions: The levodopa and serum albumin system, *Talanta*. 88 (2012) 524–532.
- [189] Q. Zhang, Y. Ni, S. Kokot, Binding Interaction of Dopamine with Bovine Serum Albumin: A Biochemical Study, *Spectrosc. Lett.* 45 (2012) 85–92.
- [190] M.C. Foti, Use and Abuse of the DPPH[•] Radical, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 8765–8776.
- [191] M.S. Blois, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*. 181 (1958) 1199–1200.
- [192] S. Goldschmidt, K. Renn, Zweiwertiger Stickstoff: Über das α , α -Diphenyl- β -trinitrophenyl-hydrazyl. (IV. Mitteilung über Amin-Oxydation), *Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.* 55 (1922) 628–643.
- [193] J.X. Boucherle, B. Gillon, J. Maruani, J. Schweizer, Spin distribution in the diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical measured by neutron diffraction, *Mol. Phys.* 60 (1987) 1121–1142.
- [194] D.E. Williams, Crystal structure of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 4280–4287.
- [195] D.E. Williams, Structure of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical ¹, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 5665–5666.
- [196] M.C. Foti, C. Daquino, Kinetic and thermodynamic parameters for the equilibrium reactions of phenols with the dpph[•] radical, *Chem. Commun.* 30 (2006) 3252–3254.
- [197] E.N. Hristea, I.C. Covaci-Cîmpeanu, G. Ioniță, P. Ioniță, C. Draghici, M.T. Caăproiu, M. Hillebrand, T. Constantinescu, A.T. Balaban, Reactions of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with Two Syringylic Phenols or One Aroxide Derivative, *European J. Org. Chem.* 2009 (2009) 626–634.
- [198] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25–30.

- [199] M.C. Foti, C. Daquino, I.D. Mackie, G.A. DiLabio, K.U. Ingold, Reaction of Phenols with the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. Kinetics and DFT Calculations Applied To Determine ArO-H Bond Dissociation Enthalpies and Reaction Mechanism, *J. Org. Chem.* 73 (2008) 9270–9282.
- [200] M.C. Foti, R. Amorati, G.F. Pedulli, C. Daquino, D.A. Pratt, K.U. Ingold, Influence of “Remote” Intramolecular Hydrogen Bonds on the Stabilities of Phenoxyl Radicals and Benzyl Cations, *J. Org. Chem.* 75 (2010) 4434–4440.
- [201] R. Amorati, S. Menichetti, C. Viglianisi, M.C. Foti, Proton–electron transfer pathways in the reactions of peroxy and dp[•] radicals with hydrogen-bonded phenols, *Chem. Commun.* 48 (2012) 11904–11906.
- [202] F. Di Meo, V. Lemaire, J. Cornil, R. Lazzaroni, J.-L. Duroux, Y. Olivier, P. Trouillas, Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer, *J. Phys. Chem. A* 117 (2013) 2082–2092.
- [203] G. Litwinienko, K.U. Ingold, Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstractions. 1. The Reactions of Phenols with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dp[•]) in Alcohols, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 3433–3438.
- [204] D. Dimić, D. Milenković, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, Antiradical activity of catecholamines and metabolites of dopamine: Theoretical and experimental study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 12970–12980.
- [205] N.J. Christensen, K.P. Kepp, Setting the stage for electron transfer: Molecular basis of ABTS-binding to four laccases from *Trametes versicolor* at variable pH and protein oxidation state, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 100 (2014) 68–77.
- [206] F.-D. Munteanu, C. Basto, G.M. Gübitz, A. Cavaco-Paulo, Staining of wool using the reaction products of ABTS oxidation by Laccase: Synergetic effects of ultrasound and cyclic voltammetry, *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 363–367.
- [207] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.

- [208] J.M. Dimitrić Marković, Z.S. Marković, I.A. Pašti, T.P. Brdarić, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, A joint application of spectroscopic, electrochemical and theoretical approaches in evaluation of the radical scavenging activity of 3-OH flavones and their iron complexes towards different radical species, *Dalt. Trans.* 41 (2012) 7295-7303.
- [209] J.M. Dimitrić Marković, D. Milenković, D. Amić, M. Mojović, I. Pašti, Z.S. Marković, The preferred radical scavenging mechanisms of fisetin and baicalein towards oxygen-centred radicals in polar protic and polar aprotic solvents, *RSC Adv.* 4 (2014) 32228–32236.
- [210] J. Liu, J. Tian, W. He, J. Xie, Z. Hu, X. Chen, Spectrofluorimetric study of the binding of daphnetin to bovine serum albumin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 671–677.
- [211] K.F. Brown, M.J. Crooks, Displacement of tolbutamide, glibenclamide and chlorpropamide from serum albumin by anionic drugs, *Biochem. Pharmacol.* 25 (1976) 1175–1178.
- [212] T. Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Application*, Academic Press, San Diego, CA, 1995.
- [213] V.M. Rosenoer, M. Oratz, M.A. Rothschild, *Albumin Structure, Function and Uses*, Pergamon Press, New York, 1977.
- [214] Y. Moriyama, D. Ohta, K. Hachiya, Y. Mitsui, K. Takeda, Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: A comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins, *J. Protein Chem.* 15 (1996) 265–272.
- [215] CRYSTALIS PRO, (2017).
- [216] G.M. Sheldrick, IUCr, *SHELXT* – Integrated space-group and crystal-structure determination, *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* 71 (2015) 3–8.
- [217] G.M. Sheldrick, IUCr, Crystal structure refinement with *SHELXL*, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 71 (2015) 3–8.

- [218] L.J. Farrugia, *WinGX* suite for small-molecule single-crystal crystallography, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837–838.
- [219] A.L. Spek, IUCr, Structure validation in chemical crystallography, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 65 (2009) 148–155.
- [220] K. Brandenburg, *DIAMOND*, (2012).
- [221] J.A. Mead, J.N. Smith, R.T. Williams, Studies in detoxication. 72. The metabolism of coumarin and of o-coumaric acid, *Biochem. J.* 68 (1958) 67–74.
- [222] S. Rosselli, A.M. Maggio, N. Faraone, V. Spadaro, S.L. Morris-Natschke, K.F. Bastow, K.-H. Lee, M. Bruno, The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol, *Nat. Prod. Commun.* 4 (2009) 1701–1706.
- [223] Atta-ur-Rahman, M. Shabbir, S. Ziauddin Sultani, A. Jabbar, M. Iqbal Choudhary, Cinnamates and coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*, *Phytochemistry*. 44 (1997) 683–685.
- [224] R.W. Fuller, H.R. Bokesch, K.R. Gustafson, T.C. McKee, J.H. Cardellina, J.B. McMahon, G.M. Cragg, D.D. Soejarto, M.R. Boyd, HIV-inhibitory coumarins from latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4 (1994) 1961–1964.
- [225] C. Spino, M. Dodier, S. Sotheeswaran, Anti-HIV coumarins from *calophyllum* seed oil, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 3475–3478.
- [226] T. Hatano, T. Yasuhara, T. Fukuda, T. Noro, T. Okuda, Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase., *Chem. Pharm. Bull.* 37 (1989) 3005–3009.
- [227] F. Bourgaud, A. Hehn, R. Larbat, S. Doerper, E. Gontier, S. Kellner, U. Matern, Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes, *Phytochem. Rev.* 5 (2006) 293–308.

- [228] T. Ojala, S. Remes, P. Haansuu, H. Vuorela, R. Hiltunen, K. Haahtela, P. Vuorela, Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland, *J. Ethnopharmacol.* 73 (2000) 299–305.
- [229] F. Cottigli, G. Loy, D. Garau, C. Floris, M. Caus, R. Pompei, L. Bonsignore, Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L., *Phytomedicine.* 8 (2001) 302–305.
- [230] P.O. Patil, S.B. Bari, S.D. Firke, P.K. Deshmukh, S.T. Donda, D.A. Patil, A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 2434–2450.
- [231] S.A. Patil, S.N. Unki, P.S. Badami, In vitro antibacterial, antifungal, and DNA cleavage studies of coumarin Schiff bases and their metal complexes: synthesis and spectral characterization, *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 4017–4027.
- [232] D. Bhavsar, J. Trivedi, S. Parekh, M. Savant, S. Thakrar, A. Bavishi, A. Radadiya, H. Vala, J. Lunagariya, M. Parmar, L. Paresh, R. Loddo, A. Shah, Synthesis and in vitro anti-HIV activity of N-1,3-benzo[d]thiazol-2-yl-2-(2-oxo-2H-chromen-4-yl)acetamide derivatives using MTT method, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 3443–3446.
- [233] Y. Chen, H.-R. Liu, H.-S. Liu, M. Cheng, P. Xia, K. Qian, P.-C. Wu, C.-Y. Lai, Y. Xia, Z.-Y. Yang, S.L. Morris-Natschke, K.-H. Lee, Antitumor agents 292. Design, synthesis and pharmacological study of S- and O-substituted 7-mercapto- or hydroxy-coumarins and chromones as potent cytotoxic agents, *Eur. J. Med. Chem.* 49 (2012) 74–85.
- [234] A. Thakur, R. Singla, V. Jaitak, Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 476–495.
- [235] C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, Biological Evaluation of Several Coumarin Derivatives Designed as Possible Anti-inflammatory/Antioxidant Agents, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 18 (2003) 63–69.

- [236] C.A. Kontogiorgis, D.J. Hadjipavlou-Litina, Synthesis and Antiinflammatory Activity of Coumarin Derivatives, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 6400–6408.
- [237] S. Sukdolak, S. Solujić, N. Manojlović, N. Vuković, L.J. Krstić, Hantzsch reaction of 3-(2-bromoacetyl)-4-hydroxy-chromen-2-one. Synthesis of 3-(thiazol-4-yl)-4-hydroxy coumarines, *J. Heterocycl. Chem.* 41 (2004) 593–596.
- [238] J.B. Foresman, E. Frisch, *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian*, Gaussian, Inc., Pittsburg, 1993.
- [239] E.G. Lewars, *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*, Kluwer Academic Publishers, New York, 2003.
- [240] BIOVIA Discovery Studio 2016, (2016).
- [241] E. Schrödinger, An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules, *Phys. Rev.* 28 (1926) 1049–1070.
- [242] P. Hohenberg, W. Kohn, Inhomogeneous Electron Gas, *Phys. Rev.* 136 (1964) B864–B871.
- [243] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [244] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B.* 37 (1988) 785–789.
- [245] J.P. Perdew, J.A. Chevary, S.H. Vosko, K.A. Jackson, M.R. Pederson, D.J. Singh, C. Fiolhais, Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation, *Phys. Rev. B.* 46 (1992) 6671–6687.
- [246] S. Grimme, S. Ehrlich, L. Goerigk, Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory, *J. Comput. Chem.* 32 (2011) 1456–1465.
- [247] T. Yanai, D.P. Tew, N.C. Handy, A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP), *Chem. Phys. Lett.* 393 (2004) 51–57.

- [248] Y. Tawada, T. Tsuneda, S. Yanagisawa, T. Yanai, K. Hirao, A long-range-corrected time-dependent density functional theory, *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 8425–8433.
- [249] Y. Zhao, N.E. Schultz, D.G. Truhlar, Exchange-correlation functional with broad accuracy for metallic and nonmetallic compounds, kinetics, and noncovalent interactions, *J. Chem. Phys.* 123 (2005) 161103.
- [250] Yan Zhao, and Nathan E. Schultz, D.G. Truhlar, Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions, *J. Chem. Theory Comput.* 2 (2006) 364-382.
- [251] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function, *Theor. Chem. Acc.* 120 (2007) 215–241.
- [252] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Montgomery, J. A., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, (2009). <http://www.gaussian.com>.
- [253] T.H. Dunning, Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen, *J. Chem. Phys.* 90 (1989) 1007.
- [254] M. Petković, *Primenjena kvantna hemija*, Univerzitet u Beogradu - Fakultet za fizicku hemiju, Beograd, 2013.

- [255] A. V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 6378–6396.
- [256] J.P. Foster, F. Weinhold, Natural hybrid orbitals, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7211–7218.
- [257] F. Weinhold, C.R. Landies, *Discovering Chemistry With Natural Bond Orbitals*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2012.
- [258] F. Weinhold, C.R. Landies, *Valency and Bonding: A Natural Bond Orbital Donor-Acceptor Perspective*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005.
- [259] M. Milovanović, *Teorijska istraživanja geometrije, stabilnosti i hemijskih veza u malim klasterima litijuma sa halogenima*, doktorska teza, Univerzitet u Beogradu, 2015.
- [260] E. Klein, V. Lukeš, M. Ilčin, DFT/B3LYP study of tocopherols and chromans antioxidant action energetics, *Chem. Phys.* 336 (2007) 51–57.
- [261] G. Litwinienko, K.U. Ingold, Solvent Effects on the Rates and Mechanisms of Reaction of Phenols with Free Radicals, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 222–230.
- [262] G. DiLabio, E. Johnson, Lone pair- π and π - π interactions play an important role in proton-coupled electron transfer reactions, *J. Am. Chem.* 129 (2007) 6199–6203.
- [263] J.M. Mayer, D.A. Hrovat, J.L. Thomas, W.T. Borden, Proton-Coupled Electron Transfer versus Hydrogen Atom Transfer in Benzyl/Toluene, Methoxyl/Methanol, and Phenoxy/Phenol Self-Exchange Reactions, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 11142–11147.
- [264] Z. Marković, J. Tošović, D. Milenković, S. Marković, Revisiting the solvation enthalpies and free energies of the proton and electron in various solvents, *Comput. Theor. Chem.* 1077 (2016) 11–17.
- [265] R.A. Marcus, *Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 32 (1993) 1111–1121.
- [266] F.C. Collins, G.E. Kimball, Diffusion-controlled reaction rates, *J. Colloid Sci.* 4 (1949) 425–437.
- [267] R.F.W. Bader, Atoms in molecules, *Acc. Chem. Res.* 18 (1985) 9–15.

- [268] R.F.W. Bader, A Bond Path: A Universal Indicator of Bonded Interactions, *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 7314-7323.
- [269] R.F.W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, Oxford, U.K., 1990.
- [270] C.F. Matta, R.J. Boyd, eds., *The Quantum Theory of Atoms in Molecules*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2007.
- [271] T.A. Keith, AIMAll, (2016). aim.tkgristmill.com.
- [272] R.G. Parr, W. Yang, Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4049–4050.
- [273] L. Shu-BIN, Conceptual Density Functional Theory and Some Recent Developments, *Acta Phys. Chim Sin.* 25 (2009) 590–600.
- [274] W. Yang, W.J. Mortier, The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 5708–5711.
- [275] W. Tiznado, E. Chamorro, R. Contreras, P. Fuentealba, Comparison among four different ways to condense the Fukui function, *J. Phys. Chem. A.* 109 (2005) 3220–3224.
- [276] A.D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys. Rev. A.* 38 (1988) 3098–3100.
- [277] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [278] N. Okabe, S. Mori, Y. Sasaki, Structure of 3-Metoxytyramine hydrochloride, *Acta Crystallogr. Sect. A* 48 (1991) 1448–1450.
- [279] P.I. Nagy, G.J. Durant, W.P. Hoss, D.A. Smith, Theoretical Analyses of the Tautomeric and Conformational Equilibria of Histamine and (α R, β S)- α , β -Dimethylhistamine in the Gas Phase and in Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 4898–4909.
- [280] M.H. Jamróz, VEDA 4Warsaw, (2004).

- [281] S. Marković, J. Tošović, J.M. Dimitrić Marković, Synergic application of spectroscopic and theoretical methods to the chlorogenic acid structure elucidation, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 164 (2016) 67–75.
- [282] K. Paxton, T.A. Hamor, the Crystal and Molecular Structure of (±)-Octopamine Hydrochloride, *Acta. Cryst. B* 33 (1977) 2143–2146.
- [283] M. Kolderup, A. Mostad, C. Romming, The Crystal Structure of 6-Hydroxydopamine Hydrochloride, *Acta Chem. Scand.* 26 (1972) 483–493.
- [284] D. Dimić, D. Milenković, Z. Marković, J.D. Marković, Structural and spectral analysis of 3-metoxytyramine, an important metabolite of dopamine, *J. Mol. Struct.* 1134 (2017) 226–236.
- [285] D. Dimić, D. Milenković, J. Ilić, B. Šmit, A. Amić, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, Experimental and theoretical elucidation of structural and antioxidant properties of vanillylmandelic acid and its carboxylate anion, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 198 (2018) 61–70.
- [286] N. Okabe, T. Suga, Y. Kohyama, IUCr, DL-4-Hydroxy-3-methoxymandelic Acid, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 51 (1995) 1322–1324.
- [287] T. Shimizu, Y. Nakanishi, M. Nakahara, N. Wada, Y. Moro-oka, Radical on Structure Effect Antioxidant Activity of Catecholamines toward Singlet Oxygen and Other Reactive Oxygen Species in vitro, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 47 (2010) 181–190.
- [288] V.P. Petrović, D. Simijonović, M.N. Živanović, J. V. Košarić, Z.D. Petrović, S. Marković, S.D. Marković, Vanillic Mannich bases: synthesis and screening of biological activity. Mechanistic insight into the reaction with 4-chloroaniline, *RSC Adv.* 4 (2014) 24635–24644.
- [289] M.C. Foti, E.R. Johnson, M.R. Vinqvist, J.S. Wright, L.R.C. Barclay, K.U. Ingold, Naphthalene diols: A new class of antioxidants intramolecular hydrogen bonding in catechols, naphthalene diols, and their aryloxyl radicals, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 5190–5196.

- [290] M. Foti, G. Ruberto, Kinetic Solvent Effects on Phenolic Antioxidants Determined by Spectrophotometric Measurements, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2000) 342–348.
- [291] A. Sirjoosingh, S. Hammes-Schiffer, Proton-Coupled Electron Transfer versus Hydrogen Atom Transfer: Generation of Charge-Localized Diabatic States, *J. Phys. Chem. A* 115 (2011) 2367–2377.
- [292] J.H. Skone, A. V. Soudackov, S. Hammes-Schiffer, Calculation of vibronic couplings for phenoxyl/phenol and benzyl/toluene self-exchange reactions: Implications for proton-coupled electron transfer mechanisms, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 16655–16663.
- [293] S.L. Scott, W.J. Chen, A. Bakac, J.H. Espenson, Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 6710–6714.
- [294] Y.-J. Tu, D. Njus, H.B. Schlegel, A theoretical study of ascorbic acid oxidation and $\text{HOO}^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$ radical scavenging, *Org. Biomol. Chem.* 15 (2017) 4417–4431.
- [295] A. René, D. Hauchard, P. Hapiot, M. Abasq, How do phenolic compounds react toward superoxide ? A possible electrochemical method for evaluating their antioxidant capacity ., *Nat. Prod. Rep.* 82 (2009) 6226–6226.
- [296] J.M. Dimitrić Marković, Z.S. Marković, T.P. Brdarić, V.M. Pavelkić, M.B. Jadranin, Iron complexes of dietary flavonoids: Combined spectroscopic and mechanistic study of their free radical scavenging activity, *Food Chem.* 129 (2011) 1567–1577.
- [297] H.A. Bent, An Appraisal of Valence-bond Structures and Hybridization in Compounds of the First-row elements., *Chem. Rev.* 61 (1961) 275–311.
- [298] H.Y. Wang, Y. Sun, B. Tang, Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluorimetry, *Talanta* 57 (2002) 899–907.
- [299] G. Gilli, F. Bellucci, V. Ferretti, V. Bertolasi, Evidence for Resonance-Assisted Hydrogen Bonding from Crystal-Structure Correlations on the Enol Form of the /3-Diketone Fragment, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 1023–1028.

- [300] R.K. Singh, T.S. Lange, K.K. Kim, L. Brard, A coumarin derivative (RKS262) inhibits cell-cycle progression, causes pro-apoptotic signaling and cytotoxicity in ovarian cancer cells, *Invest. New Drugs*. 29 (2011) 63–72.
- [301] N. Khaghanzadeh, Z. Mojtahedi, M. Ramezani, N. Erfani, A. Ghaderi, Umbelliprenin is cytotoxic against QU-DB large cell lung cancer cell line but anti-proliferative against A549 adenocarcinoma cells, *DARU J. Pharm. Sci.* 20 (2012) 69.
- [302] M.A. Musa, M.Y. Joseph, L.M. Latinwo, V. Badisa, J.S. Cooperwood, In vitro evaluation of 3-aryl coumarin derivatives in A549 cell line., *Anticancer Res.* 35 (2015) 653–659.
- [303] T. Nasr, S. Bondock, M. Youns, Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide–hydrazone derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 76 (2014) 539–548.
- [304] K.M. Amin, A.A.M. Eissa, S.M. Abou-Seri, F.M. Awadallah, G.S. Hassan, Synthesis and biological evaluation of novel coumarin–pyrazoline hybrids endowed with phenylsulfonyl moiety as antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* 60 (2013) 187–198.
- [305] N.A. Abdel Latif, R.Z. Batran, M.A. Khedr, M.M. Abdalla, 3-Substituted-4-hydroxycoumarin as a new scaffold with potent CDK inhibition and promising anticancer effect: Synthesis, molecular modeling and QSAR studies, *Bioorg. Chem.* 67 (2016) 116–129.
- [306] D.O. Morgan, Cyclin-dependent kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 (1997) 261–291.
- [307] L. Meijer, S. Leclerc, M. Leost, Properties and Potential Applications of Chemical Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases, *Pharmacol. Ther.* 82 (1999) 279–284.
- [308] S.A. Morsy, A.A. Farahat, M.N.A. Nasr, A.S. Tantawy, Synthesis, molecular modeling and anticancer activity of new coumarin containing compounds, *Saudi Pharm. J.* 25 (2017) 873–883.

10. Dodatak

Tabela S1 Strukturni parametri (dužine veza i uglovi) 3-metoksitiramina, dobijeni optimizacijom različitim funkcionalima, korišćeni za poređenje sa kristalografskom strukturom (6-311++G(d,p) bazisni skup)

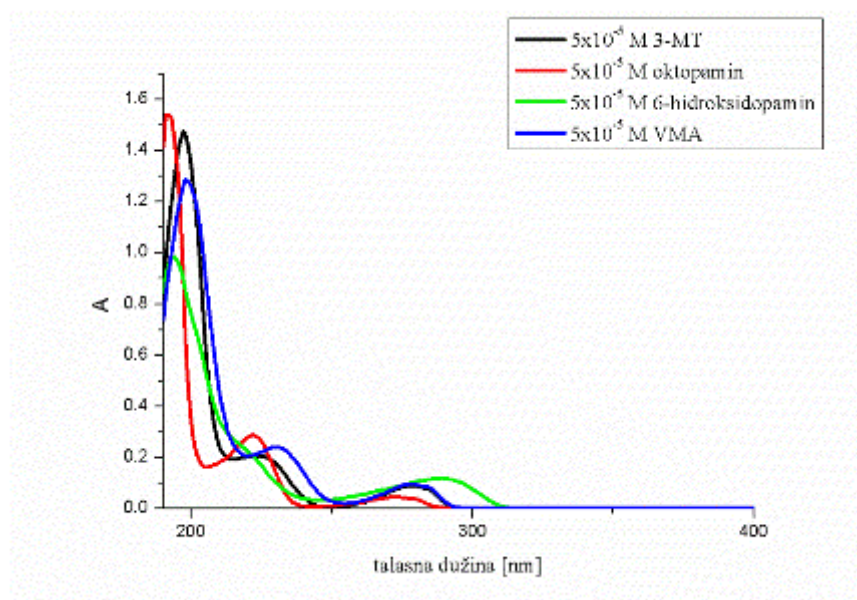
Strukturni parametri	DFT funkcionali					
	Exp.	B3LYP	CAM-B3LYP	B3LYP-D3BJ	M062X	M052X
O1-C4 [Å]	1,365	1,344	1,344	1,349	1,344	1,345
O2-C3 [Å]	1,381	1,356	1,356	1,361	1,355	1,356
O2-C9 [Å]	1,428	1,419	1,419	1,426	1,418	1,423
N2-C8 [Å]	1,479	1,524	1,524	1,536	1,524	1,525
C1-C2 [Å]	1,387	1,399	1,399	1,403	1,401	1,400
C1-C6 [Å]	1,386	1,387	1,387	1,393	1,389	1,387
C1-C7 [Å]	1,518	1,511	1,511	1,512	1,511	1,510
C2-C3 [Å]	1,376	1,383	1,383	1,389	1,386	1,385
C3-C4 [Å]	1,400	1,406	1,406	1,411	1,409	1,406
C4-C5 [Å]	1,364	1,381	1,381	1,388	1,384	1,382
C5-C6 [Å]	1,399	1,390	1,390	1,393	1,392	1,391
C7-C8 [Å]	1,478	1,521	1,521	11525	1,523	1,521
C3-O2-C9 [°]	118,20	119,23	119,23	118,99	118,34	118,32
C2-C1-C6 [°]	118,20	119,50	119,50	119,59	119,76	119,82
C2-C1-C7 [°]	119,00	120,24	120,24	120,15	120,14	120,21
C6-C1-C7 [°]	122,80	120,24	120,24	120,21	120,05	119,93
C1-C2-C3 [°]	121,40	119,95	119,95	119,93	119,76	119,70
O2-C3-C2 [°]	125,00	126,12	126,12	126,11	126,05	125,98
O2-C3-C4 [°]	114,60	113,72	113,72	113,76	113,77	113,84
C2-C3-C4 [°]	120,30	120,16	120,16	120,13	120,18	120,19
O1-C4-C3 [°]	116,80	120,23	120,23	120,38	120,28	120,14
O1-C4-C5 [°]	124,60	120,07	120,07	119,93	119,97	120,04
C3-C4-C5 [°]	118,60	119,69	119,69	119,68	119,75	119,82
C4-C5-C6 [°]	121,10	120,02	120,02	120,04	119,97	119,93
C1-C6-C5 [°]	120,40	120,68	119,50	120,62	120,58	120,54
C1-C7-C8 [°]	115,10	109,91	109,91	109,26	108,84	108,49
N1-C8-C7 [°]	113,30	110,81	110,81	110,94	110,60	110,50

Tabela S2 Eksperimentalni i izračunati položaji traka u IC i ramanskim spektrima 3-MT, asignacija traka, intenziteti i rezultati PED analize (struktura otpimizovana na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Eksperimentalni			B3LYP /6-311++G(d,p)				
Asignacija oblika	Vir eksp. [cm ⁻¹]	Vraman eksp. [cm ⁻¹]	Vscaled [cm ⁻¹]	IC intenzitet	Ram. intenzitet	Ram. akt.	PED (%)
NH istežuća (b)	3440 m		3415	0,36	69,7	1099,2	v _{NH} (100)
CH istežuća (a)	3147 m	3142 vw	3138	0,00	144,7	2673,3	v _{CH} (97)
CH istežuća (a)		3088 vw	3096	0,04	73,1	1383,6	v _{CH} (97)
CH istežuća (b)		3068 m	3088	0,00	20,1	382,2	v _{CH} (98)
CH istežuća (b)		3032 m	3029	0,01	53,3	1050,3	v _{CH} (99)
CH istežuća (a)	3027 s		3022	0,11	45,4	897,1	v _{CH} (99)
CH istežuća (b)		3008 m	2995	0,04	61,9	1243,4	v _{CH} (97)
CH istežuća (a)		2947 vs	2957	0,15	153,9	3162,1	v _{CH} (98)
CH istežuća (b)		2936 s	2954	0,14	166,6	3429,8	v _{CH} (98)
HNC savijajuća HNH savijajuća (b)	1623 vw		1634	0,14	7,7	395,9	δ _{HNC} (96)
CC istežuća (a)	1603 m	1616 m	1612	0,12	45,0	2366,8	v _{CC} (60)
CC istežuća g (a)		1593 s	1599	0,16	60,5	3221,9	v _{CC} (70)
HCC savijajuća (a) CCC savijajuća (a)	1526 vs	1508 vw	1517	0,89	3,1	175,8	δ _{HCC} (32) + v _{OC} (12)+ v _{OC} (11)+ v _{CC} (22)
HCH savijajuća (b) HCC savijajuća (b) HCN savijajuća (b) HNC savijajuća (b) HNH savijajuća (b) HNC savijajuća (b)	1506 w		1474	0,27	1,0	60,9	δ _{HCH} (80)
HCH savijajuća (a) HNC savijajuća (b) HNH savijajuća (b)	1471 w		1471	0,63	1,7	98,6	δ _{HCH} (78)
HCH savijajuća (a)	1467 vw		1465	0,05	12,2	729,8	δ _{HCH} (79) + δ _{HCH} (15)
HCH savijajuća (a)	1458 w		1457	0,04	3,1	185,9	δ _{HCH} (62) + v _{CC} (10)
HCH savijajuća (b)		1445 s	1455	0,00	13,5	813,6	δ _{HCH} (90)
CC istežuća (a) OC istežuća (a)	1433 w		1433	0,09	3,7	230,1	v _{CC} (42)+ δ _{HCC} (18)
CC istežuća (a) OC istežuća (a)	1385 w		1381	0,17	18,0	1166,4	v _{CC} (51)
HCC savijajuća (b) HCH savijajuća (b) HCN savijajuća (b)	1369 m	1371 m	1370	0,03	1,0	65,4	δ _{HCC} (84)
HCN savijajuća (b) HCC savijajuća (b) HNC savijajuća (b) HOC savijajuća (a)	1326 w	1327 m	1315	0,00	4,6	320,2	δ _{HCN} (66)
HCC savijajuća (b) HNC savijajuća (b) CCN savijajuća (b)	1304 vw		1306	0,09	17,4	1214,5	δ _{HCC} (71))
HCC savijajuća (b) HCN savijajuća (b)		1303 w	1303	0,07	1,5	106,7	δ _{HCC} (62)

HOC savijajuća (a) HNC savijajuća (a)							
OC istežuća (b) CC istežuća (b)	1279 s	1279 m	1281	1,00	22,4	1603,2	$v_{OC}(58)+\delta_{HCC}(22)$
OC istežuća (a) CC istežuća (a)	1249 s		1246	0,40	1,7	127,8	$v_{CC}(43)$
HOC savijajuća (a) HCC savijajuća (a)	1210 m	1206 vw	1201	0,35	9,8	758,7	$\delta_{HOC}(72)$
CC istežuća (a) OC istežuća (a)	1160 vs	1150 vw	1153	0,16	4,1	338,0	$\delta_{HCC}(22)+v_{CC}(42)$
HCC savijajuća (a) HOC savijajuća (a)	1127 s	1131 vw	1124	0,14	0,6	53,1	$\delta_{HCH}(50)+v_{CC}(10)+v_{CC}(17)$
CC istežuća (b)	1085 vw	1083 vw	1097	0,07	2,3	198,6	$v_{CC}(31)+\delta_{HNC}(36)$
HCC savijajuća (b) HNC savijajuća (b)		1035 m	1058	0,02	1,1	100,6	$\delta_{HCC}(69)$
OC istežuća (a)	1032 s	1025 m	1030	0,24	3,5	326,0	$v_{CC}(60)+\delta_{CCC}(12)$
CC istežuća (a) NC istežuća (b) OC istežuća (a)	957 w	957 w	934	0,09	6,5	695,7	$v_{CC}(44)+\delta_{HNC}(11)$
HCCC torsion (a)	936 vw	934 w	925	0,01	0,4	38,8	$\tau_{HCCC}(94)$
NC istežuća (b)	919 w	921 w	906	0,01	2,3	249,9	$v_{NC}(11)$
HNC savijajuća (b) HCN savijajuća (b) HCC savijajuća (b)	868 w		884	0,03	1,8	202,7	$\delta_{HCH}(69)$
CCOC torsion (a)	816 s	821 vw	816	0,07	21,7	2711,7	$\tau_{HCCC}(37)+v_{NC}(14)$
OC istežuća (a) CC istežuća (a)	799 m	803 vs	800	0,03	30,6	3912,7	$v_{CC}(59)$
HCC savijajuća (b) HCN savijajuća (b) HNC savijajuća (b)	772 w		756	0,02	0,0	4,6	$\delta_{CCC}(84)$
CCC savijajuća (b) HCC savijajuća (a) HNC savijajuća (b)	739 vw	739 s	727	0,02	5,5	788,9	$\gamma_{OCCC}(12)+\delta_{CCC}(29)+v_{NC}(10)$
OCCC torziona van ravni (a) HCCC torziona (a) CCCC torziona (a) HCCC torziona (a)	724 vw	725 w	715	0,00	2,0	292,4	$\gamma_{OCCC}(76)$
CCC savijajuća (a) CCO savijajuća (a)	627 w	630 w	617	0,05	1,7	291,9	$\delta_{CCC}(10)+\tau_{CCCC}(66)$
CCCC torziona (b) HCCC torziona (a) CCCO torziona (a) OCCC torziona (a)	571 w	571 m	557	0,04	3,3	631,7	$\tau_{CCCC}(12)+\delta_{CCC}(30)$
HOCC torziona (a)	460 w	454 vs	459	0,31	0,8	199,0	$\tau_{HOCC}(93)$
HOCC torziona (a) CCOC torziona (a) CCCO torziona (a) CCCC torziona (a) HCCC torziona (a)	457 w		448	0,13	0,1	23,7	$\tau_{CCCC}(83)$

Oznake imaju sledeća značenja: b-alifatični niz i metoksilna grupa, a-aromatični prsten, vs – veoma intenzivna, s – intenzivna, m – srednjeg intenziteta, w – slabog intenziteta i vw – veoma slabog intenziteta.



Slika S1. Elektronski spektri ispitivanih metabolita neurotransmitera.

Tabela S3 Stukturni parametri (dužine veza i uglovi) oktopamina, dobijeni optimizacijom različitim funkcionalima, korišćeni za poređenje sa kristalografskom strukturom (6-311++G(d,p) bazisni skup)

Strukturni parametri	DFT funkcionali					
	Exp.	B3LYP	CAM-B3LYP	B3LYP-D3BJ	M052X	M062X
C1-C2 [Å]	1,352	1,399	1,398	1,398	1,394	1,395
C2-C3 [Å]	1,372	1,390	1,379	1,390	1,386	1,387
C3-C4 [Å]	1,402	1,395	1,396	1,394	1,390	1,392
C4-C5 [Å]	1,362	1,395	1,390	1,394	1,389	1,391
C5-C6 [Å]	1,402	1,394	1,390	1,393	1,390	1,391
C6-C1 [Å]	1,402	1,395	1,391	1,394	1,389	1,391
C4-O1 [Å]	1,422	1,371	1,347	1,371	1,366	1,364
C1-C7 [Å]	1,522	1,513	1,516	1,509	1,506	1,508
C7-O2 [Å]	1,441	1,420	1,419	1,419	1,412	1,408
C7-C8 [Å]	1,522	1,542	1,527	1,539	1,531	1,534
C8-N [Å]	1,532	1,471	1,505	1,469	1,464	1,465
C6-C1-C2 [°]	116,41	118,33	118,56	118,52	118,74	118,69
C7-C1-C2 [°]	121,32	120,35	119,41	120,24	119,98	120,06

C7-C1-C6 [°]	122,32	121,30	122,02	121,19	121,24	121,22
C1-C2-C3 [°]	123,32	121,43	121,08	121,34	121,25	121,28
C2-C3-C4 [°]	120,42	119,53	119,88	119,49	119,38	119,44
C3-C4-C5 [°]	120,02	119,81	119,74	119,88	120,08	119,97
O1-C4-C5 [°]	115,52	117,47	116,86	117,46	117,46	117,38
C4-C5-C6 [°]	124,02	122,72	123,40	122,65	122,46	122,66
C5-C6-C1 [°]	117,22	120,07	119,89	120,04	119,98	120,04
C1-C7-C8 [°]	122,52	120,83	120,85	120,73	120,57	120,60
O2-C7-C8 [°]	108,81	111,75	111,78	111,15	110,61	110,78
C7-C8-N [°]	112,31	110,28	113,56	110,43	110,23	110,16

Tabela S4 Strukturni parametri (dužine veza i uglovi) 6-hidroksidopamina, dobijeni optimizacijom različitim funkcionalima, korišćeni za poređenje sa kristalografskom strukturom (6-311++G(d,p) bazisnim skup)

Strukturni parametri	DFT funkcionali					
	Exp.	B3LYP	CAM-B3LYP	B3LYP-D3BJ	M052X	M062X
C1-C2 [Å]	1,391	1,403	1,397	1,401	1,397	1,399
C1-C6 [Å]	1,400	1,402	1,391	1,400	1,394	1,396
C1-C7 [Å]	1,509	1,512	1,506	1,509	1,507	1,508
C2-C3 [Å]	1,385	1,385	1,379	1,384	1,380	1,381
C3-C4 [Å]	1,398	1,401	1,400	1,400	1,396	1,398
C3-O2 [Å]	1,379	1,383	1,366	1,383	1,378	1,376
C4-C5 [Å]	1,394	1,386	1,384	1,386	1,382	1,383
C4-O1 [Å]	1,371	1,363	1,343	1,362	1,357	1,356
C5-C6 [Å]	1,396	1,395	1,386	1,394	1,390	1,392
C5-O3 [Å]	1,378	1,376	1,375	1,375	1,369	1,368
C7-C8 [Å]	1,521	1,539	1,522	1,536	1,530	1,531
C8-N [Å]	1,487	1,467	1,521	1,466	1,461	1,461
C2-C1-C6 [°]	118,10	117,83	118,46	117,65	117,75	117,74
C2-C1-C7 [°]	120,00	120,54	122,24	120,27	120,37	120,52
C6-C1-C7 [°]	121,80	121,57	119,30	122,03	121,84	121,69
C1-C2-C3 [°]	122,00	121,48	120,81	121,50	121,36	121,43
C2-C3-C4 [°]	119,30	119,84	119,97	119,95	119,99	119,94
C2-C3-O2 [°]	122,70	125,14	125,49	124,77	124,72	124,90
C4-C3-O2 [°]	118,00	115,02	114,54	115,29	115,29	115,17
C3-C4-C5 [°]	119,90	119,62	119,80	119,58	119,65	119,63
C3-C4-O1 [°]	116,90	120,70	120,72	120,62	120,35	120,44
C5-C4-O1 [°]	123,20	119,68	119,48	119,81	120,00	119,93

C4-C5-C6 [°]	119,80	120,10	119,65	120,02	119,89	119,96
C1-C6-C5 [°]	120,80	121,14	121,30	121,31	121,37	121,30
C1-C6-O3 [°]	123,30	122,62	122,13	122,53	122,29	122,50
C5-C6-O3 [°]	115,80	116,24	116,66	116,16	116,34	116,19
C1-C7-C8 [°]	109,60	112,46	110,47	112,85	112,22	112,38
C7-C8-N [°]	110,80	110,41	110,30	110,41	109,88	110,01

Tabela S5 Stukturni parametri (dužine veza i uglovi) VMA, dobijeni optimizacijom različitim funkcionalima, korišćeni za poređenje sa kristalografskom strukturom (6-311++G(d,p) bazisni skup)

Strukturni parametri	DFT funkcionali					
	Exp.	B3LYP	CAM-B3LYP	B3LYP-D3BJ	M052X	M062X
O3-C3 [Å]	1,368	1,373	1,367	1,371	1,367	1,366
O3-C9 [Å]	1,432	1,424	1,416	1,423	1,420	1,415
O4-C4 [Å]	1,377	1,362	1,356	1,361	1,356	1,355
O7-C7 [Å]	1,422	1,412	1,403	1,411	1,403	1,400
O81-C8 [Å]	1,320	1,341	1,333	1,341	1,334	1,334
O82-C8 [Å]	1,203	1,209	1,204	1,209	1,203	1,202
C7-C8 [Å]	1,521	1,531	1,522	1,527	1,520	1,524
C1-C2 [Å]	1,397	1,401	1,394	1,399	1,395	1,396
C1-C6 [Å]	1,374	1,391	1,385	1,390	1,386	1,388
C1-C7 [Å]	1,524	1,523	1,520	1,520	1,518	1,521
C2-C3 [Å]	1,379	1,388	1,382	1,387	1,384	1,386
C3-C4 [Å]	1,393	1,408	1,400	1,407	1,401	1,403
C4-C5 [Å]	1,375	1,387	1,381	1,386	1,382	1,384
C5-C6 [Å]	1,389	1,395	1,390	1,395	1,391	1,392
C3-O3-C9 [°]	116,90	118,56	118,38	118,12	117,38	117,50
C2-C1-C6 [°]	119,70	119,61	119,73	119,80	120,09	120,00
C2-C1-C7 [°]	119,30	119,56	119,46	119,36	119,31	119,35
C6-C1-C7 [°]	121,00	120,82	120,80	120,82	120,59	120,64
C1-C2-C3 [°]	120,00	119,87	119,74	119,74	119,49	119,55
O3-C3-C2 [°]	125,50	125,80	125,69	125,72	125,54	125,63
O3-C3-C4 [°]	114,70	113,84	113,86	113,88	114,01	113,92
C2-C3-C4 [°]	119,80	120,36	120,45	120,40	120,45	120,45
O4-C4-C3 [°]	120,40	120,26	120,02	120,14	119,93	120,10
O4-C4-C5 [°]	119,30	120,18	120,39	120,27	120,33	120,26
C3-C4-C5 [°]	120,30	119,55	119,59	119,60	119,73	119,64
C4-C5-C6 [°]	119,80	120,04	119,99	119,98	119,92	119,98

C1-C6-C5 [°]	120,50	120,56	120,49	120,48	120,32	120,37
O7-C7-C1 [°]	112,10	112,02	112,03	112,30	112,30	112,22
O7-C7-C8 [°]	106,40	108,70	108,54	108,82	108,80	108,94
C1-C7-C8 [°]	108,80	111,25	111,16	110,05	109,34	109,79
O81-C8-O82 [°]	124,70	123,66	123,62	123,78	123,74	123,89
O81-C8-C7 [°]	111,50	113,22	113,48	113,10	113,10	113,04
O82-C8-C7 [°]	123,80	123,12	122,89	123,12	123,16	123,07

Tabela S6 Eksperimentalni i izračunati položaji traka u IC i ramanskim spektrima VMA, asignacija traka, intenziteti i rezultati PED analize (struktura optimizovana na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Eksperimentalni			M052x /6-311++G(d,p)				
Asignacija oblika	$\nu_{\text{ir eksp}} [\text{cm}^{-1}]$	$\nu_{\text{raman eksp}} [\text{cm}^{-1}]$	$\nu_{\text{scaled}} [\text{cm}^{-1}]$	IC intenzitet	Ramanski intenzitet	Ramanska aktivnost	PED (%)
OH istežuća (a)	3650 s		3657	3,0462	60,8	785,3	$\nu_{\text{OH}}(99)$
OH istežuća (b)	3640 s		3640	2,8203	101,7	1326,3	$\nu_{\text{OH}}(99)$
OH istežuća (b)	3600 s		3619	2,8303	41,2	544,2	$\nu_{\text{OH}}(98)$
CH istežuća (a)		3090	3090	0,0578	43,4	776,0	$\nu_{\text{OH}}(94)$
CH istežuća (a)		3085	3075	0,0258	129,5	2337,3	$\nu_{\text{OH}}(85)$
CH istežuća (a)	3056 w	3069	3051	0,0716	56,5	1034,8	$\nu_{\text{OH}}(90)$
CH istežuća (b)	3035 w	3035	3025	0,3121	102,1	1899,2	$\nu_{\text{OH}}(98)$
CH istežuća (b)	2973 s	2974	2975	0,4445	33,4	640,5	$\nu_{\text{OH}}(99)$
CH istežuća (b)	2934 w	2934	2942	0,2517	87,6	1712,1	$\nu_{\text{OH}}(97)$
CH istežuća (b)	2841 w	2852	2909	0,7518	127,3	2538,7	$\nu_{\text{OH}}(97)$
CC istežuća (b) OC istežuća (b) CH istežuća (b)	1746 vs	1713	1760	7,9052	14,2	628,6	$\nu_{\text{CO}}(75) + \nu_{\text{CH}}(11)$
CC istežuća (a) CO istežuća (a)	1607 m		1620	0,4012	30,9	1540,1	$\nu_{\text{CC}}(73)$
CC istežuća (a) CH istežuća (a) CO istežuća (a)		1609	1608	0,4970	24,5	1235,7	$\nu_{\text{CC}}(69) + \nu_{\text{CC}}(10)$
HCC savijajuća (a) HCH savijajuća (a) CCO savijajuća (a) CC istežuća (a) CH istežuća (a)	1517 vs	1519	1500	4,9608	3,6	197,4	$\delta_{\text{HCC}}(29) + \nu_{\text{CC}}(24)$
HCH savijajuća (b)	1462 vw	1463	1458	1,1862	5,0	290,1	$\delta_{\text{HCC}}(79)$
HCH savijajuća (b)		1444	1444	0,2903	10,0	583,0	$\delta_{\text{HCC}}(87)$
CC istežuća (a) CH istežuća (a) HCC savijajuća (a) HCC savijajuća (a) HCO savijajuća (a)	1440 s		1437	0,4123	2,0	120,6	$\nu_{\text{CC}}(33) + \delta_{\text{HCC}}(12)$
CC istežuća (a) CH istežuća (a) HCC savijajuća (a) HCC savijajuća (b) HCO savijajuća (b)		1436	1413	0,6402	3,1	184,7	$\nu_{\text{CC}}(16) + \delta_{\text{HCC}}(51)$

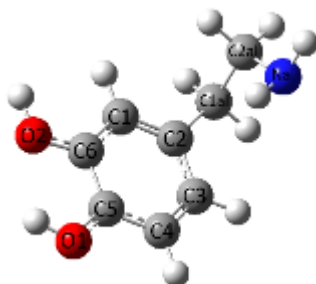
CC istežuća (b) CH istežuća (b) HOC savijajuća (b) HCC savijajuća (b)	1377 w		1382	0,5520	2,1	132,4	$v_{CH}(18) + \delta_{HOC}(11) + \delta_{HCC}(31)$
CC istežuća (a) HCC savijajuća (a) HOC savijajuća (a)		1376	1349	0,8993	12,6	804,7	$v_{CC}(46) + \delta_{HOC}(16)$
HCC savijajuća (a) HOC savijajuća (b)		1329	1294	0,6025	2,7	183,2	$\delta_{HOC}(56)$
CC istežuća (b) CH istežuća (b) HOC savijajuća (b)	1268 s		1288	3,4372	3,8	261,4	$v_{CC}(13) + \delta_{HOC}(62)$
CC istežuća (a) CO istežuća (b)	1235 s	1267	1261	4,0710	12,0	837,5	$v_{CO}(65)$
HCC savijajuća (a) HOC savijajuća (a) CCC bending (a) CH istežuća (b)		1223	1238	1,1994	7,2	516,7	$\delta_{CCC}(32) + v_{CC}(25)$
HOC savijajuća (a)	1150 m		1217	2,2289	1,0	74,6	$\delta_{HOC}(46)$
HOC savijajuća (b) HCC savijajuća (a)		1192	1206	0,3523	5,5	405,6	$\delta_{HCC}(50)$
CC istežuća (a) HOC savijajuća (b) HCC savijajuća (a)	1131 w		1178	1,0478	2,7	206,4	$v_{CO}(14) + \delta_{HCC}(38)$
CC istežuća (a) HCC savijajuća (a) CCC savijajuća (b)		1148	1156	1,2754	10,8	848,1	$v_{CO}(19) + \delta_{HCC}(31) + \delta_{CCC}(10)$
HCO savijajuća (b) HCC savijajuća (a) HCOC torziona (a) CCOC torziona (b)			1144	0,7907	0,8	66,9	$\delta_{HCC}(16) + \tau_{CCOC}(42) + \tau_{HCOC}(42)$
HCC savijajuća (b) HCH savijajuća (a) CH istežuća (a)			1133	0,0182	1,8	146,4	$\delta_{HCC}(10) + v_{CO}(37)$
HCC savijajuća (a) HCO savijajuća (b) CC istežuća (a)	1059 s		1127	7,0264	0,9	70,9	$\delta_{HCC}(29) + v_{CC}(18)$
HCC savijajuća (a) HCO savijajuća (b) CC istežuća (a)		1060	1100	0,5951	1,9	157,1	$\delta_{HCC}(15) + v_{CC}(47)$
HCC savijajuća (a) HCC savijajuća (a) CO istežuća (a)	1028 m		1080	1,5726	1,7	141,0	$\delta_{HCC}(10) + v_{CO}(54)$
CC istežuća (a)		1034	1030	0,7613	3,3	299,6	$v_{CO}(54)$
HCCO torziona (a) HCCC torziona (a) CCCC torziona (a)	862 m	953	936	0,3323	4,0	406,4	$\tau_{HCCO}(11)$
HCCC torziona (b) CH istežuća (a)	821 m	913	891	0,6806	4,7	511,6	$\tau_{HCCC}(10) + v_{CO}(12)$
HCCC torziona (a) CCCC torziona (a)		865	836	0,2295	1,7	204,4	$\tau_{CCCC}(73)$
CH istežuća (a) CC istežuća (a) HCCC torziona (a) OCCC torziona (a)	771 m	824	797	0,6887	5,3	649,6	$v_{CC}(44) + \tau_{HCCC}(10)$
CC istežuća (a) OC istežuća (b)		778	767	0,2153	10,1	1310,1	$v_{CC}(39)$

CCC savijajuća (a) CCO savijajuća (b) HCC savijajuća (b) HOCC torziona (a) HOCO torziona (a)		701	679	1,4550	8,7	1304,4	$\delta_{CCC}(10) +$ $\delta_{HCC}(11) +$ $\tau_{HOCC}(22) +$ $\tau_{HOCC}(14)$
HOC savijajuća (b) HOCC torziona (b) HOCO torziona (b)	696 m	637	643	1,0000	1,7	274,2	$\delta_{HOC}(31) +$ $\tau_{HOCC}(14) +$ $\tau_{HOCC}(11)$
HCCC torziona (a)	654 w		602	1,0351	0,7	114,5	$\tau_{HOCC}(37)$
HCC savijajuća (a) CCC savijajuća (a) HOCC torziona (a)		574	580	1,9252	4,3	774,3	$\delta_{HCC}(21) +$ $\delta_{CCC}(16) +$ $\tau_{HOCC}(12)$
HOCC torziona (a) HOCO torziona (a) HCC savijajuća (b)		547	542	0,0580	1,6	304,3	$\tau_{HOCC}(14) +$ $\delta_{HCC}(19)$
HCC savijajuća (b) HOC savijajuća (a)		532	518	0,2695	1,6	316,1	$\delta_{HCC}(18)$
HCC savijajuća (a) HOC savijajuća (b) CCC savijajuća (a)	454 w		510	0,2540	1,0	201,1	$\delta_{HCC}(48)$
HCCC torziona (a) HOCC torziona (a)		462	450	0,2747	2,2	521,3	$\tau_{HOCC}(30)$
HCC bending (b)		461	447	0,4998	2,5	609,5	
HOCC torziona (a) HOCH torziona (a)		400	418	1,4140	1,5	375,7	$\tau_{HOCC}(41) +$ $\tau_{HCCC}(16) +$
HCC savijajuća (b) CCC savijajuća (a)	368 m		362	0,5371	2,2	666,3	$\delta_{HCC}(41)$
AAE	25	15					
R	0,999	0,999					

Tabela S7 Parametri NBO analize koji uključuju kiseonik u *p*-položaju (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

Molekul	Naelektrisanje na kiseonikovom atomu	Intramolekulska vodonična veza u radikalu [kJ/mol]	Naelektrisanje na kiseonikovom atomu	Intramolekulska vodonična veza u anjonu [kJ/mol]
Katehol	-0,653	1,04	-0,956	2.26
3-MT	-0,651	/	-0,946	/
HVA	-0,645	/	-0,954	/
Dopamin	-0,661	1,04	-0,963	2.21
DOPAC	-0,657	1,05	-0,955	2.23
Epinefrin	-0,660	1,04	-0,952	2.26
Norepinefrin	-0,661	1,04	-0,953	2.29
L-DOPA	-0,662	1,07	-0,960	2.23

Tabela S8 Fukui funkcije za radikalski napad. (Isti način označavanja atoma je iskorišćen kod svih molekula, prema strukturi dopamina koja je prikazana u nastavku. U tabeli su prikazane samo vrednosti za ugljenikove, kiseonikove i azotove atome, strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou)



	3-MT	HVA	Katehol	DOPAC	Dopamin	Epinefrin	Norepinefrin	L-DOPA
C1	0,129	0,131	0,137	0,140	0,137	0,134	0,134	0,129
C2	0,113	0,114	0,116	0,095	0,112	0,112	0,114	0,085
C3	0,082	0,078	0,099	0,101	0,086	0,083	0,081	0,124
C4	0,148	0,141	0,142	0,132	0,143	0,142	0,143	0,135
C5	0,112	0,112	0,099	0,104	0,109	0,111	0,112	0,093
C6	0,085	0,085	0,105	0,101	0,092	0,093	0,091	0,115
C1 _{al}	-0,015	-0,014	/	-0,012	-0,016	-0,010	-0,011	-0,012
C2 _{al}	0,005	0,05	/	0,006	0,005	0,002	0,004	0,000
C3 _{al}	/	/	/	/	/	/	/	0,001
C1 _{met}	-0,007	-0,008	/	/	/	/	/	/
C2 _{met}	/	/	/	/	/	/	/	/
O1	0,080	0,081	0,071	0,073	0,081	0,083	0,083	0,071
O2	/	/	0,081	0,076	0,059	0,065	0,064	0,074
O _{al}	/	/	/	/	/	0,000	0,012	/
N _{al}	0,005	/	/	/	0,005	0,004	0,004	0,004
O1 _{car}	/	0,007	/	0,013	/	/	/	0,005
O2 _{car}	/	0,013	/	0,006	/	/	/	0,007

Sledeća notacija je korišćena C1-C6 (prema slici prikazanoj iznad tabele) za aromatične ugljenikove atome, C_{nal} su ugljenikovi atomi alifatičnog niza, O1 i O2 kiseonikovi atomi direktno vezani za aromatični prsten, O_{al} je kiseonikov atom na alifatičnom nizu, kao i N_{al}, dok su O_{ncar} kiseonikovi atomi karboksilne grupe.

Tabela S9 Vrednosti reakcionih entalpija, u kJ/mol, za formiranje radikal adukta na različitim položajima (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

		3-MT	HVA	Katehol	DOPAC	Dop.	Epine.	Norepine	L-DOPA
MP	C1	47	29	41	/	32	56	40	28
	C4	29	39	33	33	29	39	31	24
CMP	C1	16	29	12	7	5	27	9	-3
	C4	/	25	13	/	0	11	3	-2
DMP	C1	14	6	3	0	-1	20	7	-9
	C4	/	5	4	/	-4	6	-6	-4
TMP	C1	-3	-4	-3	-10	-13	4	1	-21
	C4	-20	-9	-1	-9	-19	-7	-13	-20

Tabela S10 Izračunate promene entalpije reakcija, u kJ/mol, za reakciju između CMP radikala i ispitivanih neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije)

	Vodena faza				
	HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
3-MT	-27	85	-112	7	-34
HVA	-22	92	-114	4	-26
Katehol	-28	100	-128	-11	-17
DOPAC	-30	97	-127	-11	-19
Dopamin	-34	89	-123	-8	-26
Epinephrin	-32	93	-125	-11	-21
Norepinephrin	-31	93	-124	-10	-20
L-DOPA	-44	82	-125	-19	-25

Tabela S11 Izračunate promene entalpije reakcija, u kJ/mol, za reakciju između DMP radikala i ispitivanih neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou)

	Vodena faza				
	HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
3-MT	-46	46	-92	26	-72
HVA	-41	54	-95	23	-65
Katehol	-47	62	-108	8	-55
DOPAC	-49	59	-108	9	-58
Dopamin	-53	51	-104	12	-65
Epinephrin	-51	54	-105	9	-60
Norepinephrin	-50	55	-105	9	-59
L-DOPA	-63	43	-106	0	-63

Tabela S12 Konstante brzina za reakcije ispitivanih molekula sa MP kao prvi korak SET-PT mehanizma (strukture optimizovane na M06-2X/6-311++G(d,p) nivou)

	MP			
	ΔG_{ET}^0 [kJ/mol]	λ [kJ/mol]	k_{ET} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{app} [M ⁻¹ s ⁻¹]
3-MT	115	70,3	$2,8 \times 10^{-9}$	$2,8 \times 10^{-9}$
HVA	127	74,6	$9,7 \times 10^{-12}$	$9,7 \times 10^{-12}$
DOPAC	133	74,5	$3,1 \times 10^{-13}$	$3,1 \times 10^{-13}$
Dopamin	123	73,2	$4,5 \times 10^{-11}$	$4,5 \times 10^{-11}$
Katechol	134	73,9	$1,3 \times 10^{-13}$	$1,3 \times 10^{-13}$
Epinefrin	129	77,2	$4,1 \times 10^{-12}$	$4,1 \times 10^{-12}$
Norepinefrin	131	74,0	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,0 \times 10^{-12}$
L-DOPA	111	96,9	$1,7 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$

Tabela S13 Strukturni parametri (dužine veza i uglovi) VMA, dobijeni optimizacijom različitim funkcionalima, korišćeni za poređenje sa kristalografskom strukturom (6-311++G(d,p) bazisni skup)

Strukturni parametri	DFT funkcionali					
	Exp.	B3LYP	B3PW91	B3LYP-D3BJ	M052X	M062X
O1-C2 [Å]	1,382	1,394	1,387	1,393	1,382	1,380
C2-O2 [Å]	1,223	1,210	1,208	1,209	1,204	1,203
C2-C3 [Å]	1,439	1,459	1,454	1,457	1,455	1,460
C3-C4 [Å]	1,442	1,452	1,446	1,449	1,444	1,449
C4-O3 [Å]	1,248	1,251	1,249	1,252	1,242	1,239
C4-C10 [Å]	1,473	1,472	1,468	1,470	1,471	1,474
C9-C10 [Å]	1,385	1,395	1,393	1,394	1,387	1,389
C8-C9 [Å]	1,390	1,396	1,394	1,395	1,392	1,394
C8-C7 [Å]	1,384	1,387	1,385	1,387	1,383	1,384
C7-C6 [Å]	1,394	1,402	1,399	1,402	1,398	1,399
C6-C5 [Å]	1,382	1,385	1,383	1,384	1,381	1,382
C5-C10 [Å]	1,402	1,403	1,400	1,402	1,397	1,398
C3-C1' [Å]	1,442	1,430	1,428	1,428	1,422	1,421
C1'-C2' [Å]	1,499	1,502	1,496	1,500	1,498	1,500
C1'-N1 [Å]	1,309	1,327	1,323	1,324	1,318	1,324
N1-C1'' [Å]	1,474	1,462	1,454	1,458	1,458	1,461
C1''-C2'' [Å]	1,518	1,539	1,533	1,536	1,529	1,522
C2''-C3'' [Å]	1,520	1,514	1,509	1,510	1,508	1,516
C3''-C4'' [Å]	1393	1,402	1,399	1,400	1,397	1,397
C4''-C5'' [Å]	1,387	1,391	1,389	1,390	1,385	1,389
C5''-O4 [Å]	1,376	1,366	1,360	1,366	1,360	1,358
C5''-C6'' [Å]	1,395	1,406	1,404	1,405	1,400	1,399
C6''-O5 [Å]	1,367	1,366	1,359	1,365	1,360	1,359
C6''-C7'' [Å]	1,390	1,390	1,388	1,390	1,384	1,388
C7''-C8'' [Å]	1,389	1,396	1,393	1,395	1,393	1,391
C8''-C3'' [Å]	1,390	1,394	1,391	1,392	1,387	1,391
C9-O1-C2 [°]	122,55	123,19	123,11	123,09	123,09	123,20
O1-C9-C10 [°]	121,52	121,88	121,99	121,93	122,04	122,16
O1-C2-C3 [°]	118,87	117,68	117,71	117,67	117,74	117,77
O1-C2-O2 [°]	113,28	115,03	115,10	115,04	115,44	115,44
C3-C2-O2 [°]	127,85	127,29	127,19	127,28	126,82	126,79
C2-C3-C4 [°]	120,19	120,55	120,72	120,67	120,83	120,75
C2-C3-C1' [°]	119,53	119,00	119,00	118,93	118,72	119,00
C4-C3-C1' [°]	120,26	120,45	120,29	120,39	120,44	120,25
C3-C4-C10 [°]	117,36	116,99	116,80	116,94	116,60	116,51

C3–C4–O3 [°]	123,96	123,69	123,83	123,81	124,18	124,04
C10–C4–O3 [°]	118,68	119,31	119,37	119,25	119,23	116,51
C4–C10–C5 [°]	121,99	121,45	121,37	121,36	121,08	121,05
C4–C10–C9 [°]	119,49	119,63	119,59	119,65	119,65	119,61
C5–C10–C9 [°]	118,52	118,92	119,04	118,99	119,27	119,34
C10–C5–C6 [°]	120,37	120,49	120,48	120,46	120,30	120,29
C5–C6–C7 [°]	119,98	119,70	119,64	119,69	119,61	119,61
C6–C7–C8 [°]	120,49	120,69	120,75	120,70	120,82	120,83
C7–C8–C9 [°]	118,86	119,03	119,06	119,04	118,92	118,96
C8–C9–C10 [°]	121,78	121,17	121,04	121,13	121,09	120,98
C8–C9–O1 [°]	116,71	116,95	116,97	116,94	116,87	116,86
C3–C1'–N1 [°]	117,92	118,73	118,36	118,46	119,17	119,24
C3–C1'–C2' [°]	123,19	122,92	122,96	123,03	122,82	122,80
N1–C1'–C2' [°]	118,89	118,35	118,67	118,51	118,01	117,96
C1'–N1–C1'' [°]	127,08	128,24	128,21	128,74	127,51	127,25
N1–C1''–C2'' [°]	110,77	110,50	110,45	109,51	109,10	110,16
C1''–C2''–C3'' [°]	117,03	114,28	113,85	112,65	112,34	116,15
C2''–C3''–C4'' [°]	122,61	120,10	120,12	119,98	119,74	123,11
C2''–C3''–C8'' [°]	119,48	121,67	121,65	121,51	121,58	118,75
C3''–C4''–C5'' [°]	121,07	121,79	121,85	121,67	121,45	121,46
C4''–C5''–C6'' [°]	120,64	119,44	119,38	119,41	119,49	119,82
C4''–C5''–O4 [°]	122,42	123,29	123,30	123,29	123,33	123,12
O4–C5''–C6'' [°]	116,93	117,28	117,31	117,30	117,18	117,06
C5''–C6''–C7'' [°]	118,51	119,00	118,95	119,08	119,23	118,96
C5''–C6''–O5 [°]	117,39	117,39	117,42	117,37	117,21	117,26
O5–C6''–C7'' [°]	124,10	123,61	123,63	123,55	123,55	123,78
C6''–C7''–C8'' [°]	120,45	121,15	121,21	121,12	120,98	120,85
C7''–C8''–C3'' [°]	121,39	120,41	120,39	120,28	120,21	120,77

11. Biografija autora

Dušan Dimić je rođen 1990. godine u Kragujevcu.

Fakultet za fizičku hemiju je upisao 2009. godine i završio 2013. godine kao Student generacije sa prosekom 10,00 i ocenom 10 na diplomskom radu. Naredne godine je završio i master studije sa prosekom 10,00 i ocenom 10 na master radu. Školske 2014/2015 je upisao doktorske studije na matičnom fakultetu i položio sve ispite predviđene planom i prosekom, prosek ocena 9,75. Od 2014. godine je zaposlen kao istraživač pripravnik, a od 1. jula 2015 godine kao asistent na Fakultetu za fizičku hemiju. Drži vežbe iz predmeta Molekulska spektrohemijska, Osnovi fotohemije, Forenzička fizička hemija, Fizička hemija 1 i Uvod u laboratorijski rad. Uključen je u projekte promocije nauke i fizičke hemije.

Dušanova oblast interesovanja obuhvata eksperimentalno i teorijsko ispitivanje antioksidacione aktivnosti biološki važnih molekula (neurotransmitera, polifenola i modifikovanih kumarina). Do sada je objavio deset radova u međunarodnim časopisima, a učestvovao je i na većem broju međunarodnih konferencija.

Usavršavao se na Univerzitetu Minesote u Mineapolisu tokom školske 2010/2011. godine kao stipendista Vlade Sjedinjenih američkih država. Praksu na Vajcmanovom institutu u Izraelu je radio u grupi za arheološku hemiju. Na Istraživačkom institutu za teorijsku i primenjenu fizičku hemiju u La Plati Dušan je proveo dva meseca radeći na razvoju QSAR modela. Tri meseca je bio gostujući istraživač na Institutu Karolinska u Stokholmu u grupi za fluorescentnu korelacionu spektroskopiju. Učestvovao je na programu „Srbija na vezi“ tokom koje je sarađivao sa dr Dragoslavom Vidovićem sa Nanjang Tehničkog Univerziteta u Singapuru.

Dušan je tokom osnovnih i master studija bio stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Fonda „Dositeja“ Ministarstva omladine i sporta i Fondacije „Studenica“. Dobitnik je nagrade Društva fizikohemičara Srbije, Srpskog hemijskog društva i SUPERSTE Erste banke za uspehe na studijama i društveni aktivizam.

Iz ovog doktorata su proistekli sledeći radovi i saopštenja:

Radovi:

1. D. Dimić, D. Milenković, J. Ilić, B. Šmit, A. Amić, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, "Experimental and theoretical elucidation of structural and antioxidant properties of vanillylmandelic acid and its carboxylate anion", *Spectrochim. Acta A*, 2018, 198, pp: 61-70, DOI: [10.1016/j.saa.2018.02.063](https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.02.063)
2. D. Dimić, D. Milenković, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, "Antiradical activity of catecholamines and metabolites of dopamine: theoretical and experimental study", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, 19, pp: 12970-12980, DOI: [10.1039/c7cp01716b](https://doi.org/10.1039/c7cp01716b)
3. D. Dimić, D. Milenković, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, "Thermodynamic and kinetic analysis of the reaction between biological catecholamines and chlorinated methylperoxy radicals", *Mol. Phys.*, 2018, 116 (9), pp: 1166-1178. DOI: [10.1080/00268976.2017.1414967](https://doi.org/10.1080/00268976.2017.1414967)
4. D. Dimić, D. Milenković, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, "Structural and Spectral Analysis of 3-methoxytyramine, an important metabolite of dopamine", *Journal of Molecular Structure*, 2017, 1134, pp: 226-236, DOI: [10.1016/j.molstruc.2016.12.082](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.082)

Saopštenja:

1. D. Dimić, E. Avdović, S. Trifunović, I. Potočnjak, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, „Synthesis and crystallographic structure of novel coumarin derivative with dopamine“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28.09.2016., Book of Proceedings, p.: 113-116.
2. A. Radović, D. Dimić, Đ. Nakarada, J. Dimitrić Marković, „EPR and theoretical investigation of hydroxyl radical scavenging of selected catecholamines“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2016., Book of Proceedings, p.: 479-482.
3. D. Sretenović, G. Jovanović, D. Milenković, E. Avdović, J. Đorović, D. Dimić, J. Dimitrić Marković, „The effect of additional OH group on the antiradical activity in dopamine/6-Ohdopamine and octopamine/norepinefrine pairs“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2016., Book of Proceedings, p.: 575-578.
4. D. Dimić, D. Milenković, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, „Theoretical study of the antioxidant activity of dopamine and its metabolites in water“, 13th International

Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2016., Book of Proceedings, p.: 431-434.

5. D. Dimić, D. Milenković, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, „Conformational and vibrational analysis of 3-methoxytyramine“, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2016., Book of Proceedings, p.: 143-146.

12. Prilozi

Prilog 1. Izjava o autorstvu

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Dušan Dimić

Broj indeksa 2014/0301

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Eksperimentalno i teorijsko ispitivanje odnosa struktura-antiradikalna aktivnost
odabranih

neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita.

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Dušan Dimić
Broj indeksa 2014/0301
Studijski program doktorske studije fizičke hemije
Naslov rada Eksperimentalno i teorijsko ispitivanje odnosa struktura-antiradikalna aktivnost odabranih neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita
Mentor dr Jasmina Dimitrić-Marković, redovni profesor i dr Zoran Marković, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci se mogu objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Prilog 3. Izjava o korišćenju

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Eksperimentalno i teorijsko ispitivanje odnosa struktura-antiradikalna aktivnost
odabranih

neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita.

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu otvorenom prisutpu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
 2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
 - ③ **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)**
 4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
 5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
 6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)
- (Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave.).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.