

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Ђуре Накараде, мастер физикохемичара

На IX редовној седници Наставно–научног већа Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду, одржаној 13.06.2019. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Ђуре Накараде, мастер физикохемичара, под насловом:

„Антирадикалска активност аварола: теоријски и експериментални приступ“

Израда докторске дисертације под наведеним насловом одобрена је на VIII редовној седници Наставно–научног већа, одржаној 12.05.2016. године (број одлуке: 591). На основу те одлуке, Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је, на својој XXVII седници одржаној 26.05.2016. године, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације.

На основу прегледа и анализе докторске дисертације кандидата подносимо Наставно–научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидата Ђуре Накараде, мастер физикохемичара, је написана на 167 страна куцаног текста, у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду. Докторска дисертација садржи следећа поглавља: *Увод* (3 стране), *Преглед литературе* (75 страна), *Материјали и методе* (12 страна), *Резултати и дискусија* (35 страна), *Закључак* (4 стране), *Литература* (346 литературних навода, 30 страна) и *Прилог* (2 стране). Кандидат је уз дисертацију приложио *Биографију* и *Листу радова проистеклих из тезе* (2 стране). Дисертација садржи и прилоге прописане правилима Универзитета о подношењу докторске дисертације на одобравање (4 стране).

Дисертација садржи 46 слика (12 слика из постојеће литературе, 34 слике представљају оригиналне резултате кандидата) и 5 табела (све табеле представљају оригиналне резултате кандидата).

У поглављу *Увод* дате су основне информације о пореклу аварола и његовим биолошким активностима од значаја у контексту развоја нових терапија за лечење неуродегенеративних обољења. У овом поглављу наведен је значај изучавања интеракција аварола са слободним радикалима, као и два различита приступа том проблему – теоријски и експериментални. Такође, наглашена је и важност испитивања интеракција аварола са неуротрансмитерима.

Поглавље *Преглед литературе* подељено је на осам делова. У првом делу описан је физиолошки значај слободних радикала и извршена њихова подела. Биолошки значајни радикали су детаљније описани. Дефинисан је појам оксидативног стреса и антиоксиданаса, након чега су наведени општи поступци за одређивање антирадикалске и антиоксидативне активности. У другом делу описана је патогенеза Алцхајмерове болести, као и претпостављени механизми њеног настанка. Укратко је описана и амиотрофична латерална склероза, болест која је такође узрокована слободним радикалима. Приказан је и преглед истраживања спроведених у сврху развоја нових терапија за третман Алцхајмерове болести. У трећем делу је анализиран фармаколошки значај природних производа пореклом из мора и њихова структурна разноликост. Посебан акценат стављен је на аварол, сесквитерпеноидни хидрохинон пореклом из морског сунђера *Dysidea avara*. Описано је мноштво изузетних биолошких активности које овај молекул и његови деривати поседују, како би се нагласио њихов терапеутски потенцијал. Приказани су и изазови који се односе на примену аварола, његову лабораторијску синтезу и узгој сунђера у контролисаним условима. У четвртом делу дат је преглед основа теоријске хемије. Приказане су различите теоријске методе, њихове предности и недостаци. Због значаја за тезу, посебно је описана теорија функционала густине (DFT од енг. density functional theory). Дефинисани су базисни скупови и различити солватациони модели. Као посебно важан приступ у проучавању механизма преноса атома водоника, описана је квантна теорија атома у молекулима (QTAIM од енг. quantum theory of atoms in molecules). На крају ове целине, приказани су и карактеристични механизми преноса атома водоника. У петом делу дате су основе електронске парамагнетне резонантне (ЕПР) спектроскопије. Представљен је начин настанка ЕПР сигнала, основни параметри спектра и конструкција ЕПР спектрометра. Посебно је описана ЕПР техника хватања спинова (такозвана „spin-trap” техника). Шести део односи се на липозоме, пошто је уградњом у њих превазиђен проблем нерастворљивости аварола у води. Описане су различите технике њихове производње и примене. У седмом делу приказане су основе цикличне волтаметрије као изузетно важне електрохемијске методе употребљене за испитивање интеракције аварола (и хидрохинона као његове активне групе) са неуротрансмитером L -допом. Осми део овог поглавља односи се на ултраљубичасту и видљиву (UV-Vis од енг. ultraviolet-visible) спектроскопију, употребљену за додатну карактеризацију интеракција аварола и хидрохинона са L -допом.

Поглавље *Материјали и методе* подељено је на десет главних делова. Први део односи се на рачунарске методе употребљене за проучавање интеракција хидрохинона (као једноставнијег модела у односу на аварол) са одабраним слободним радикалима. У другом делу наведене су све хемикалије коришћене у експерименталном раду. Наредних пет делова односе се на изоловање аварола, синтезу, екструзију и дијализу липозома и одређивање њихове величине. У осмом делу описани су поступци за ЕПР мерења и наведени су параметри снимања. Девети део односи се на процедуре електрохемијских мерења, док су поступци UV-Vis мерења дати у десетом делу.

Поглавље *Резултати и дискусија* подељено је на шест главних целина. У оквиру прве целине приказани су резултати теоријских прорачуна који се односе на интеракцију хидрохинона са хидроксилним, хидропероксилним и метокси радикалом. Проучен је и механизам преноса протона и електрона, као и утицај растварача на овај процес. У другој целини приказани су резултати одређивања величине липозома добијени техником динамичког расејања светлости (DLS од енг. dynamic light scattering). У оквиру треће целине, проучени су резултати добијени ЕПР мерењима антирадикалске активности аварола уграђеног у липозоме према хидроксилном, супероксидном, азот-моноксидном и аскорбил радикалу. Посебно су наглашени резултати који се односе на кинетичке студије и утицај аварола на стабилност липозома при липидној пероксидацији. У четвртој целини приказани су резултати електрохемијских мерења који се односе на понашање L-допе у присуству аварола и хидрохинона. У петој целини дати су резултати UV-Vis спектрофотометријских експеримената којима су ове интеракције додатно потврђене.

У поглављу *Закључак* сумирани су сви резултати и закључци који су проистекли из ове дисертације.

У поглављу *Литература* наведене су све цитиране референце, по редоследу њиховог појављивања у тексту. Цитиране референце покривају све делове дисертације.

У поглављу *Прилог* налазе се слике које се односе на резултате електрохемијских мерења, али су због прегледности изостављене из основног текста.

Б. Опис резултата дисертације

Резултати проистекли из истраживања у оквиру ове докторске тезе су подељени на шест делова: *Теоријски резултати*; *Резултати DLS мерења*; *Резултати ЕПР експеримената*; *Резултати електрохемијских експеримената* и *резултати UV-Vis експеримената*.

Хидрохинон је употребљен као модел за теоријско проучавање реакција аварола са хидроксилним, хидропероксилним и метокси радикалом. Овај одабир направљен је због мањих димензија хидрохинона, чиме је постигнута уштеда рачунарских ресурса и тиме постигнута већа ефикасност прорачуна. Сем тога, сматра се да је хидрохинонски део

молекула аварола носилац његове биолошке активности. Хидроксилни и хидропероксилни радикали одабрани су због свог биолошког значаја, док је метокси радикал одабран као најмањи који је погодан за проучавање интеракција хидрохинона (аварола) са радикалима органског порекла. Анализа антирадикалске активности хидрохинона вршена је у гасовитој фази. Применом QТАИМ методе пружен је увид у промене до којих долази при реакцији хидрохинона са поменутиим радикалским врстама. На основу ових резултата може се закључити да пренос атома водоника са хидрохинона на посматране слободнорадикалске врсте прати механизам спрегнутог преноса протона и електрона (РСЕТ, од енгл. proton-coupled electron transfer), при чему истовремено долази до прелаза протона и електрона на радикалски атом кисеоника. Растојања између атома водоника и хидрохинонског/радикалског атома кисеоника, као и вредности електронске густине у критичним тачкама ове две везе се монотонно мењају у смеру од предреакционог ка постреакционом комплексу. До кључних промена дужине ових веза и њихових својстава (електронске густине, њеног Лапласијана, делокализационог индекса) долази у долини производа, ближе глобалном минимуму хиперповрши потенцијалне енергије. Близина донора и акцептора у прелазном стању за последицу има необичан тренд промене својстава атома водоника на том месту, и то код свих посматраних реакција. Применом три различита модела растварача, установљено је да код реакција хидрохинона са хидроксилним и хидропероксилним радикалом присуство растварача не доводи до промене механизма преноса атома водоника, нити редоследа преноса самог протона и електрона.

Упркос различитим корисним биолошким активностима аварола, његова евентуална примена у терапији је отежана чињеницом да је слабо растворан у води. Како би овај проблем био превазиђен, аварол је уграђен у зид липозома направљених од DPPC-а (1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин). Овакви липозоми одабрани су због биокомпатибилности и једноставности прављења. DLS мерењима утврђено је да су након екструзије липозоми имали униформну величину (око 90-100 nm). У циљу добијања информација о локалној динамици липидног двослоја липозома, употребљена је спински обележена масна киселина – 5-доксилстеаринска киселина (5-ДС). Обележавањем употребом 5- ДС, установљено је да ни месец дана након синтезе не долази до промена у флуидности мембране липозома. Након што су у суспензији аваролских липозома (односно 100 % DPPC узетих као контрола) генерисани хидроксилни, супероксидни и азот-моноксидни радикал, уочено је да параметар уређености у извесној мери опада. На основу тога је изведен закључак да је дошло до повећања флуидности у области липидног двослоја која је најближа граници са воденом средином. Пошто је код аваролских липозома промена флуидности била мање изражена, закључено је да аварол штити липозоме од липидне пероксидације. На основу мерења интензитета ЕПР сигнала два минута након генерисања слободних радикала у суспензији аваролских, односно контролних липозома, установљено је да аварол поседује снажну антирадикалску активност. Конкретно, у присуству аварола дошло је до умањења концентрације

хидроксилних радикала за 86,2 % и супероксидних радикала за 50,9 % . Добијени резултати слажу се са резултатима теоријских прорачуна, којима је установљено да је енергијска баријера за реакцију хидрохинона са хидроксилним радикалом изузетно ниска (1kJ/mol). Такође, ЕПР мерењима је установљено да аварол има благу антирадикалску активност према реактивним азотним врстама, јер је умањио концентрацију азот-моноксидног радикала за 23,6 %. Овакав резултат је користан са клиничког становишта, пошто је азот-моноксидни радикал при нормалним физиолошким условима присутан у организму и има сигналну улогу, те би интензивно уклањање овог радикала било непожељно. Од раније је познато да је стабилност аскорбил радикала у воденим растворима упитна, као и његова способност да прође кроз мембрану липозома и интерагује са аваролом. Из тог разлога, активност аварола према аскорбил радикалу испитивана је у диметил-сулфоксиду. ЕПР експериментима установљено је да је аварол умањио концентрацију аскорбил радикала за 61,8 %. Исти експерименти поновљени су уз праћење кинетике реакција аварола током 40 минута. На овај начин потврђени су исти трендови, али су добијене сложене кинетике процеса. До тога вероватно долази јер се паралелно са реакцијом између слободних радикала и аварола дешавају и споредни процеси (попут интеракције аварола са спин-адуктима, интеракције спин-адуката са липидним двослојем, или њиховог спонтаног разлагања) који имају утицај на редукцију сигнала. Као оптимално време за снимање ЕПР спектра узет је други минут од генерисања слободних радикала, јер тада нису изражени споредни процеси. На основу свих резултата ЕПР експеримената, може се закључити да аварол заиста поседује снажан антирадикалски потенцијал према биолошки релевантним слободним радикалима. Из тог разлога, аварол је добар кандидат за развој нових терапија за третман неуродегенеративних обољења узрокованих слободним радикалима. Упркос тој чињеници, услед слабе растворљивости у води, аварол би било могуће користити искључиво локално, што не би имало велики значај у терапији неуродегенеративних болести. Уграђивањем аварола у липозоме превазиђен је проблем његове растворљивости, а установљено је да он додатно стабилизује липозоме и штити их од липидне пероксидације. Ови закључци додатно су занимљиви јер су први те врсте. До сада није покушавано комбиновање ЕПР методе и инкорпорације у липозоме у циљу проучавања антирадикалске активности водонерастворних једињења.

Цикловолтаметријским експериментима закључено је да је помоћу аварола могуће модификовати површину електроде од стакластог угљеника, након чега долази до промене константе брзине преноса електрона између тако модификоване електроде и L-допе. Пренос наелектрисања побољшан је у одређеном концентрационом опсегу. Цикловолтаметријски, али и помоћу UV-Vis експеримената, установљено је да L-допа остварује снажнију интеракцију са хидрохиноном него са аваролом, вероватно услед присуства терпеноидног сегмента у структури аварола, што доводи до конформационих ограничења.

На основу извршених теоријских прорачуна и експеримената може се закључити да је хидрохинон могуће користити за теоријско испитивање интеракција аварола са различитим неволуминозним системима. Такође, установљено је и да хидрохинон јесте носилац антирадикалске активности аварола, као и да постоји корелација између теоријских прорачуна и ЕПР експеримената. Овим експериментима показано је да аварол поседује снажну антирадикалску активност према готово свим одабраним радикалима. Проблем нерастворљивости аварола успешно је превазиђен уграђивањем у зид липозома. Модификацијом површине електроде аваролом могуће је повећати брзину преноса електрона између електроде и неуротрансмитера.

Закључци који су из експеримената и прорачуна проистекли, односе се и на даља истраживања. Побољшањем рачунарских ресурса било би могуће уместо хидрохинона теоријске прорачуне вршити и употребом структуре аварола, чиме би се добила још целовитија слика његових интеракција са различитим слободнорадикалским врстама. Такође, било би од значаја испитати и начин на који сесквитерпеноидни део молекула аварола интерагује са околином. Иако можда није носилац биолошке активности аварола, овај део молекула без сумње ипак има утицај на њу. Потребно је ЕПР експериментима обухватити како аваролу сродне молекуле и друге врсте слободних радикала, тако и различите формулације липозома. То је значајно ради проналаска што оптималније формулације у погледу стабилности, ефикасности отпуштања активних компоненти и времена задржавања липозома у организму. Цикловолтаметријске експерименте је потребно проширити и на друге неуротрансмитере, као и на испитивања њихове симултане детекције у раствору помоћу електрода чија је површина модификована аваролом.

В. Упоредна анализа резултата дисертације са подацима из литературе

Антиоксидативна активност фенолних једињења према хидроксилном и хидропероксилном радикалу до сада је била изучавана методама теоријске хемије. Молекул дијадезина је анализиран [1] ради утврђивања механизма реакције са једним, односно два молекула хидроксилног радикала. Установљено је да до преноса атома водоника може доћи код било које од две хидроксилне групе овог полифенолног молекула, које су окарактерисане као енергетски повољна места за поменути процес. Такође, у испитивању антиоксидативне активности 25 фенолних једињења [2], претпостављено је да је у свим реакцијама доминантни механизам пренос атома водоника. На основу резултата овог истраживања, закључено је да су најреактивнији молекули са хидрохинонском групом. У оквиру докторске дисертације кандидата, претпостављено је да је хидрохинонска група активни део молекула аварола, па је она употребљена као модел-молекул за проучавање антирадикалске активности аварола. Аналогно поменутих литературним изворима, претпостављено је да до преноса атома водоника са хидроксилне групе долази при реакцији хидрохинона са поменута два радикала. У литератури [3] је

описано и то да је хидропероксилни радикал доминантно укључен у процес преноса атома водоника са хидроксилне групе редукованог облика коензима Q. Овај молекул реактивнији је према хидроксилном, него према хидропероксилном радикалу [3]. Енергетска баријера израчуната за реакције хидрохинона са хидроксилним и хидропероксилним радикалом у оквиру ове дисертације у складу је са поменутиим трендом. Досадашња истраживања ових реакција била су усмерена на разликовање тога да ли при преносу атома водоника протон и електрон прелаз врше као један ентитет или одвојено. Интеракција различитих супституисаних фенолних једињења са хидропероксилним радикалом у гасовитој фази проучавана је применом QТАИМ методе [4]. На путу од предреакционог комплекса ка прелазном стању долазило је до промене одређених атомских својстава (запремине атома водоника, вредности електронске густине и диполног момента). На основу ових промена, закључено је да се овај процес дешава посредством спрегнутог преноса протона и електрона. Исти механизам делом је заступљен и у реакцији *trans*-ресвератрола са хидроксилним и хидропероксилним радикалом [5]. Ипак, до сада није детаљније проучавано да ли најпре долази до кретања протона, праћеног преносом електрона, или је случај обрнут. У дисертацији кандидата установљено је да се одабрана атомска својства монотонно мењају током реакције. Овај тренд упућује на одсуство интермедијера, односно на то да се реакција не одвија кроз више елементарних корака. На основу проучавања атомских својстава, закључено је да се процес преноса атома водоника са хидроксилне групе хидрохинона заиста дешава путем спрегнутог преноса протона и електрона. Такође, установљено је и да се пренос протона и електрона на атом кисеоника у молекулу радикала дешава истовремено. Дужине настајуће и раскидајуће везе монотонно су се мењале током реакције. У реакцији са оба радикала, својства атома водоника била су неуобичајена у околини прелазног стања, услед велике близине кисеоникових атома хидрохинона и радикала. Ово се посебно одразило на неједнаку промену запремине атома водоника током реакције. Применом три различита модела растварача, установљено је да он не утиче на механизам преноса атома водоника код реакције хидрохинона са хидропероксилним радикалом. Услед захтевности у погледу рачунарских ресурса, за моделовање је одабрана само ова реакција, јер је имала већу вредност енергетске баријере. Применом истих метода, у тези кандидата је анализирана и интеракција хидрохинона са метокси радикалом. Ни код ове реакције није уочено присуство интермедијера дуж реакционог пута, па је претпостављено да се ради о спрегнутом преносу протона и електрона. Тренд промене атомских својстава атома водоника при приближавању прелазном стању и у долини производа додатно потврђују да хидрохинон и са метокси радикалом интерагује путем спрегнутог преноса протона и електрона.

У претходне три деценије објављен је значајан број радова у оквиру којих је аварол испитиван. Установљено је да овај молекул поседује изузетно широк спектар биолошке активности и ниску токсичност. Антипсоријатична, антибактеријска, антимицитотска, антиинфламаторна, антитуморска и анти-НIV активност само су неке биолошке

активности од значаја које аварол поседује. Познато је и да може проћи кроз крвно-мождану баријеру. Пошто је установљено да аварол и његови деривати инхибирају ацетилхолинестеразу, претпостављено је да их је могуће користити у терапији Алцхајмерове болести. Међутим, у литератури нема значајног броја радова који се тичу антирадикалске активности аварола. Познато је да екстракти сунђера *Dysidea avara* (код којих је аварол главна активна компонента) показују антирадикалску активност према азот-моноксидном радикалу [6]. Међутим, треба имати у виду да се у овом истраживању не ради о чистој супстанцији (аваролу). Антирадикалска активност аварола тестирана је на DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикал [7]. Иако је у питању стабилан радикал, који се често користи као стандард за испитивање антирадикалске активности различитих супстанци, он нема биолошки значај. Упркос значајним предностима које ЕПР метода нуди, није познато да је антирадикалска активност аварола до сада проучавана употребом ове методе. Такође, није проучавана ни интеракција аварола са биолошки релевантним радикалима, вероватно због чињенице да је многе биолошки значајне радикале неопходно генерисати у воденој средини, а познато је да је аварол нерастворан у води. У оквиру ове дисертације, тај проблем је превазиђен уградњом аварола у зид липозома. Иако ова идеја није нова, први пут је успешно употребљена у комбинацији са ЕПР методом за испитивање антирадикалске активности водонерастворних једињења према биолошки значајним слободним радикалима. Претходни покушаји односили су се на уградњу биолошки активних једињења у мицеле [8], али њихова активност није испитивана према биолошки значајним слободним радикалима. Контролним експериментима са липозомима који нису садржали аварол елиминисан је утицај самих липозома на резултате мерења. На овај начин добијени су директни подаци о антирадикалској активности аварола према хидроксилном, супероксидном и азот-моноксидном радикалу. Блага антирадикалска активност аварола према азот-моноксидном радикалу заправо је пожељна, знајући да овај радикал у организму има сигналну улогу при физиолошким условима. Поред тога што је установљено да аварол поседује изузетну антирадикалску активност према већини одабраних радикала, посебно су занимљиви резултати који се односе на активност према супероксидном радикалу. Приликом испитивања активности аварола према овом радикалу, коришћена су два поступка за његово генерисање, рибофлавин/светлост и хипоксантин/ксантин-оксидазни систем. При употреби рибофлавин/светлост генераторског система, иницијални сигнал DEPMPO/ООН адукта био је већи у присуству аваролских липозома у односу на контролне 100 % DPPC липозоме. Познато је да при физиолошким условима флавинска група рибофлавина може постојати у семихинонском облику [9]. Такође, познато је и да рибофлавин формира комплекс са молекулима хидрохинона посредством флавинске групе [10]. Могуће је да до пораста ЕПР сигнала долази јер флавинска група рибофлавина интерагује са хидрохинонском групом аварола, поспешујући производњу супероксидног радикала. У овом конкретном случају, због тога је погодније било користити хипоксантин/ксантин-оксидазни генераторски систем. Резултати кандидата указују да је овај систем боље користити и уопште, при испитивању

антирадикалске активности других једињења која садрже хидрохинонску групу према супероксидном радикалу, пошто у литератури не постоје наводи да таква једињења интерагују са хипоксантином или ксантин-оксидазом. Обележавањем липозома помоћу 5-ДС спинске пробе и праћењем промене параметра уређености при излагању липозома дејству слободних радикала, уочено је да аварол стабилизује њихову структуру и штити липозоме од липидне пероксидације, и месец дана након синтезе липозома.

Због потенцијалне примене аварола у терапији неуродегенеративних болести, корисно је било испитати да ли интерагује са неуротрансмитерима. У ту сврху електрохемијски је проучавана његова интеракција са L-допом. Овај молекул је прекурсор катехоламинских неуротрансмитера (допамина, епинефрина и норепинефрина), које карактерише заједнички структурни мотив – катехолна група. Пошто ова једињења имају велики биолошки значај, детаљније су електрохемијски проучавана. Установљено је да њихово електрохемијско понашање зависи од поларности растварача, природе помоћног електролита, присуства адитива киселог или базног типа, водоничног везивања и формирања јонских веза. Досадашња истраживања углавном су се односила на електрохемијску детекцију једног или више неуротрансмитера у воденој средини. Највећи изазови у досадашњим експериментима односили су се на малу брзину трансфера електрона, пасивизацију електроде услед адсорпције неуротрансмитера на њеној површини и присуство интерферената у раствору електролита [11]. На основу података доступних у литератури, установљено је да детекција катехолних једињења у воденој средини може бити побољшана употребом електрода чија је површина модификована једињењима која садрже хинонску групу [12]. Аварол је електрохемијски већ проучаван, у протичним и аprotичним растварачима [13, 14]. У оквиру ове дисертације, упоредо је проучавано и електрохемијско понашање хидрохинона као активног сегмента аварола. Резултати електрохемијских експеримената приказани у дисертацији кандидата у доброј су корелацији са литературним изворима. Цикловолтаметријским експериментима је установљено да модификацијом површине електроде од стакластог угљеника наношењем аварола на њу долази до побољшаног преноса наелектрисања када се она нађе у раствору L-допе. Овај тренд уочен је за одређени опсег концентрација аварола, што је у складу са постојећим истраживањима [12]. Из постојећих радова закључује се да формирање хемисорбованог монослоја каталитички делује на оксидацију катехола. На цикловолтамограмима L-допе могуће је приметити да су струје пикова биле ниже при другом скенирању у односу на прво. До ове појаве долази услед пасивизације електроде превлачењем њене површине полимерним филмом при анодној реакцији L-допе, као и аварола. Ова појава уочавана је и раније код сличних система [13, 15]. Познато је да до стварања полимерног филма долази при оксидацији многих фенолних једињења, јер радикали који том приликом настају подлежу димеризацији и полимеризацији са другим радикалима и молекулима. Такође, установљено је и да је интеракција L-допе била снажнија са хидрохиноном него са аваролом. На тај начин је потврђена претпоставка да је

хидрохинонски део носилац биолошке активности аварола. Исти трендови уочени су и UV-Vis експериментима.

- [1] Chakraborty, S.; Biswas, P. K. Elucidation of the mechanistic pathways of the hydroxyl radical scavenging reaction by Daidzein using hybrid QM/MM dynamics. *J. Phys. Chem. A* **116**, 8775–8785 (2012).
- [2] Ancerewicz, J.; Migliavacca, E.; Carrupt, P. A.; Testa, B.; Brée, F.; Zini, R.; Tillement, J. P.; Labidalle, S.; Guyot, D.; Chauvet-Monges, A. M.; Crevat, A.; Le Ridant, A. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 113–120 (1998).
- [3] Espinosa-García, J. Theoretical study of the trapping of the OOH radical by coenzyme Q. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 920–927 (2004).
- [4] Singh, N.; O'Malley, P. J.; Popelier, P. L. A. Mechanistic aspects of hydrogen abstraction for phenolic antioxidants. Electronic structure and topological electron density analysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 614–619 (2005).
- [5] Iuga, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Russo, N. Antioxidant activity of trans -resveratrol toward hydroxyl and hydroperoxyl radicals: A quantum chemical and computational kinetics study. *J. Org. Chem.* **77**, 3868–3877 (2012).
- [6] Aktas, N.; Genc, Y.; Gozcelioglu, B.; Konuklugil, B.; Sebnem Harput, U. Radical scavenging effect of different marine sponges from mediterranean coasts. *Rec. Nat. Prod.* **7**, 96–104 (2013).
- [7] De Rosa, S.; Tommonaro, G. Bioactive marine prenylated quinones/quinols. *Bioact. Nat. Prod.* **36**, 163–218 (2012).
- [8] Fukuda, H.; Goto, A.; Yoshioka, H.; Goto, R.; Morigaki, K.; Walde, P. Electron spin resonance study of the pH-induced transformation of micelles to vesicles in an aqueous oleic acid/oleate system. *Langmuir* **17**, 4223–4231 (2001).
- [9] Kao, Y. T.; Saxena, C.; He, T. F.; Guo, L.; Wang, L.; Sancar, A.; Zhong, D. Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13132–13139 (2008).
- [10] Bear, C. A.; Waters, J. M.; Waters, T. N. A charge-transfer complex between riboflavin and hydroquinone: Crystal structure. *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **1**, 702 (1970).
- [11] Zhang, H. M.; Zhou, X. L.; Hui, R. T.; Li, N. Q.; Liu, D. P. Studies of the electrochemical behavior of epinephrine at a homocysteine self-assembled electrode. *Talanta* **56**, 1081–1088 (2002).
- [12] Duvall, S. H.; McCreery, R. L. Self-catalysis by catechols and quinones during heterogeneous electron transfer at carbon electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6759–6764 (2000).
- [13] Tabaković, I.; Davidović, A.; Müller, W. E. G.; Zahn, R. K.; Sladić, D.; Dogović, N.; Gašić, M. J. Electrochemical reactivity of biologically active quinone/hydroquinone sesquiterpenoids on glassy carbon electrodes. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **17**, 567–577 (1987).
- [14] Gašić, M. J.; Sladić, D. The avarol-avarone redox behaviour in acetonitrile. *Croat. Chem.*

Acta **58**, 531–536 (1985).

[15] Liu, X.; Zhang, Z.; Cheng, G.; Dong, S. Spectroelectrochemical and voltammetric studies of L-DOPA. *Electroanalysis* **15**, 103–107 (2003).

Г. Научни радови публиковани из резултата дисертације

Кандидат Ђура Накарада је из резултата дисертације објавио 1 рад у врхунском међународном часопису (M₂₁), 2 рада у истакнутим међународним часописима (M₂₂), као и 1 рад у међународном часопису (M₂₃). Кандидат је први аутор на три рада.

Рад у врхунском међународном часопису (M₂₁):

Ђ. Nakarada, M. Petković, Mechanistic insights on how hydroquinone disarms OH and OOH radicals, *International Journal of Quantum Chemistry*, **4**, e25496 (2018).

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/qua.25496>

Радови у истакнутим међународним часописима (M₂₂):

Ђ. Nakarada, B. Pejin, G. Tommonaro, M. Mojović, Liposomal integration method for assessing antioxidative activity of water insoluble compounds toward biologically relevant free radicals: example of avarol, *Journal of Liposome Research*, doi: 10.1080/08982104.2019.1625378 (2019).

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08982104.2019.1625378>

M. Petković, Ђ. Nakarada, M. Etinski, When hydroquinone meets methoxy radical: Hydrogen abstraction reaction from the viewpoint of interacting quantum atoms, *Journal of computational chemistry*, **39**, 1868–1877 (2018).

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.25359>

Рад у међународном часопису (M₂₃):

Ђ. Nakarada, B. Pejin, D. Dimić, A. Ivanović-Šašić, Z. Mojović, M. Mojović, Electrochemical and spectroscopic study of L-dopa interaction with avarol, *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, **127**, 219-229 (2019).

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11144-019-01575-z>

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације проверена је на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22. 06. 2018). Помоћу програма iThenticate, утврђено је да количина подударача текста износи 4 %. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној

литератури, тзв. општих места у вези са темом дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. овог Правилника. Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација кандидата Ђуре Накараде у потпуности оригинална, као и да су у потпуности задовољена академска правила цитирања.

Ђ. Закључак Комисије

На основу изложеног Комисија закључује да резултати кандидата Ђуре Накараде, мастер физикохемичара, приказани у оквиру докторске дисертације представљају оригиналан и значајан научни допринос области физичке хемије. Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Ђуре Накараде, мастер физикохемичара под насловом:

„Антирадикалска активност аварола: теоријски и експериментални приступ“

и предлаже Наставно-научном већу Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду да дисертацију прихвати и одобри њену јавну одбрану, чиме би били испуњени сви услови да кандидат стекне звање доктор физикохемијских наука.

Београд, 04.07.2019.

Комисија

др Милош Мојовић, ванредни професор
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Игор Пашти, ванредни професор
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Горан Јањић, виши научни сарадник
Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду

Прилог 1 – Библиографија кандидата

Радови у врхунским међународним часописима (M₂₁):

1. **Đ. Nakarada**, M. Petković, Mechanistic insights on how hydroquinone disarms OH and OOH radicals, *International Journal of Quantum Chemistry*, **4**, e25496 (2018).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/qua.25496>
2. **Đ. Nakarada**, M. Etinski, M. Petković, Using density functional theory to study neutral and ionized stacked thymine dimers, *The journal of physical chemistry A*, **120**, 7704–7713 (2016).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpca.6b06493>

Радови у истакнутим међународним часописима (M₂₂):

1. **Đ. Nakarada**, B. Pejin, G. Tommonaro, M. Mojović, Liposomal integration method for assessing antioxidative activity of water insoluble compounds toward biologically relevant free radicals: example of avarol, *Journal of Liposome Research*, doi: 10.1080/08982104.2019.1625378 (2019).
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08982104.2019.1625378>
2. M. Petković, **Đ. Nakarada**, M. Etinski, When hydroquinone meets methoxy radical: Hydrogen abstraction reaction from the viewpoint of interacting quantum atoms, *Journal of computational chemistry*, **23**, 1868–1877 (2018).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.25359>
3. Cvijetić, M. Vitorović-Todorović, I. Juranić, **Đ. Nakarada**, M. Milosavljević, B. Drakulić, Reactivity of (*E*)-4-aryl-4-oxo-2-butenic acid phenylamides with piperidine and benzylamine: kinetic and theoretical study, *Monatshefte für chemie – Chemical monthly*, **145**, 1297–1306 (2014).
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00706-014-1223-8>
4. B. Pejin, **Đ. Nakarada**, M. Novaković, V. Tešević, A. Savić, K. Radotić, M. Mojović, Antioxidant volatiles of the freshwater bryozoan *Hyalinella punctata*, *Natural product research*, **28**, 1471–1475 (2014).
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2014.905565>

Радови у међународним часописима (M₂₃):

1. **Đ. Nakarada**, B. Pejin, D. Dimić, A. Ivanović-Šašić, Z. Mojović, M. Mojović, Electrochemical and spectroscopic study of L-dopa interaction with avarol, *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, **127**, 219-229 (2019).
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11144-019-01575-z>

Саопштења на скуповима међународног значаја, штампана у целини (M₃₃):

1. A. Vesković, A. Pavićević, **Đ. Nakarada**, B. Prokić, M. Perović, S. Kanazir, M. Mojović, A. Popović-Bijelić, Aminoxyl spin probes as blood brain barrier integrity markers – still a challenge after 40 years, *14th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, Serbia, September 24th-28th, 2018, 451-454.
2. **Đ. Nakarada**, A. Pavićević, A. Vesković, B. Pejin, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, EPR determination of antioxidative activity of water-insoluble compounds towards biologically relevant radicals – example of avarol, *14th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, Serbia, September 24th -28th, 2018, 519-522.
3. A. Radović, D. Dimić, **Đ. Nakarada**, J. Dimitrić Marković, EPR and theoretical investigation of hydroxyl radical scavenging of selected catecholamines, *14th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, Serbia, September 24th -28th, 2018, 479-482.

Саопштења на скуповима међународног значаја, штампана у изводу (M₃₄):

1. **Đ. Nakarada**, Dysidea avara as a natural source of a potent free radical scavenger – an EPR study, *2018 Global Food Science Student Competition*, Wuxi, China, November 14th-18th, 2018, P07.
2. A. Radović, D. Dimić, **Đ. Nakarada**, J. Dimitrić Marković, Antioxidant and pro-oxidant properties of catecholamines and their metabolites towards hydroxyl radical, *6th Conference of the Young Chemists of Serbia*, Belgrade, Serbia, October 27th, 2018, 9.
3. **Đ. Nakarada**, B. Pejin, M. Mojović, Antiradical activity of avarol, *UNIFOOD Conference*, Belgrade, Serbia, October 5th-6th, 2018, HZP18/FHP18.
4. A. Popović-Bijelić, A. Pavićević, S. Stamenković, **Đ. Nakarada**, M. Jovanović, B. Prokić, M. Perović, S. Kanazir, P. Andus, M. Mojović, Mitochondrial Fe-S clusters in

neurodegenerative diseases, *4th Congress of the Serbian Society for mitochondrial and free radical physiology*, Belgrade, Serbia, September 28th-30th, 2018, 29.

5. **Đ. Nakarada**, A. Popović-Bijelić, A. Pavićević, A. S. Shevchenko, M. Mojović, Investigation of radical scavenging potential and total polyphenolic and flavonoid content of *Inonotus obliquus* extracts: EPR and UV-Vis study, *3rd International Conference on Plant Biology*, Belgrade, Serbia, June 9th-12th, 2018, 111.
6. A. B. Vesković, A. Pavićević, **Đ. Nakarada**, B. Prokić, S. Petričević, M. Perović, S. Kanazir, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, The blood brain barrier integrity and the brain tissue redox status in the transgenic 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease, *8th Regional Biophysics Conference*, Zreče, Slovenia, May 16th-20th, 2018, PS-05.
7. **Đ. Nakarada**, B. Pejin, Z. Mojović, M. Mojović, Electrochemical behavior of neurotransmitters in the presence of hydroquinone and avarol, *8th Regional Biophysics Conference*, Zreče, Slovenia, May 16th-20th 2018, PS-42.
8. **Đ. Nakarada**, M. Petković, C. Iodice, G. Tommonaro, B. Pejin, A computational insight into antiradical activity of the marine natural product avarol, *3rd Congress of the Serbian Society for mitochondrial and free radical physiology*, Belgrade, Serbia, September 2015, 44.
9. I. Petrešević, B. Pejin, **Đ. Nakarada**, N. Đorđević, V. Tešević, M. Mojović, J. Dimitrić-Marković, The correlation between total polyphenolic content and anti-DPPH radical activity of selected Vranac red wine samples, *3rd Congress of the Serbian Society for mitochondrial and free radical physiology*, Belgrade, Serbia, September 25th-26th, 2015, 44.
10. B. Pejin, **Đ. Nakarada**, T. Obradović, M. Sabovljević, Lj. Vujisić, M. Mojović, J. Dimitrić-Marković, The moss *Rhodobryum ontariense* volatiles may inspire new therapies in the treatment of heart diseases including hypertension, *2nd International conference on plant biology, 21st symposium of the Serbian plant physiology Society*, Petnica, Serbia, June 17th-20th, 2015, 84-85.
11. B. Pejin, **Đ. Nakarada**, M. Sabovljević, Lj. Vujisić, V. Tešević, V. Vajs, Thapsic acid, a rarely found natural product among bryophyte species, *2nd International conference on plant biology, 21st symposium of the Serbian plant physiology Society*, Petnica, Serbia, June 17th-20th, 2015, 98-99.

12. B. Pejin, **Đ. Nakarada**, M. Lazović, A. Savić, M. Mojović, In vitro anti-hydroxyl radical activity of the sesquiterpenoid hydroquinone avarol using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *5th CASEE Conference: "Healthy food production and environmental preservation – the role of agriculture, forestry and applied biology"*, Novi Sad, Serbia, May 25th-27th, 2014, 52-53.
13. B. Pejin, **Đ. Nakarada**, M. Novaković, A. Savić, V. Tešević, A. Hegediš, I. Karaman, M. Horvatović, K. Radotić, M. Mojović, Anti-hydroxyl radical activity of volatile natural products of the freshwater bryozoan *Hyalinella punctata* (Hancock 1850), *8th International conference of the chemical societies of the South-East European countries*, Belgrade, Serbia, June 27th-29th, 2013, 84.

Саопштења на скуповима националног значаја, штампана у целини (M₆₃):

1. I. Cvijetić, M. Vitorović-Todorović, I. Juranić, **Đ. Nakarada**, M. Radulović, B. Drakulić, Kinetic and mechanism of the addition of piperidine and benzylamine to the acrylacrylic acid phenylamides, *49th Meeting of the Serbian crystallographic Society*, Kragujevac, Serbia, May 13th-14th, 2011, 167-171.

Саопштења на скуповима националног значаја, штампана у изводу (M₆₄):

1. B. Pejin, **Đ. Nakarada**, M. Novaković, S. Gorjanović, F. Pastor, M. Mojović, A. Savić, V. Tešević, A. Hegediš, I. Karaman, M. Horvatović, K. Radotić, D. Sužnjević, Antioksidativna aktivnost isparljivih komponenti *Hyalinella punctata* određena polarografijom sa jednosmernom strujom koristeći anodni talas vodonik-peroksida, *Drugi kongres Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju*, Knjiga sažetaka, Niš, Srbija, 28. septembar 2013, 50.