

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Đura Nakarada

**Antiradikalska aktivnost avarola:  
teorijski i eksperimentalni pristup**

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Đura Nakarada

**Antiradical activity of avarol:  
Theoretical and experimental approach**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

**Mentori:**

**dr Milena Petković, vanredni profesor**

**Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu**

**dr Boris Pejin, naučni savetnik**

**Institut za multidisciplinarna istraživanja – IMSI**

**Univerziteta u Beogradu**

**Odsek za nauke o živim sistemima**

**Članovi komisije:**

---

**dr Miloš Mojović, vanredni profesor**

**Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu**

---

**dr Igor Pašti, vanredni profesor**

**Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu**

---

**dr Goran Janjić, viši naučni saradnik**

**Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu**

**Datum odbrane doktorske teze: \_\_\_\_\_**

Ova disertacija je urađena na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu u okviru projekta III41005 „Biomarkeri u neurodegenerativnim i malignim procesima“, čiji je rukovodilac dr Pavle Anđus, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Elektrohemijski eksperimenti urađeni su u Centru za katalizu Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se svojim mentorima, **dr Mileni Petković**, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, i **dr Borisu Pejnu**, naučnom savetniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja, na pomoći i saradnji pruženim prilikom izrade ove disertacije.

**Dr Igoru Paštiju**, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, i **dr Goranu Janjiću**, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, zahvaljujem se što su prihvatili učešće u komisiji za pregled, ocenu i odbranu ove disertacije. Hvala im na mnogim korisnim sugestijama i posvećenom vremenu.

Posebnu zahvalnost dugujem **dr Milošu Mojoviću**, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, na znanju i iskustvu koje mi je svesrdno i nesebično preneo, kao i velikom poverenju koje mi je ukazao. Pomažući mi u izradi eksperimentalnog dela teze, na sebe je preuzeo veoma veliku obavezu, i na tome sam mu izuzetno zahvalan. Njegova neizmerna podrška, razumevanje i prijateljski saveti pomogli su mi da uspešno prebrodim sve probleme i izazove koje sam pred sobom imao. Drago mi je jer sam imao priliku da učim od njega.

**Dr Zorici Mojović**, naučnom savetniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju neizmerno sam zahvalan na saradnji pri izvođenju elektrohemijskih eksperimenata koji su deo ove teze, kao i pomoći i znanju koje mi je pružila. Strpljenjem, ljubaznošću i iskrenim savetima puno mi je pomogla tokom studija.

**Dr Ani Popović-Bijelić**, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, zahvaljujem se na bezrezervnoj podršci, brojnim korisnim savetima, entuzijazmu, energiji i motivaciji koji su mi puno značili i učinili svaki radni dan uspešnijim od prethodnog. Svojim savetima značajno je poboljšala kvalitet ove teze.

**Dr Marku Dakoviću**, docentu Fakulteta za fizičku hemiju, zahvalan sam na velikodušnosti, savetima, mnogim korisnim idejama i zanimljivostima koje je sa mnom podelio i time značajno doprineo izradi ove disertacije.

**Dr Jasmini Dimitrić-Marković**, redovnom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, zahvaljujem se na savetima i velikoj podršci koju mi je tokom studija pružila.

Redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u penziji, **dr Živoslavu Tešiću**, zahvalan sam na izuzetnoj ljubaznosti, pomoći i malim gestovima koji su mi mnogo značili.

Zahvaljujem se kolegini **Magdaleni Radović** iz Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na pomoći pri analizi lipozoma. Veliku zahvalnost dugujem i gospodinu **Daliboru Andresu**, na korisnim informacijama i ustupanju fotografije sušera *Dysidea avara* za potrebe izrade ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Aleksandri Pavićević**, **Ani Vesković**, **Đorđu Cvjetinoviću**, **Milanu Popoviću** i **dr Igoru Petrušiću** na prijateljstvu, pomoći i podršci koje su mi pružili. O usponu na Alpe, vojvođanskim momentima, bilijaru, prvom ekstrudovanju lipozoma i snalaženju po Košutnjaku još ćemo se priča napričati. Hvala im jer smo lakše zajedno podneli svaki neuspeh, podelili mnogo radosnih trenutaka i naučili da neke bitke moraju da se vode više puta da bi se dobile, ali su takve pobede najslađe.

Zahvaljujem se **Vuku Jovanoviću**, **dr Dušanu Dimiću** i **dr Branislavu Stankoviću** na velikoj pomoći tokom studija i izrade ove disertacije, kolegijalnosti i iskrenom prijateljstvu.

Veliku zahvalnost dugujem **Milici Milosavljević** i **Aleksandru Karajiću**, za sve godine našeg nezaboravnog druženja, lepih i manje lepih trenutaka koje smo zajedno prevazilazili, besanim noćima u „Patrisu” i fabrici čokolade koji su bili kolateralna šteta. Aleksandru se zahvaljujem i na pomoći pruženoj tokom pisanja ove disertacije.

**Dušanu Kolarskom** se zahvaljujem na godinama izuzetnog prijateljstva i pomoći na koju sam u svakom trenutku mogao da računam. Hiljade kilometara i puno godina dodatno su učvrstili iskreno prijateljstvo između nas. Posebno se zahvaljujem **Jeleni Konstantinović**, **Milici** i **Životi Selakoviću** jer su mi pružili veliku podršku i pomoć tokom studija.

**Slađani Nestorović**, **Vladimiru Babinki** i **Milanu Stojanoviću** zahvalan sam na puno lepih uspomena iz školske klupe i neraskidivom prijateljstvu.

Neizmerno sam zahvalan doktoru **Staniši Baumanu**, koji je u više navrata činio i nemoguće kako bi mi spasao život. Bez njegove izuzetne upornosti, dobre volje i zalaganja, mnogo toga danas ne bih mogao. Zaslužan je za veliki deo mog uspeha i, nadasve, za moje dobro zdravlje i srećno detinjstvo.

Posebnu zahvalnost dugujem **Olgi Bukur**, **Milutinu Jugoviću**, **Mariji Franc**, **Olgi Bodnar** i **dr Snežani Nikolić-Mandić**, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u penziji. Naučili su me mnogim stvarima, od prvog slova, preko prve hemijske formule, pa do složenih metoda analize. Predanim radom i ljubavlju učinili su da zavolim nauku i pomogli mi da postanem bolji čovek, da uvek pomognem drugima i da nikada ne izneverim svoje principe. Iako nekima od njih više nisam u prilici da iskažem zahvalnost, zadržao sam neizbrisive uspomene na njih. Neizmerno im na svemu hvala.

**Radojki Đurđević** i **Merici Buj-Bjelogrlić** zahvalan sam na mnoštvu korisnih saveta i pomoći koju su mi pružile pri radu u školi. **Kolektivu OŠ „Olga Petrov” u Padinskoj Skeli** se zahvaljujem na godinama uspešne saradnje, kolegijalnosti i prijateljstva. Od srca se zahvaljujem **svojim dragim učenicima**, na puno predivnih trenutaka provedenih sa njima. Hvala im što su pronašli dete u meni, učinili da budem deo njihovog detinjstva i naučili me da svet oko sebe gledam vedrijim očima. Posebno se zahvaljujem **Sofiji Vujošević**, **Aleksi Stojčiću** i **Stefanu Jovanoviću**, na nezaboravnim danima druženja koji još uvek traju.

Svom dragom prijatelju **Veljku Vilimonoviću** zahvalan sam na savetima, dragocenoj pomoći i iskustvu, kao i na zalaganju da uvek na vreme stignem na svaki ispit, čak i kada mi Zevs i Eol nisu bili naklonjeni. Možda zbog neiskustva tokom porodičnih okupljanja u čaši njegovog domaćeg vina još uvek nismo uspeli pronaći istinu, ali svaka berba je novi izazov.

Mojoj dragoj **Kameliji Živovoj** i **Denici Stoltej** zahvalan sam na svakom lepom trenutku, svakoj suzi i osmehu, mnogim dragim uspomenama. Hvala im jer su kao zvezde – ne viđam ih svaki put, ali znam da su tu da mi u život unesu još svetlosti. Neizmerno sam zahvalan i **Panajoti**, **Teoharisu**, **Andreasu**, **Tasosu**, **Pašku**, **Anti**, **Ermiru**, **Valentinu**, **Alekseju** i **Kirilju**, jer znam da, iako nemamo isti horizont, širom sveta imam sestre i braću koji me čine srećnim. Hvala im, ne samo što znaju moje najbolje priče, već zato što smo ih zajedno ispričali.

**Milanki Majer**, **Johanu Bahmanu**, **porodicama Lomigora**, **Pešić** i **Vurdelja** sam zahvalan jer su mi bili velika podrška tokom odrastanja, i jer su uvek verovali u mene.

Svojoj **porodici** se zahvaljujem na nemejljivoj moralnoj i materijalnoj podršci koju mi je pružila. Uloživši najbolje što su znali i imali, uz veliko razumevanje, strpljenje i odricanje, pokušali su da od mene izgrade dobrog i kvalitetnog čoveka. Iako pojedini članovi moje porodice više nisu među nama, ovo je moj skroman način da i njima izrazim svoju najiskreniju zahvalnost za njihovu punu posvećenost mom napretku.

*Dura Nakarada*

## **Naslov doktorske disertacije:**

Antiradikalna aktivnost avarola: teorijski i eksperimentalni pristup

## **Rezime**

Avarol je sekundarni metabolit izolovan iz morskog sunđera *Dysidea avara*. Smatra se da hidrohinski segment molekula avarola ima ključnu ulogu u njegovoj biološkoj aktivnosti, dok je uloga terpenoidnog dela manje značajna. Avarol ima nisku toksičnost i širok dijapazon bioloških aktivnosti, između ostalog antioksidativnu, antiinflamatornu, antitumorsku, antipsorijatičnu i anti-HIV. Imajući u vidu ove činjenice, kao i to da avarol može proći kroz krvno-moždanu barijeru, on predstavlja dobrog kandidata za razvoj novih terapija za neurodegenerativne bolesti, posebno Alchajmerovu bolest. Međutim, problem primene avarola u terapijske svrhe ogleda se u njegovoj nerastvorljivosti u vodi.

Pošto se smatra da su jedan od uzročnika Alchajmerove bolesti slobodni radikali, potrebno je detaljno ispitati prirodu interakcija avarola sa njima. U ovoj doktorskoj disertaciji, interakcije avarola sa slobodnim radikalima proučavane su primenom metoda teorijske hemije i elektronske paramagnetne rezonantne (EPR) spektroskopije. Zbog kompleksnosti sistema, kod teorijskih proračuna upotrebljen je hidrohinon kao model molekula. Osim toga, primenom ciklične voltometrije i ultraljubičaste i vidljive spektroskopije ispitana je interakcija avarola sa L-dopom, prekursorom kateholaminskih neurotransmitera.

Teorijskim proračunima zasnovanim na teoriji funkcionala gustine (DFT), odnosno kvantnoj teoriji atoma u molekulima (QTAIM), ispitano je do kakvih interakcija dolazi između hidrohina i tri radikala: hidroksilnog, hidroperoksilnog i metoksi radikala. Na osnovu rezultata teorijskih proračuna, ustanovljeno je da je energijska barijera za reakciju hidrohina sa hidroperoksilnim radikalom znatno viša od barijere za reakciju hidrohina sa hidroksilnim radikalom. Sem toga, reakcija apstrakcije vodonikovog atoma sa hidroksilne grupe hidrohina od strane sva tri posmatrana radikala odvija se mehanizmom poznatim kao PCET (spregnuti prenos protona i elektrona, od eng. proton-coupled electron transfer). Takođe, primenom modela implicitnog rastvarača, ustanovljeno je i da (u slučaju hidroksilnog i

hidroperoksilnog radikala) prisustvo rastvarača ne utiče na mehanizam po kom se apstrakcija atoma vodonika odvija.

Kako bi se zaobišao problem nerastvorljivosti avarola u vodi, izvršena je njegova ugradnja u zid DPPC lipozoma. U cilju ispitivanja njegove interakcije sa kratkoživećim slobodnoradikalnim vrstama za koje se smatra da učestvuju u razvoju Alchajmerove bolesti (hidroksilni, superoksidni i azot-monoksidni radikal), upotrebljena je EPR tehnika hvatanja spinova („spin-trap“ tehnika). Zbog svoje selektivnosti i vremena polu-života spinskih adukata, kao trap je upotrebljen DEPMPO (5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-*N*-oksid). Od značaja je bilo ispitati i njegovu interakciju sa askorbil radikalom, poznatim prirodnim indikatorom oksidativnog stresa. Pošto je on stabilan u fiziološkim uslovima, ova analiza rađena je bez upotrebe spin-trapa. Međutim, pošto je poznato da u vodenoj sredini postoje problemi u njegovoj stabilnosti, ova analiza urađena je u rastvoru avarola u dimetil-sulfoksidu. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da avarol poseduje izvanrednu antiradikalnu aktivnost prema gotovo svim ispitivanim slobodnoradikalnim vrstama, čime se dodatno potvrđuje opravdanost njegove upotrebe u terapijske svrhe. Osim toga, ovo je prvi slučaj upotrebe EPR metode u kombinaciji sa lipozomskom enkapsulacijom/inkorporacijom u cilju proučavanja vodonerastvornih jedinjenja. Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, može se zaključiti da ovakav pristup ima izuzetnu perspektivu u budućim EPR istraživanjima. Rezultati EPR merenja slažu se sa rezultatima dobijenim teorijskim proračunima.

Ciklovoltametrijskim ispitivanjima zaključeno je da modifikacijom površine elektrode od staklastog ugljenika rastvorom avarola dolazi do poboljšanja prenosa elektrona između neurotransmitera i avarola, u određenom opsegu koncentracija. U kombinaciji sa rezultatima dobijenim primenom ultraljubičaste i vidljive spektroskopije, može se zaključiti da do interakcija između avarola i  $L$ -dope zaista dolazi, ali da su one slabijeg intenziteta nego interakcije između hidrohinona i  $L$ -dope, čime se potvrđuje uloga hidrohinskog segmenta avarola kao nosioca njegovih različitih aktivnosti.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj tezi, potvrđuje se da je moguće koristiti hidrohinon kao model-molekul pri teorijskom proučavanju antiradikalne aktivnosti avarola, kao i da je hidrohinski segment odgovoran za aktivnost molekula avarola.

Osim toga ustanovljeno je i da je kombinacijom EPR spektrometrije i lipozomske enkapsulacije/integracije moguće proučavati antiradikalnu aktivnost vodonerastvornih jedinjenja.

**Ključne reči:** avarol, DFT, QTAIM, EPR spektroskopija, antiradikalna aktivnost, ciklična voltometrija

**Naučna oblast:** Fizička hemija

**Uža naučna oblast:** Biofizička hemija, teorijska hemija

**UDK broj:** 577.35(043.3)



**Title of doctoral dissertation:**

Antiradical activity of avarol: Theoretical and experimental approach

**Abstract**

Avarol is a secondary metabolite isolated from the marine sponge *Dysidea avara*. The hydroquinone moiety of avarol is supposed to play a key role in its biological activity, while the role of its terpenoid moiety is merely marginal. Avarol is known for its low toxicity and a wide range of biological activities, antioxidative, antiinflammatory, antitumour, antipsoriatic and anti-HIV being some of the most important ones. Having this in mind, as well as the fact that avarol can cross through the blood-brain barrier, it could serve as a good candidate for the development of the new therapies for neurodegenerative diseases, principally Alzheimer's disease. However, its poor solubility in water hampers its application in therapeutical purposes.

Since free radicals are presumed to be one of the causes of Alzheimer's disease, the nature of interactions of avarol with these species should be explored more elaborately. In this doctoral dissertation, interactions of avarol with free radicals have been studied by the means of computational chemistry and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Due to the complexity of the systems, hydroquinone was used as a model molecule for computational studies. The interaction of avarol with L-dopa (precursor for catecholamine neurotransmitters) was studied using cyclic voltammetry and ultraviolet-visible spectroscopy.

Theoretical computations based on density functional theory (DFT), and quantum theory of atoms in molecules (QTAIM) were employed in order to study interactions between hydroquinone and three radical species: hydroxyl, hydroperoxyl and methoxy radicals. Based on the results of theoretical computations, it was found that the energy barrier for the reaction of hydroquinone with hydroperoxyl radical is significantly higher compared to its reaction with hydroxyl radical. The reaction of hydrogen atom abstraction from the hydroxyl group of hydroquinone by all three radicals follows PCET (proton coupled electron transfer) mechanism. By using the implicit solvent method, it was determined that (in the reactions with hydroxyl and

hydroperoxyl radical), the presence of solvent does not affect the mechanism of hydrogen atom transfer.

In order to overcome the problem of poor solubility in water, avarol was incorporated into the bilayer of DPPC liposomes. Spin-trap EPR technique was employed to test its interaction with short-lived free radical species related to the pathogenesis of Alzheimer's disease (hydroxyl, superoxide and nitrogen-monoxide radicals). Due to its selectivity and the half-life of its spin-adducts, DEPMPO (5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide) was used as spin-trap. It was also important to study the interaction of avarol with ascorbyl radical, known as a natural oxidative stress indicator. Since this radical is stable under physiological conditions, these experiments were performed without the spin-trap. However, due to the problems with its stability in aqueous solutions, dimethyl sulfoxide was used for the preparation of avarol solutions. The obtained results indicate that avarol possesses remarkable antiradical activity toward almost all free radical species tested, which additionally confirms its therapeutical potential. Also, this is the first time that EPR method was employed, together with liposomal encapsulation/incorporation, in order to study compounds which are poorly soluble in water. In reference to the results presented in this doctoral dissertation, it can be concluded that this approach has a significant perspective in the future EPR studies. Results of the EPR measurements are in good correlation with the results obtained by theoretical computations.

Cyclovoltammetric experiments indicated that by modification of the glassy carbon electrode surface by avarol solution, electron transfer between neurotransmitters and avarol is enhanced (in a certain concentration range). Taking the results of ultraviolet-visible spectroscopy experiments into account, it is evident that interactions between avarol and *L*-dopa do occur, but their intensity is weaker compared to the interactions between hydroquinone and *L*-dopa, thus confirming the main role of avarol's hydroquinone moiety in its various biological activities.

Based on the results presented in this dissertation, application of hydroquinone as model molecule for theoretical studies of antiradical activity of avarol can be confirmed, as well as the central role of its hydroquinone moiety in its biological activities. It is also determined that antiradical activity of compounds poorly soluble in

water can be studied by the means of combining EPR spectrometry and liposomal encapsulation/integration.

**Keywords:** avarol, DFT, QTAIM, EPR spectroscopy, antiradical activity, cyclic voltammetry

**Scientific field:** Physical chemistry

**Scientific subfield:** Biophysical chemistry, theoretical chemistry

**UDC number:** 577.35(043.3)

## Skraćenice

**5-DS** – 5-doksil-stearinska kiselina

**AChE** – acetilholinesteraza

**AB** – Alchajmerova bolest

**ABTS** – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

**ALS** – amiotrofična lateralna skleroza

**a.u.** – atomska jedinica

**BCP** – kritična tačka veze

**CCP** – kritična tačka kaveza

**CNS** – centralni nervni sistem

**Cu, Zn-SOD** – Cu, Zn superoksid-dismutaza

**CW** – continuous wave (EPR spektrometri sa fiksnom frekvencijom mikrotalasnog zračenja)

**DCE-MRI** – dinamički magnetno-rezonantni imidžing

**DEPMPO** – 5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-*N*-oksid

**DMPO** – 5,5-dimetil-1-pirolin-*N*-oksid

**DFT** – teorija funkcionala gustine

**DMSO** – dimetil-sulfoksid

**DPPC** – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholin

**DPPH** – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

**DTCS** – *N*-(ditiokarboksi)sarkozin, diamonijumova so

**DTPA** – dietilentriaminpentasilicetna kiselina

**ECE** – elektrohemijski-hemijski-elektrohemijski mehanizam

**EPR** – elektronska paramagnetna rezonancija

**EPST** – sekvencijalni elektron-proton prenos

**FT** – Furijeova transformacija

**HAT** – transfer atoma vodonika

**HOMO** – najviša zauzeta molekulska orbitala

**HQ** – hidrohinon

**IC** – Infracrvena oblast

**L-dopa** – levodopa

**LUMO** – najniža zauzeta molekulska orbitala  
**MS** – multipla skleroza  
**NCP** – kritična tačka jezgra  
**NMR** – nuklearna magnetna rezonancija  
**PB** – Parkinsonova bolest  
**PCET** – spregnuti prenos protona i elektrona  
**PEST** – sekvencijalni proton-elektron prenos  
**RCP** – kritična tačka prstena  
**RNS** – reaktivne azotne vrste  
**ROS** – reaktivne kiseonične vrste  
**SAPT** – rastvaračem potpomognuti prenos protona  
**SPGET** – sekvencijalni zahvat protona i prenos elektrona  
**SPLET** – sekvencijalni gubitak protona i transfer elektrona  
**QTAIM** – kvantna teorija atoma u molekulu  
**UV-Vis** – ultraljubičasta-vidljiva oblast

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Predmet i cilj disertacije .....	2
2. Pregled literature.....	4
2.1. Slobodni radikali i antioksidansi .....	4
2.2. Alchajmerova bolest – patogeneza i terapija.....	10
2.3. Biološka aktivnost i terapijski potencijal avarola.....	21
2.4. Računarske metode.....	31
2.4.1. Osnove teorijske hemije .....	31
2.4.2. Teorija funkcionala gustine .....	33
2.4.3. Bazisni skupovi .....	34
2.4.4. Solvatacioni modeli .....	36
2.4.5. Kvantna teorija atoma u molekulima (QTAIM).....	37
2.4.6. Mehanizmi prenosa atoma vodonika.....	44
2.5. Elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija.....	46
2.5.1. Opšta teorija elektronske paramagnetne rezonantne spektroskopije.....	46
2.5.2. Detekcija EPR signala i primena EPR spektroskopije .....	56
2.5.3. „Spin-trap“ EPR tehnika.....	61
2.6. Lipozomi.....	66
2.7. Ciklična voltometrija .....	69
2.8. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija .....	75
3. Materijali i metode.....	79
3.1. Računarske metode.....	79
3.1.1. $\omega$ B97XD funkcional elektronske gustine .....	79
3.1.2. M06-2X funkcional elektronske gustine .....	79
3.1.3. Bazisni skup 6–311++G(2d,2p).....	79
3.1.4. Model polarizabilnog kontinuuma .....	80
3.1.5. Kvantna teorija atoma u molekulima (QTAIM).....	80

3.2. Hemikalije .....	80
3.3. Izolovanje avarola.....	81
3.4. Sinteza avarolskih i 100 % DPPC lipozoma .....	81
3.5. Ekstruzija lipozoma .....	82
3.6. Dijaliza lipozoma.....	83
3.7. Određivanje veličine lipozoma.....	83
3.8. EPR merenja .....	83
3.8.1. Spinsko obeležavanje lipozoma.....	83
3.8.2. Određivanje anti-hidroksilne aktivnosti avarolskih lipozoma spin-trap EPR tehnikom.....	84
3.8.3. Određivanje anti-superoksidne aktivnosti avarolskih lipozoma spin-trap EPR tehnikom .....	85
3.8.4. Određivanje anti-azot-monoksidne aktivnosti avarolskih lipozoma spin-trap EPR tehnikom .....	86
3.8.5. Određivanje anti-askorbil radikalske aktivnosti avarola .....	86
3.8.6. Simulacije EPR spektara .....	87
3.8.7. Provera integriteta lipozoma.....	88
3.9. Ciklovoltametrijski eksperimenti .....	88
3.10. UV-Vis eksperimenti.....	90
4. Rezultati i diskusija .....	91
4.1. Teorijski rezultati.....	91
4.1.1. Reakcija hidrohinona sa hidroksilnim radikalom.....	94
4.1.2. Reakcija hidrohinona sa hidroperoksilnim radikalom.....	101
4.1.3. Reakcija hidrohinona sa metoksi radikalom.....	105
4.1.4. Redosled prenosa protona i elektrona.....	106
4.1.5. Prisustvo rastvarača .....	107
4.2. Rezultati DLS merenja .....	109
4.3. Rezultati EPR eksperimenata .....	110
4.3.1. Provera integriteta lipozoma.....	110
4.3.2. Antiradikalska aktivnost avarola .....	112

4.4. Rezultati elektrohemijskih eksperimenata.....	117
4.5. Rezultati UV-Vis eksperimenata.....	123
5. Zaključak.....	126
6. Literatura.....	130
Prilozi.....	160
Biografija.....	162
Naučni radovi u kojima su publikovani rezultati iz doktorske disertacije.....	163
Izjava o autorstvu.....	164
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada.....	165
Izjava o korišćenju.....	166



# 1. Uvod

Hinoni i hidrohinoni morskog porekla već decenijama privlače pažnju naučnika zbog svoje raznolike strukture (takve da često nemaju analoge kopnenog porekla), i širokog spektra bioloških aktivnosti. Avarol je seskviterpenoidni hidrohinon izolovan iz morskog sunđera *Dysidea avara*, zajedno sa manjom količinom svog oksidovanog oblika, avarona.<sup>1,2</sup> Pretpostavlja se da ovaj sunđer proizvodi avarol kao sekundarni metabolit koji ima ulogu da ga zaštiti od predatora.

Ustanovljeno je da avarol poseduje mnoštvo različitih bioloških aktivnosti, među kojima se posebno ističu antipsorijatična, antioksidativna, anti-HIV, antiinflamatorna, antitumorska i antimikrobna aktivnost.<sup>2-9</sup> Pretpostavlja se da je nosilac biološke aktivnosti avarola njegov hidrohinonski deo, dok terpenoidni igra marginalnu ulogu.<sup>2,10</sup> Zbog činjenice da avarol može proći kroz krvno-moždanu barijeru<sup>11</sup>, njegove antioksidativne aktivnosti i niske toksičnosti, ovaj molekul pogodan je kandidat za dalja istraživanja u svrhu razvoja novih terapeutika za lečenje neurodegenerativnih bolesti, uzrokovanih slobodnim radikalima, poput Alchajmerove bolesti (AB), Parkinsonove bolesti (PB), amiotrofične lateralne skleroze (ALS), i multiple skleroze (MS).<sup>5,12-16</sup> Međutim, da bi se avarol mogao koristiti u terapijske svrhe, potrebno je prevazići ključni problem – činjenicu da je on nerastvoran u vodi. Upravo zbog toga, trenutno se preparati na bazi avarola koriste jedino dermalno, pri lečenju psorijaze, dok drugih terapijskih primena u praksi za sada nema.<sup>17</sup> Osim toga, iako *Dysidea avara* nije na listi ugroženih vrsta, postavlja se pitanje koliki uticaj bi prikupljanje ovog sunđera radi ekstrakcije avarola imalo na biodiverzitet mora. U cilju prevazilaženja ovog problema, pokušana je sinteza avarola, koja se pokazala skupom i kompleksnom, kao i gajenje ovog sunđera bilo u moru ili u laboratorijskim uslovima.<sup>18,19</sup>

Imajući u vidu izuzetan terapijski potencijal avarola u lečenju neurodegenerativnih bolesti, potrebno je ustanoviti u kojoj meri i na koji način avarol interaguje sa slobodnim radikalima, posebno onih koji se navode kao jedan od uzročnika ovih bolesti. U svrhu ispitivanja antiradikalnih interakcija, moguće je primeniti metode teorijske hemije, ali i eksperimentalne metode, pri čemu se zbog svojih karakteristika posebno ističe elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija.

## 1.1. Predmet i cilj disertacije

Interakcije avarola sa slobodnim radikalima prethodno nisu bile dovoljno istraživane. U tu svrhu posebno je pogodno primeniti metode teorijske hemije. Proračunima zasnovanim na teoriji funkcionala gustine (eng. density functional theory, DFT) moguće je izvršiti predviđanje reaktivnosti različitih organskih molekula sa mnogim radikalskim vrstama. Ranijim istraživanjima ustanovljena je korelacija između teorijskih i eksperimentalnih rezultata izučavanja slobodnoradikalskih reakcija. Sem toga, mehanizmi ovih reakcija se mogu detaljnije opisati primenom kvantne teorije atoma u molekulima (eng. quantum theory of atoms in molecules, QTAIM). Koristeći ovu metodu moguće je pratiti promenu različitih svojstava svakog pojedinačnog atoma u molekulu, na osnovu promene elektronske gustine. Na osnovu QTAIM analize moguće je ustanoviti do kakvih promena dolazi pri prenosu atoma vodonika sa molekula hidrohina na molekul odabrane radikalske vrste. Sem toga, moguće je odrediti i tip mehanizma kojim se ovaj prenos odvija. Rezultati QTAIM analize imaju suštinski značaj u predviđanju reaktivnosti avarola sa odabranim radikalskim vrstama. Zbog veličine i kompleksnosti sistema, ali i računarskih mogućnosti, teorijski su izučavane interakcije hidrohina sa radikalskim vrstama malih dimenzija (hidroksilni, hidroperoksilni i metoksi radikal). Hidrohinon je odabran jer je pretpostavljeni aktivni deo molekula avarola, pa bi bilo zanimljivo ustanoviti i u kakvoj su korelaciji rezultati dobijeni teorijskom analizom sa eksperimentalnim rezultatima dobijenim tokom izučavanja aktivnosti avarola.<sup>2</sup>

U cilju eksperimentalnog proučavanja antiradikalske aktivnosti avarola, kao najbolji metodološki izbor upotrebljena je elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija.<sup>20</sup> Ova metoda pogodna je ne samo zbog izuzetno visoke osetljivosti, selektivnosti i mogućnosti precizne kvantitativne analize, već i zbog toga što dobijeni rezultati ne zavise od optičkih karakteristika samog uzorka. Međutim, problem je što se pojedine biološki relevantne radikalske vrste neophodno generisati u vodenim rastvorima. Do sada su proučavanja vodonerastvornih jedinjenja EPR spektroskopijom vršena njihovim rastvaranjem u pogodnom rastvaraču, nakon čega bi deo takvog rastvora bio suspendovan u vodi. Većina organskih rastvarača tokom svoje interakcije sa slobodnoradikalskim vrstama formira ugljenično centrirane radikale, što dovodi do

smetnji tokom EPR analiza. Nasuprot tome, avarol je nerastvoran u vodi. Kako bi se prevazišao problem rastvorljivosti avarola u vodenoj sredini, on je integrisan u zid lipozoma.<sup>21</sup> U tu svrhu upotrebljeni su lipozomi od DPPC-a (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholin), kao pogodnog modela zbog svoje stabilnosti, biokompatibilnosti i jednostavnosti pravljenja. Pošto su slobodnoradikalske vrste sa kojima je ispitivana aktivnost avarola kratkoživeće, upotrebljena je EPR tehnika hvatanja spinova („spin-trap“ tehnika).<sup>22,23</sup> Kod ove tehnike, generisanjem slobodnih radikala u sistemu u kome se nalazi spin-trap, dijamagnetik koji nije EPR-aktivan, moguće je formirati paramagnetni spinski adukt sa datom radikalskom vrstom, koji ima znatno duži poluživot. Na taj način, ispitivana je antiradikalska aktivnost avarola sa hidroksilnim, superoksidnim i azot-monoksidnim radikalom. Ovi radikali odabrani su zbog svoje povezanosti sa patogenezom Alchajmerove bolesti i amiotrofične lateralne skleroze. Zanimljivo je ispitati i aktivnost avarola sa askorbil radikalom, prirodnim indikatorom oksidativnog stresa.<sup>24</sup> Pošto je njegova stabilnost u vodenoj sredini problematična, ispitivanja su vršena u rastvoru avarola u dimetil-sulfoksidu (DMSO).

Pošto je avarol potencijalno moguće koristiti u terapiji Alchajmerove bolesti, zanimljivo je ispitati i da li i na koji način on interaguje sa neurotransmiterima. U tu svrhu, upotrebljena je L-dopa, poznata kao prekursor kateholaminskih neurotransmitera.<sup>25</sup> Ova ispitivanja vršena su primenom ciklične voltometrije i ultraljubičaste i vidljive spektroskopije. Ciklična voltometrija upotrebljena je zbog toga što se često koristi za analize elektrohemijskog ponašanja neurotransmitera, kako pojedinačno, tako i u smeši.<sup>26</sup>

## 2. Pregled literature

### 2.1. Slobodni radikali i antioksidansi

Slobodni radikali su atomske, molekulske ili jonske vrste sa nesparenim elektronima u spoljašnjoj ljuski. Mogu biti naelektrisani (pozitivno ili negativno) i nenaelektrisani.<sup>27,28</sup> Atom vodonika je najjednostavniji slobodni radikal.<sup>29</sup> U normalnim okolnostima, elektroni kruže oko jezgra u parovima, pri čemu imaju suprotne spinove. Kada atom sadrži jedan nesparesni elektron, njegova reaktivnost biva primetno povećana; takav atom naziva se slobodni radikal.<sup>28</sup> U stručnoj literaturi, termin slobodni radikal upotrebljava se u širem smislu; pored reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, podrazumeva i srodne reaktivne vrste poput pobuđenih stanja koja dovode do formiranja slobodnih radikala ili, pak, one vrste koje nastaju kao rezultat slobodno-radikalskih reakcija. Generalno, to su kratkoživeće vrste čija se vremena poluživota mere mili, mikro ili nanosekundama.<sup>30</sup> Trifenilmetil radikal proučavan 1900. godine je prvi organski slobodni radikal ikada otkriven.<sup>31</sup> Prisustvo slobodnih radikala u biološkim sistemima prvi put je zabeleženo pre više od šezdeset godina.<sup>32</sup> Nedugo potom, slobodni radikali su smatrani neželjenim, ali nepoželjnim proizvodima postojanja aerobnih organizama.<sup>33</sup>

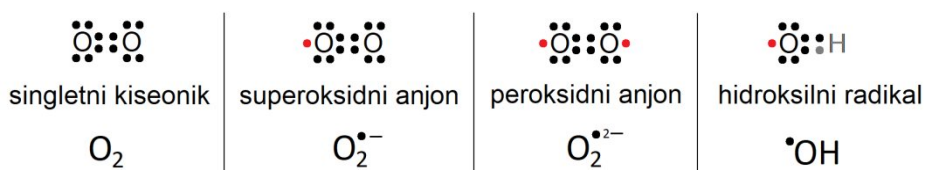
Sa fiziološkog aspekta, slobodni radikali potencijalno su opasni, zbog reakcije sa susednim molekulima, u cilju sparivanja nesparenog elektrona. Molekul koji je u ovom procesu ostao bez elektrona sam postaje slobodni radikal. Dati proces „krađe elektrona” dovodi do oksidacije, a time često i inaktivacije ciljnog molekula. Pod uslovom da su učestale, ove reakcije mogu dovesti do značajnog oštećenja ćelije. Stepen datog oštećenja povezan je sa sposobnošću neutralizacije slobodnih radikala antioksidansima koji u reakciji sa njima daju manje štetne proizvode.<sup>34</sup> Zbog pomenutih karakteristika, nekontrolisana proizvodnja slobodnih radikala dovodi se u vezu sa različitim patofiziološkim stanjima. Do kraja šezdesetih godina prošlog veka, naučnici su pretpostavljali da ako slobodni radikali postoje u živim bićima, njihov organizam bi trebalo da poseduje i sistem za odbranu od štetnog dejstva ovih hemijskih vrsta. To je i potvrđeno otkrićem superoksid dismutaze.<sup>27</sup> Sedamdesetih i osamdesetih godina, nauka je zauzela novi pristup izučavanju slobodnih radikala. Uprkos njihovom štetnom

dejstvu, važno je naglasiti da imaju ključnu ulogu u uspostavljanju i održavanju homeostaze na ćelijskom nivou, između ostalog, i kao signalni molekuli.<sup>27,34,35</sup> Na osnovu mnoštva sprovedenih istraživanja, danas je postalo jasno da živa bića ne samo da su naviknuta na koegzistenciju sa slobodnim radikalima, već i da su razvila mehanizme putem kojih ove reaktivne vrste mogu koristiti kao oksidoredukционе prekidače za regulisanje genske ekspresije, enzimske aktivnosti i za ćelijsku signalizaciju.<sup>36,37</sup> Danas se može reći da delikatna ravnoteža između dva sasvim suprotstavljena efekta slobodnih radikala čini važan aspekt funkcionisanja živog sveta.<sup>38</sup>

Među slobodnim radikalima posebno se izdvajaju reaktivne kiseonične vrste (ROS, od eng. reactive oxygen species). Sam molekul kiseonika na izvestan način je biradikal. Prema Hundovom pravilu, on sadrži dva elektrona istog spina, od kojih se svaki nalazi u zasebnoj orbitali. Iz tog razloga, termodinamički gledano, kiseonik teži primanju dodatnih elektrona (dva po atomu, četiri po molekulu) da bi formirao molekule koji imaju nižu vrednost slobodne energije. Međutim, spinski spareni elektroni iz okoline ne mogu spontano preći na kiseonik, dok jedan od njegovih nesparenih elektrona ne izvrši promenu spina, čime bi ovo sparivanje postalo moguće. Vreme kontakta sa okolinom je previše kratko da bi se ovaj proces spontano dogodio, pa se formira kinetička barijera (visoka energija aktivacije), koja čuva živi svet od eksplozivne reakcije u atmosferi visoke oksidacione moći.<sup>27,39</sup>

Nisu sve ROS radikali, već samo one koje sadrže nespareni elektron.<sup>40</sup> Ove hemijske vrste konstantno nastaju u ljudskom telu pri normalnim metaboličkim procesima, usled redukcije kiseonika do vode u elektronskom transportnom lancu u mitohondrijama.<sup>41</sup> Smatra se da od ukupne količine kiseonika koju čovek udahne, oko 98% biva prerađeno u mitohondrijama posredstvom jednog jedinog enzima – citohrom oksidaze, koja prenosi četiri elektrona na kiseonik tako da kao proizvod nastaju dva molekula vode.<sup>39</sup> Ipak, oko 2 do 5% kiseonika biva upotrebljeno za formiranje ROS.<sup>42</sup> Sekvencijalna redukcija molekulskog kiseonika dovodi do formiranja više ROS: superoksidnog radikal anjona ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ) i hidroksilnog radikala ( $\cdot OH$ ) (slika 1). Singletni kiseonik ( $^1O_2$ ) takođe se ubraja u ROS i predstavlja ekscitovani oblik kiseonika kod koga je jedan elektron prešao u orbitalu veće energije.<sup>27,30</sup> Pored ROS, od značaja su i reaktivne azotne vrste (RNS, od eng. reactive nitrogen species), pri čemu se deo RNS može podvesti i pod ROS. Primeri RNS su:

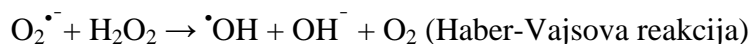
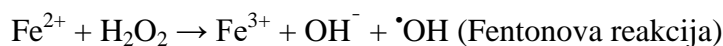
azot-monoksid ( $\text{NO}^\bullet$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), nitroksil ( $\text{HNO}$ ), nitrozonijum katjon ( $\text{NO}^+$ ), S-nitrozotiole ( $\text{RSNO}$ , gde je R ugljovodonični ostatak), viši oksidi azota.<sup>43</sup>



**Slika 1.** Reaktivne kiseonične vrste. Crvenom bojom označeni su nesporeni elektroni.

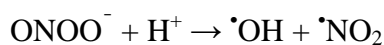
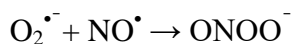
Prilagođeno iz literature.<sup>34</sup>

Superoksidni anjon je prvi radikal koji nastaje u toku transfera elektrona na molekularni kiseonik u mitohondrijama. On dalje može da formira vodonik-peroksid, hidroksilni radikal i singletni kiseonik. U reakciji superoksidnog anjona sa enzimom superoksid dizmutazom nastaje vodonik-peroksid. On je najmanje reaktivna od svih pomenutih kiseoničnih vrsta. Stabilan je na fiziološkom pH u odsustvu jona metala. Sa velikom lakoćom difunduje kroz biološke membrane. U prisustvu jona metala (Fentonova reakcija) i superoksidnog anjona (Haber-Vajsova reakcija) može da formira hidroksilni radikal<sup>29,44</sup>:



Hidroksilni radikal ima vrlo visoku reaktivnost i vrlo kratko vreme polu-života od svega  $10^{-9}$  s. Zbog toga ovaj radikal reaguje u neposrednoj blizini mesta na kome je nastao.<sup>29</sup> Hidroksilni radikal može izazvati lipidnu peroksidaciju, prekidati DNK lance i oksidovati gotovo svaki organski molekul sa kojim dođe u kontakt.<sup>39,45</sup>

Superoksidni anjon može reagovati i sa azot-monoksidom ( $\text{NO}^\bullet$ ), formirajući peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), koji dalje može da proizvede hidroksilni radikal i azot-dioksid ( $\cdot \text{NO}_2$ ):



Peroksinitrit je citotoksičan, izaziva oštećenje tkiva, a formira se na mestima zahvaćenim upalnim procesima. Sem toga, uključen je u razvoj pojedinih neurodegenerativnih bolesti, a može da dovede i do oštećenja nukleinskih baza u DNK. Poznato je i da veoma lako difunduje kroz ćelijske membrane.<sup>29</sup>

Azot-dioksid ( $\text{NO}_2$ ) nastaje u reakciji peroksil radikala sa NO, a prisutan je i u duvanskom dimu.

Azot-monoksid ( $\text{NO}$ ) nastaje dejstvom enzima azot-oksida sintaza u tkivima. Ovo je signalni molekul koji u organizmu reguliše fiziološke funkcije, posebno na neurološkom i kardiovaskularnom nivou. Međutim, pri patološkim stanjima povećan nivo azot-monoksida predstavlja problem, jer je visoko reaktivan, pa može da oštećuje okolno tkivo, ili da formira drugu reaktivnu vrstu, peroksinitrit, koji je snažno oksidaciono sredstvo.<sup>43</sup>

Veliki broj endogenih i egzogenih procesa može dovesti do nastanka slobodnih radikala u biološkim sistemima. Oni mogu nastati namerno, kao deo katalitičkog ciklusa enzima, pri eliminaciji patogena, ili u svrhu ćelijske signalizacije. Endogeni nastanak radikalskih vrsta može biti i neželjena posledica upotrebe kiseonika kao krajnjeg akceptora elektrona, ili prisustva redoks-aktivnih enzima koji supstrat oksiduju do radikala. Spoljašnji (egzogeni) faktori takođe dovode do formiranja radikalskih vrsta. Neki od tih faktora su dejstvo zračenja visoke energije, atmosfersko zagađenje, nastajanje radikala pri metabolisanju lekova, izloženost hemikalijama u domaćinstvu i industriji.<sup>41,42,46</sup>

Pošto je organizam opremljen mehanizmima za borbu sa slobodnim radikalima, oni ne predstavljaju nužno pretnju pri normalnim fiziološkim uslovima. Međutim, ako se dogodi povećani nastanak slobodnih radikala ili oni nastaju na netipičnim mestima, balans između njihovog nastajanja i eliminacije iz organizma biva narušen. Reaktivne vrste tada mogu da nanose štetu tkivima i ćelijama bez mogućnosti organizma da tu štetu dovoljno efikasno sanira. Ova pojava naziva se stanje oksidativnog stresa.<sup>40</sup> Oksidativni stres ima veliki udeo u razvoju hroničnih i neurodegenerativnih bolesti, raka, autoimunih poremećaja, kardiovaskularnih bolesti, ali i starenja.<sup>38</sup>

Antioksidansi učestvuju u odbrani od slobodnih radikala. Oni nastaju u samom organizmu, ali se unose i putem hrane. U organizmu postoji balans između količine slobodnih radikala i količine proizvedenih antioksidanasa. Antioksidans se može definisati kao bilo koja supstanca koja u niskoj koncentraciji (u odnosu na supstrat) značajno umanjuje ili sprečava oksidaciju datog supstrata. Ova definicija odnosi se na sve procese oksidacije, i radikalske i neradikalske.<sup>42</sup> Zbog toga je važno preciznije definisati posmatrani proces, budući da izvan ovog konteksta podatak da je neko jedinjenje antioksidans ne predstavlja biološki značajnu informaciju. Antioksidansi mogu biti prirodnog ili veštačkog porekla (sintetisani u laboratoriji).<sup>47</sup>

Antioksidansi deluju protiv slobodnih radikala na nivou prevencije, presretanja i popravke nastale štete. Antioksidansi koji deluju preventivno nastoje da zaustave formiranje ROS, dok oni koji presreću slobodne radikale obavljaju njihovu eliminaciju. U procesu popravke nastale štete učestvuju mnogi enzimi.<sup>30</sup>

Pošto se ROS kontinuirano proizvode u maloj količini tokom normalnih metaboličkih procesa, ćelije su se tome prilagodile iznalazeći načine da ublaže njihove potencijalno štetne efekte. Sastav antioksidanasa koji ćelije koriste za „odbranu” varira od tkiva do tkiva, od jednog do drugog tipa ćelija, pa čak i kod istog tipa ćelija u različitim organizmima.<sup>48</sup>

Antioksidantni odbrambeni sistem može se podeliti na enzimski i neenzimski. Enzimski uključuje enzime poput superoksid dismutaze, katalaze, peroksiredoksina i glutation peroksidaze. Katalaza, peroksiredoksini i glutation peroksidaza eliminišu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz organizma, čime se sprečava formiranje hidroksilnog radikala, pošto protiv njega ne postoji adekvatna enzimski zaštita.<sup>49,50</sup> Peroksiredoksini su relativno skoro otkrivena jedinjenja, i predstavljaju možda najmoćnije eliminatore H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u organizmu.<sup>50</sup>

Neenzimski odbrambeni sistem uključuje jedinjenja koja proizvodi čovekov organizam, kao što su bilirubin, melatonin, polni hormoni, ceruloplazmin, koenzim Q, urinska kiselina i druga jedinjenja. Sem toga, ovom tipu odbrambenog mehanizma pripadaju i supstance unete putem ishrane, kao što su askorbinska kiselina (vitamin C), α-tokoferol (vitamin E), β-karoten (prekursor vitamina A) i fenolna jedinjenja poreklom iz biljaka (flavonoidi).<sup>48,50</sup>



Antioksidantni sistem može sprečiti oksidativni stres samo kontrolišući nivo slobodnih radikala, umesto da ih u potpunosti eliminiše. Zbog značajnih fizioloških funkcija koje slobodni radikali imaju, njihova potpuna eliminacija dovela bi do poremećaja u normalnom funkcionisanju organizma.<sup>51</sup>

Važno je naglasiti da postoji značajna razlika između antiradikalske i antioksidativne aktivnosti. Antiradikalska aktivnost definiše sposobnost jedinjenja da reaguje sa slobodnim radikalima (u samo jednoj reakciji). S druge strane, antioksidativna aktivnost predstavlja sposobnost inhibicije procesa oksidacije (koji obično uključuje set različitih reakcija). Zbog toga se u velikom broju slučajeva informacija o antiradikalskoj aktivnosti nekog jedinjenja može razlikovati od informacije o njegovoj antioksidativnoj aktivnosti.<sup>52</sup> Sa povećanim interesovanjem za antioksidanse tokom proteklih decenija rastao je i broj publikacija na ovu temu. U javnosti je neretko činjenica da je nešto bogato antioksidansima olako shvaćena. Često se to predstavlja tako da ako su neki antioksidansi dobri, onda je njihov unos u velikim količinama veoma koristan. Ipak, iako je poznato da urin i feces pokazuju značajnu *in vitro* antioksidativnu aktivnost, njihova konzumacija sigurno nije preporučljiva.<sup>53,54</sup> Važno je pre iznošenja tvrdnji da je neka hrana bogata antioksidansima ustanoviti najpre da li se *in vitro* određena aktivnost zapravo ispoljava i u *in vivo* uslovima.<sup>50</sup>

Promenljiva efikasnost različitih antioksidanasa može se pripisati značajnim razlikama u njihovoj hemijskoj strukturi. Molekuli mnogih antioksidanasa su nerastvorni ili slabo rastvorni u vodi, pa je zbog toga njihovu antioksidativnu aktivnost sa biološki značajnim radikalima teško proučavati.<sup>55</sup>

Opšti postupci za određivanje antiradikalske i antioksidativne aktivnosti navedeni su u mnogim naučnim radovima; isti se prevashodno odnose na prirodne proizvode i dodatke ishrani, zbog njihovog praktičnog značaja.<sup>56</sup> Jedan od standardnih postupaka za određivanje antiradikalske aktivnosti EPR spektroskopijom zasniva se na primeni 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH), stabilnog slobodnog radikala. Isto jedinjenje može se upotrebiti i za UV-Vis merenja, pošto nakon prihvatanja atoma vodonika od odgovarajućeg donora, rastvor DPPH gubi karakterističnu tamnoljubičastu boju. Sem DPPH, može se koristiti i 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS). U reakciji ovog jedinjenja sa jakim oksidacionim sredstvima (poput

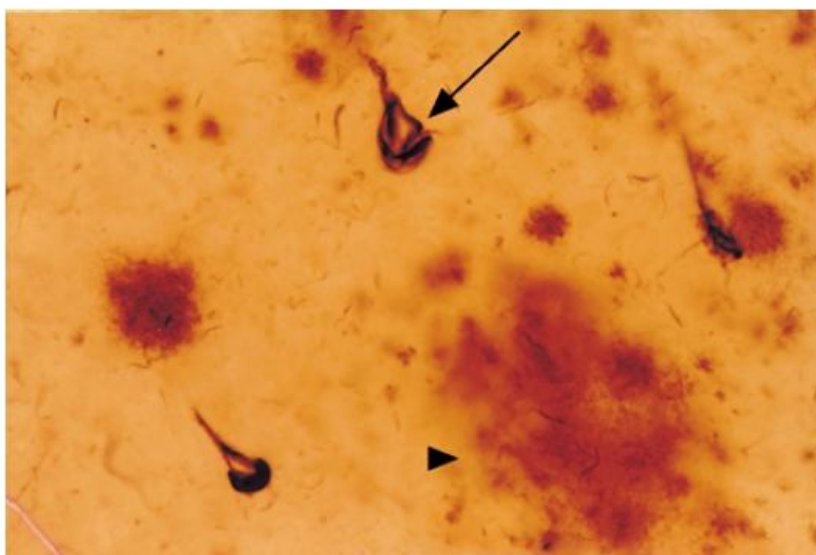
kalijum-permanganata) nastaje  $ABTS^{\cdot+}$  radikal koji je moguće detektovati EPR spektroskopijom, ali i UV-Vis spektroskopijom, pošto daje rastvorima plavo-zelenu boju.<sup>57</sup> Antioksidativna aktivnost supstanci može se određivati i elektrohemijski. Elektrohemijske metode su pogodne zbog visoke osjetljivosti, brzine i jednostavnosti aparature, često i izbegavanja složene pripreme uzoraka. Antioksidativna aktivnost može se određivati voltametrijski, amperometrijski, biamperometrijski, potenciometrijski i kulometrijski.<sup>58</sup> Ciklovoltametrijska merenja mogu pružiti informaciju o broju redoks stanja datog antioksidansa, njihovoj stabilnosti i kinetici reakcija prenosa elektrona u kojima učestvuju. Ova merenja podrazumevaju skeniranje napona radne elektrode u zadatom opsegu potencijala, uz merenje jačine anodne struje tokom oksidacije antioksidansa na površini radne elektrode. Izmerena vrednost struje proporcionalna je koncentraciji datog antioksidansa.<sup>59</sup>

## **2.2. Alchajmerova bolest – patogeneza i terapija**

Alchajmerova bolest (AB) progresivno je i ireverzibilno neurodegenerativno oboljenje koje karakteriše poremećaj funkcije intracelularnih i ekstracelularnih biohemijskih procesa, odgovornih za neuronsku smrt. AB otkrio je 1906. godine Alojz Alchajmer (Alois Alzheimer) i definisao ju je kao neuropsihijatrijski poremećaj koji pogađa stariju populaciju. Svoja istraživanja sproveo je na mozgu 51-godišnje žene koja je preminula četiri i po godine nakon što su uočeni prvi simptomi ubrzanog gubitka pamćenja i dezorijentisanosti u vremenu i prostoru. Analizom je uočena atrofija mozga, praćena izraženom neurofibrilarnom patologijom i izdvajanjem netipičnih naslaga u mozgu.<sup>60</sup> Definitivna dijagnoza AB i danas se, između ostalog, postavlja na osnovu autopsije mozga pacijenta, mikroskopskim pregledom onih mesta na kojima je verovatnoća pojave moždane atrofije najveća, kao znak gubitka neurona. Data mesta obično su frontalni i temporalni režnjevi mozga, na kojima se uočava veliki broj ekstracelularnih naslaga i intracelularnih neurofibrilarnih petlji (slika 2).<sup>61</sup>

Najčešći simptomi AB su gubitak pamćenja, poteškoće u odabiru odgovarajućih reči i razumevanju izrečenog, poteškoće u obavljanju rutinskih operacija i aktivnosti, kao i promene raspoloženja i ličnosti.<sup>60,62</sup> Ova bolest najčešći je oblik demencije od koga, u svetu, prema procenama boluje oko 24 miliona ljudi. Očekuje se da će broj obolelih biti udvostručivan na svakih 20 godina, zbog očekivanog starenja ljudske

populacije. Sa trenutnog stanovišta (dostupnost i efikasnost postojeće terapije), ovako visok broj obolelih od AB predstavljaće ozbiljan zdravstveni problem na svetskom planu. Trenutno dostupna farmakološka terapija AB mahom je simptomatska, bez trajnih pozitivnih efekata tj. izlečenja.<sup>62</sup> S druge strane, razvoj lekova za njen tretman pokazao se kao izuzetno komplikovan. Do sada je za lečenje AB odobreno svega pet lekova u svetu, od toga četiri na bazi inhibicije enzima acetilholinesteraze (AChE) i jedan antagonist receptora *N*-metil-D-aspartata. Od 2003. godine, međutim, nijedan novi lek nije odobren u ovu svrhu.<sup>63,64</sup>



**Slika 2.** Elektronska mikrofografija iseka moždanog tkiva pacijenta obolelog od Alchajmerove bolesti. Strelicom je označena intracelularna neurofibrilarna petlja, a trouglom ekstracelularne naslage. Prilagođeno iz literature.<sup>61</sup>

Iako uloga moždanih naslaga i petlji u razvoju AB nije detaljno poznata, u najvećoj meri zastupljene su upravo u onim delovima mozga koje je bolest najviše zahvatila – oba hipokampus. Ove strukture, smeštene u temporalnim režnjevima, imaju centralnu ulogu u uspostavljanju i održavanju pamćenja kod čoveka, a kao takve najranije ukazuju na ovu bolest.<sup>61,65</sup>

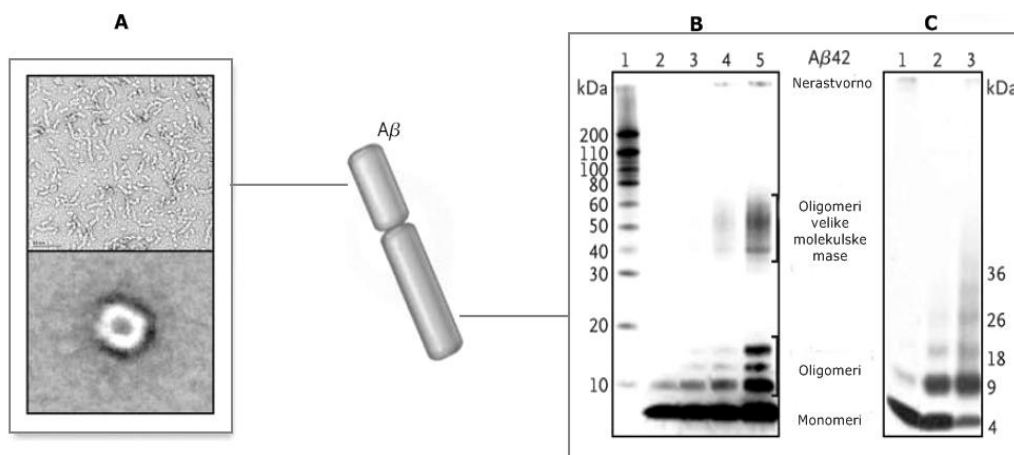
Patogeneza AB je složena i uključuje čitav niz molekularnih, ćelijskih, biohemijskih i fizioloških patoloških promena. Kod obolelih, svi ovi procesi kontinualno se dešavaju tokom normalnog procesa starenja. Sem toga, patogenezi doprinose i genetski faktori, kao i faktori životnog okruženja. Oko 5% svih slučajeva

AB posledica je naslednih genetskih mutacija.<sup>60,62</sup> Do sada je identifikovano više gena koji učestvuju u nastanku AB i, drugim rečima, poznato je da ne postoji jedinstveni gen odgovoran za nastanak ove bolesti. U prethodnom periodu postavljeno je nekoliko različitih hipoteza o pojavi i razvoju AB. Dve najprihvaćenije jesu hipoteze o amiloidnoj kaskadi i neuronskoj citoskeletnoj degradaciji. U stvari, hipoteza o amiloidnoj kaskadi smatra se centralnim mehanizmom razvoja AB.<sup>60</sup>

Hipoteza o amiloidnoj kaskadi zasniva se na povećanoj agregaciji amiloid  $\beta$  peptida. Ovaj kratki peptid (između 36 i 43 aminokiselinska ostatka) abnormalni je proizvod proteolize transmembranskog proteina koji se naziva amiloidni prekursorski protein. Njegova funkcija još uvek je nedovoljno poznata, ali se smatra da učestvuje u razvoju neurona.

Tokom neuronske aktivnosti dolazi do otpuštanja vezikula sa neurotransmiterima, a paralelno sa tim procesom, nastupa sekrecija amiloid  $\beta$  monomera. Ovi monomeri sadrže kratke regione sa beta nabranom strukturom koji, zbog neravnoteže između njihovog nastajanja i eliminacije, podležu konformacionoj promeni – formiraju tercijarne strukture čijom agregacijom nastaju amiloidna vlakna. Data vlakna mogu imati končasti i prstenasti oblik. Opisanom procesu posebno su skloni amiloid  $\beta$  monomeri sačinjeni od 42 aminokiselinska ostatka. Pomenuta vlakna talože se izvan neurona, u gustim formacijama – senilnim (neuritičkim) naslagama. Tokom ovog procesa dolazi do gubitka sinaptičkih veza i neurodegeneracije, što za posledicu ima demenciju. Ovo je, zapravo, ključni korak u razvoju AB.<sup>66</sup>

Eksperimentalno je ustanovljeno da je agregacija 2 do 14 amiloid  $\beta$  monomera u oligomere zavisna od koncentracije, te da je efikasnija u oksidacionoj sredini, kao i u prisustvu katjona dvovalentnih metala (slika 3). Neurotoksičnost dimera i trimera amiloid  $\beta$  monomera izdvaja se u poređenju sa drugim formama amiloid  $\beta$  proteina. Intenzitet defekata kod AB proporcionalan je broju (količini) amiloid  $\beta$  oligomera u moždanom tkivu, a ne broju (količini) svih njegovih oblika.<sup>67</sup>



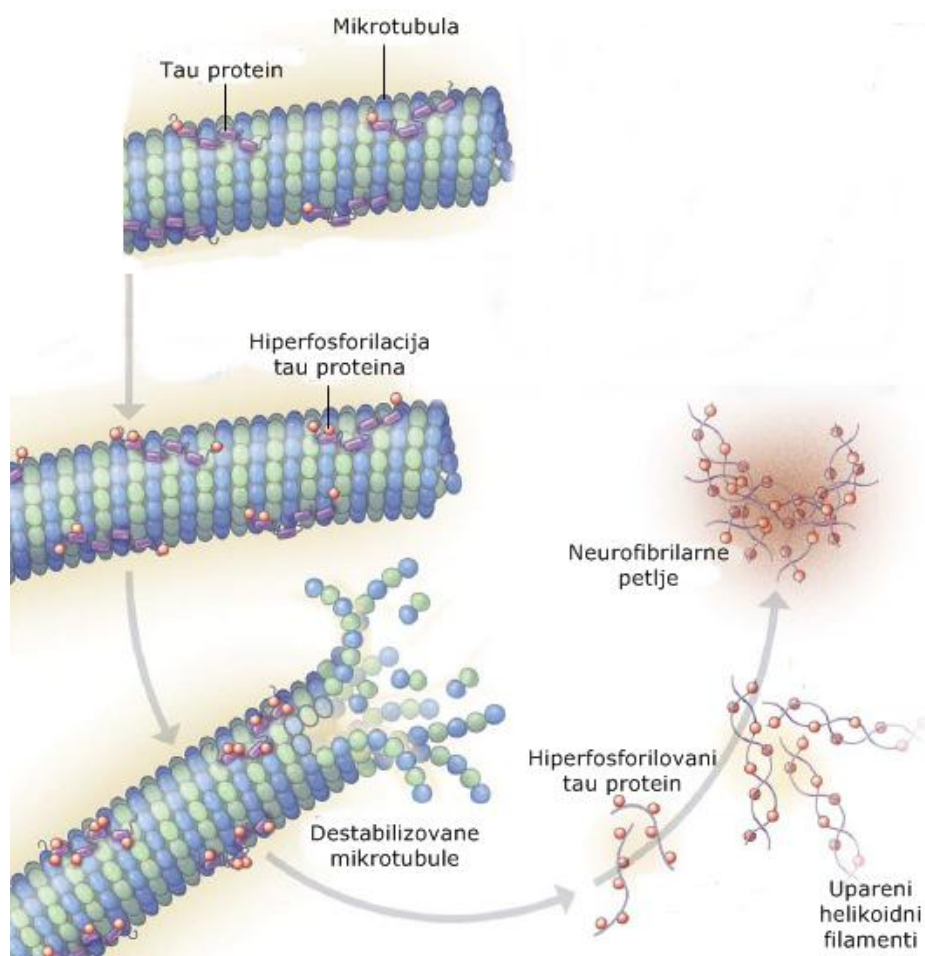
**Slika 3.** Končasti i prstenasti agregati amiloid  $\beta$  monomer (A). Sa povećanjem koncentracije monomera, raste njihova sposobnost agregacije, što se može videti na elektroforegramu u trakama 1-5, gde su uzorci poređani po rastućoj koncentraciji monomer (B). Formiranje polimera pospešeno je dodatkom oksidacionog sredstva, kao i katjona dvovalentnih metala (trake 2 i 3) (C). Prilagođeno iz literature.<sup>67</sup>

Hipoteza o neuronskoj citoskeletnoj degradaciji zasniva se na pojavi abnormalne agregacije tau proteina – proteina prisutnog u mikrotubulama, sa ekspresijom u neuronima. Tau je u normalnim uslovima protein rastvoran u vodi, koji deluje tako što stabilizuje mikrotubule u ćelijskom citoskeletu, a njegova funkcija regulisana je fosforilacijom. Kod pacijenata sa AB, tau protein je hiperfosforilovan i nerastvoran, bez afiniteta prema mikrotubulama. Akumulira se u formi uparenih helikoidnih filamenata koji se unutar nervnih ćelija dalje agregiraju u obliku neurofibrilarnih petlji, često u pratnji amiloidnih naslaga (slika 4). Broj ovih petlji patološki je marker i od značaja u proceni stadijuma AB.<sup>66</sup>

Poput amiloid  $\beta$  oligomera, abnormalni agregati tau proteina takođe su neurotoksični. Povećani nivo fosforilovanog, kao i ukupnog tau proteina u cerebrospinalnoj tečnosti u korelaciji je sa lošim rezultatima kognitivnih testova pacijenata obolelih od AB. Upravo ovi molekuli sastavni su deo biomarkerskog testa kojim je moguće predvideti pojavu date bolesti kod osoba sa blagim poremećajem pamćenja.<sup>66,67</sup>

Eksperimentalni dokazi ukazuju na to da agregacija amiloid  $\beta$  monomera prethodi i pospešuje agregaciju tau proteina. Stoga je moguće konstatovati da su

hipoteza o amiloidnoj kaskadi i hipoteza o neuronskoj citoskeletnoj degradaciji usko povezane.<sup>67</sup>



**Slika 4.** Proces formiranja neurofibrilarnih petlji. Prilagođeno iz literature.<sup>67</sup>

Dosadašnjim istraživanjima ustanovljeno je da tokom razvoja AB dolazi do promene količine amiloid  $\beta$  monomera i fosforilovanog oblika tau proteina u cerebrospinalnoj tečnosti. Mehanizmi koji dovode do formiranja neurofibrilarnih petlji i neuritičkih naslaga još uvek nisu dovoljno istraženi. Formiranje ovih struktura dovodi do oštećenja i smrti neurona, što za posledicu ima gubitak pamćenja i simptomatske promene u ponašanju. Takođe, prema aktuelnim hipotezama, i cirkulišući oligomeri (a ne isključivo neuritičke naslage) potencijalno su neurotoksični. Naime, povećano otpuštanje neurotransmitera poput glutamata doprinosi inflamaciji i neuronskoj smrti. Neuronska smrt najpre zahvata regije mozga odgovorne za pamćenje i govor, a vremenom i čitav mozak.<sup>66</sup>

Ipak, najnovijim istraživanjima ustanovljeno je da amiloidna hipoteza zaista jeste glavni mehanizam razvoja genetski naslednog oblika AB, ali ne i oblika koji nije nasledan. Zapravo, smatra se da je u datom slučaju ista igra sekundarnu ulogu, kao deo jednog znatno složenijeg, a praktično u celosti nepoznatog procesa u centralnom nervnom sistemu (CNS). Povod za ovakvu pretpostavku čini nedostatak dokaza da dosadašnji lekovi za tretman Alchajmerove bolesti mogu biti upotrebljeni kod svakog njenog oblika. Kako je već pomenuto, aktuelne terapije u tretmanu AB mahom se baziraju na uklanjanju simptoma bolesti, radi usporavanja njene progresije.<sup>63</sup>

Klinička ispitivanja pokazala su pozitivne efekte inhibitora acetilholinesteraze (AChE) u terapiji blagih i umerenih oblika AB. Tokom rane faze bolesti, gubitak neurona dovodi do smanjenja nivoa holin acetyl-transferaze u moždanom tkivu, čime se smanjuje sposobnost sinteze acetilholina. Ovakav deficit moguće je prevazići sprečavanjem degradacije postojećih molekula acetilholina. Jedan od do sada ispitivanih inhibitora AChE jeste donepezil.<sup>68</sup> S druge strane, memantin blokira glutamat (inače prisutan u većim koncentracijama kod osoba obolelih od AB) da se veže za odgovarajući receptor, što bi omogućilo transport kalcijuma do mozga i uslovalo oštećenje moždanog tkiva. Do sada, međutim, nisu bili ispitivani efekti donepezila u kombinaciji sa memantinom, antagonistom *N*-metil-D-aspartat receptora.<sup>63,68</sup>

U kliničkoj studiji od godinu dana, koja je obuhvatila pacijente sa umerenim oblikom AB, testirana su oba leka.<sup>68</sup> Prva grupa pacijenata konstantno je uzimala donepezil, druga ga je po isteku 3 meseca zamenila memantinom, dok je treća grupa pacijenata istovremeno koristila oba leka. Pacijenti u svim grupama postigli su blagi napredak u mentalnim sposobnostima, s tim da je isti bio najizraženiji kod grupe koja je koristila samo donepezil. Osim toga, došlo se do zaključka da grupa koja je uzimala oba leka nije postigla bolje rezultate od grupa koje su koristile samo jedan lek. Potrebno je, međutim, sprovesti dalja istraživanja, kako bi se utvrdilo da li se pozitivni terapijski efekti ovih lekova javljaju i kod pacijenata sa AB u poznom stadijumu, tj. kod teških slučajeva.

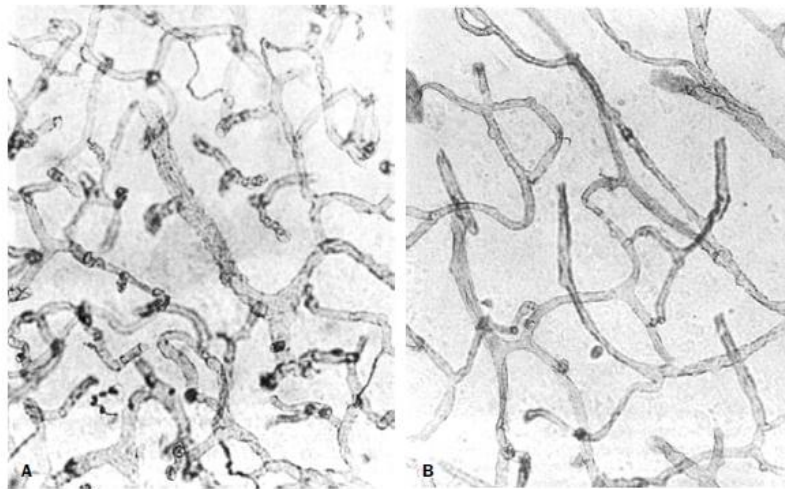
Terapija matičnim ćelijama predstavlja jedan od najnovijih i potencijalno krajnje efikasnih načina u tretmanu AB. Poznato je da ove ćelije pokazuju pozitivne terapijske efekte na nivou regeneracije i supstitucije ćelija i različitih tkiva. Terapija matičnim

ćelijama razvija se u dva smera. Jedan je indukovanje aktivacije endogenih matičnih ćelija, a drugi je regeneracija oštećenog tkiva putem transplantacije matičnih ćelija na oštećena mesta. Na mišjem modelu AB uočeno je značajno poboljšanje pamćenja, nakon transplantacije matičnih ćelija poreklom iz pupčane vrpce čoveka. Istovremeno je zapaženo da proizvodnja amiloid  $\beta$  proteina nije snižena. Stoga se može reći da su u cilju optimizacije uslova transplantacije neophodne dalje studije koje bi rezultovale povećanim terapijskim efektom matičnih ćelija u tretmanu AB.<sup>69</sup>

Patologija AB nije ograničena samo na formiranje amiloidnih naslaga i neurofibrilarnih petlji. Naime, novijim istraživanjima ustanovljeno je da je u više od 30% slučajeva ove bolesti ispoljena i cerebrovaskularna patologija koja uključuje i ćelijske elemente od kojih je sazdana krvno-moždana barijera. Kliničkim studijama dokazano je i da se poremećaj funkcije ove barijere kod pacijenata obolelih od AB javlja ukoliko oni ispoljavaju simptome periferalnih vaskularnih anomalija, poput hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa. Pri tome, uočeno je i da je agregacija amiloid  $\beta$  proteina u moždanoj vaskulaturi usko povezana sa opadanjem mentalnih sposobnosti kod ljudi, te da poremećena funkcija krvno-moždane barijere ima isti efekat.<sup>70</sup>

Iako je datom hipotezom prvobitno pretpostavljeno da se akumulacija amiloid  $\beta$  proteina i prateći poremećaj funkcije barijere javljaju kao posledica neadekvatne eliminacije amiloid  $\beta$  proteina iz mozga, veći broj novijih istraživanja nameće potrebu za njenom modifikacijom. Prema ovoj hipotezi, agregacija amiloid  $\beta$  proteina dovodi do naglog formiranja novih krvnih sudova u mozgu i povećane vaskularne permeabilnosti (slika 5). Smanjeni protok krvi kroz moždano tkivo, prekid čvrstih veza u datoj barijeri i poremećaj nivoa proteina koji regulišu količinu amiloid  $\beta$  proteina u mozgu faktori su koji doprinose povećanju nivoa amiloid  $\beta$  proteina, a time i formiranju novih krvnih sudova. Zapaljenski procesi dalje doprinose vaskularnim promenama u mozgu osoba obolelih od AB, pri čemu dolazi i do lučenja trombina. Ovaj protein, pak, dovodi do izgradnje krvnih sudova i povećane sekrecije amiloid  $\beta$  proteina, što za posledicu ima formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, endotelnih oštećenja i neurotoksičnost.<sup>71</sup>



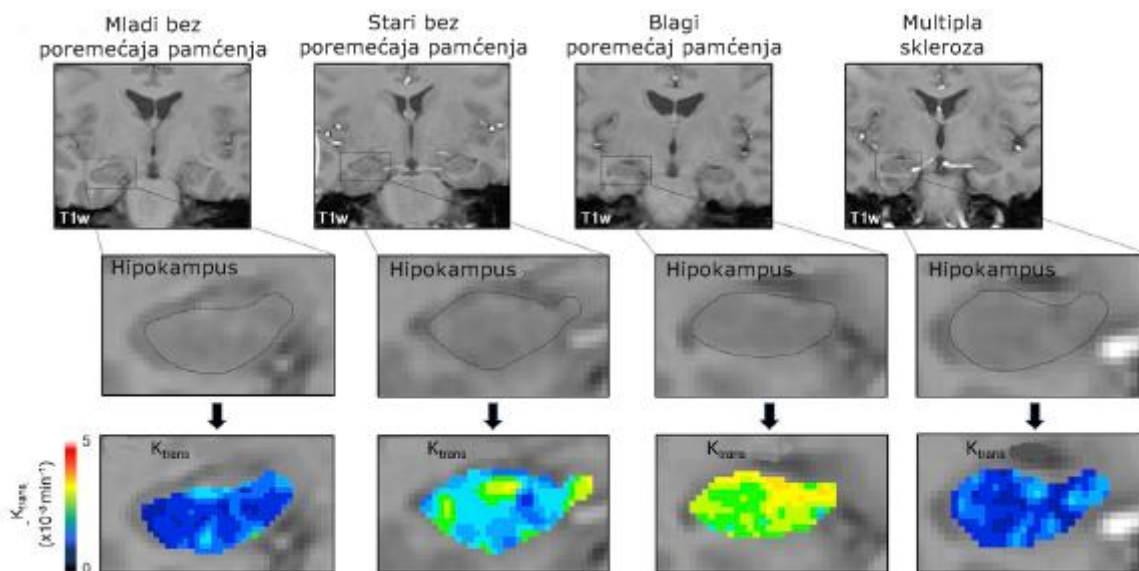


**Slika 5.** Mikrovaskularna mreža u moždanom tkivu pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti (A) i zdravih osoba (B). Prilagođeno iz literature.<sup>71</sup>

Pojava amiloid  $\beta$  proteina u krvnoj plazmi predstavlja još jedan od indikatora da kod pacijenata obolelih od AB dolazi do narušavanja strukture i funkcije krvno-moždane barijere. Isto je zapaženo i na odgovarajućem mišjem modelu. Prethodnim istraživanjima date pojave ustanovljeno je da sa porastom nivoa amiloid  $\beta$  proteina u organizmu dolazi do većeg dopremanja kalcijuma u moždano tkivo, pri čemu povišeni nivo kalcijuma dovodi do strukturnih promena čvrstih veza krvno-moždane barijere.<sup>72,73</sup> Postmortalne analize moždanog tkiva pacijenata obolelih od AB zaista ukazuju na oštećenje ove barijere. Još uvek, međutim, nije sasvim poznato u kojoj fazi bolesti dolazi do navedenog oštećenja.

Primenom dinamičkog magnetno-rezonantnog imidžinga (DCE-MRI) u praćenju permeabilnosti različitih delova mozga živih pacijenata, utvrđeno je da oštećenje krvno-moždane barijere u regionu hipokampusa zavisi od životnog doba pacijenata (slika 6). Konstanta regionalne permeabilnosti ove barijere ( $K_{trans}$ ) uzeta je kao merilo njenog oštećenja. Kod mlađih osoba bez poremećaja pamćenja ova konstanta imala je izuzetno nisku vrednost, dok je kod starijih osoba bez naznačenih zdravstvenih problema bila tek neznatno povišena. Kod pacijenata sa blagim simptomima gubitka pamćenja, međutim, vrednost konstante bila je značajno povišena. Niska vrednost izmerena je i kod mlađih pacijenata obolelih od multiple skleroze, bez poremećaja pamćenja. Ova grupa pacijenata poslužila je za validaciju metode, budući da je kod njih nedvosmisleno

dijagnostifikovano oštećenje krvno-moždane barijere, ali ne u regionu hipokampusa. Utvrđeno je i to da se ova oštećenja javljaju u ranoj fazi razvoja bolesti, kao i da upravo ona doprinose problemima pacijenata obolelih od AB u razmišljanju i pamćenju.<sup>73</sup>

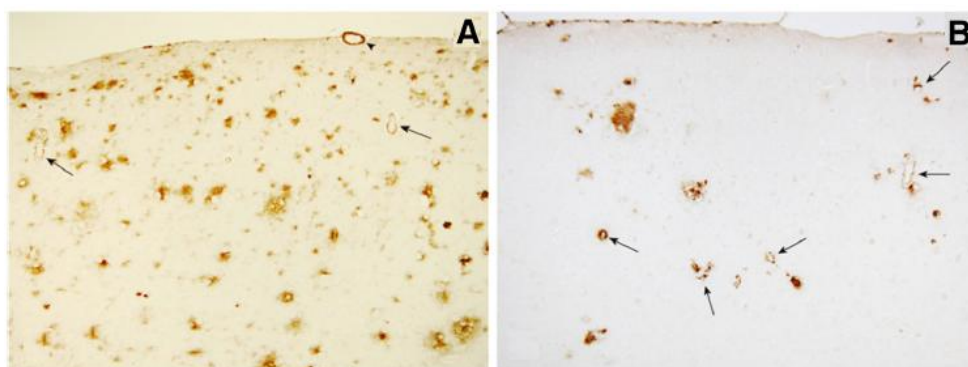


**Slika 6.** Dinamički MRI snimci i reprezentativne  $K_{trans}$  mape za mlađe i starije osobe bez poremećaja pamćenja, pacijente sa blagim simptomima poremećaja pamćenja i mlađe pacijente obolele od multiple skleroze. Prilagođeno iz literature.<sup>73</sup>

Prilikom formiranja amiloidnih naslaga, u njih se ugrađuju bakar i cink, dok u moždanom tkivu dolazi do porasta nivoa gvožđa. U stvari, joni cinka i bakra ubrzavaju proces formiranja amiloidnih naslaga. Osim toga, bakar i gvožđe povećavaju neurotoksičnu aktivnost amiloid  $\beta$  proteina i oksidativno umrežavanje peptida u stabilne oligomerne forme. Ovakve interakcije amiloid  $\beta$  proteina sa metalima doprinose patologiji AB i predstavljaju osnov za svojevrsnu metalnu hipotezu njenog razvoja. Poznato je da amiloid  $\beta$  protein poseduje selektivna vezujuća mesta visokog i niskog afiniteta za metale, koja su histidinski regulisana. Amiloid  $\beta$  protein direktno koordinuje cink i bakar, ali ne i gvožđe i neke druge jone metala. Ipak, uočeno gvožđe na periferiji naslaga kompleksirano je feritinom tako da formira neuritičku komponentu naslaga. Prilikom vezivanja  $\text{Cu}^{2+}$  (direktno za amiloid  $\beta$  protein) i  $\text{Fe}^{3+}$  (u formi neuritičke komponente) dolazi do njihove redukcije i nastanka  $\text{H}_2\text{O}_2$ , zbog dvostrukog transfera elektrona na kiseonik. Ova reakcija više puta eksperimentalno je dokazana. Pomenuti proces odgovoran je za oksidativno oštećenje moždanog tkiva (posredovano  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kod

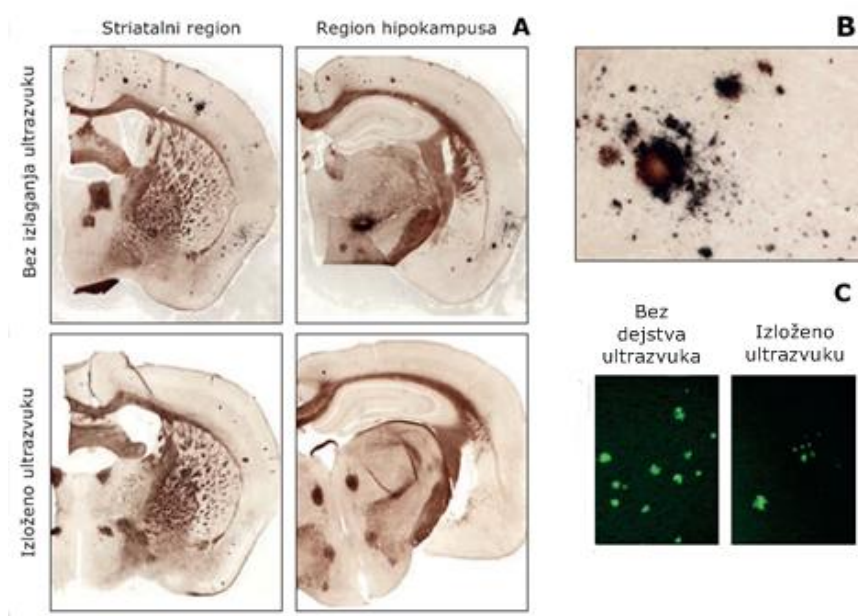
pacijenata obolelih od AB, što je dokumentovano u aktuelnoj literaturi. Molekul  $H_2O_2$  u stanju je da prođe kroz krvno-moždanu barijeru i reaguje sa redukovanim jonima  $Cu^+$  i  $Fe^{2+}$  stvarajući pri tome visokoreaktivne hidroksilne radikale. Nastali radikali zatim dovode do oštećenja moždanog tkiva, kroz različite interakcije sa prisutnim molekulima.<sup>12</sup>

Na bazi istraživanja u poslednjih 15 godina zaključeno je da imunizacija protiv amiloid  $\beta$  proteina može dovesti do uklanjanja ovog proteina iz moždanog tkiva, kao i da se time može sprečiti dalja progresija bolesti. Naime, amiloid  $\beta$  dimeri izolovani su iz moždanog tkiva ljudi obolelih od AB, a pretpostavlja se da njihovo prisustvo u stvari uzrokuje poremećaje u pamćenju. Takođe, *in vitro* eksperimentima pokazano je da nagomilavanje ovih dimera indukuje hiperfosforilaciju tau proteina. Imunoterapija relevantnih pacijenata podrazumeva dva tipa vakcinacije: aktivnu (kojom pacijenti primaju odgovarajući antigen) i pasivnu (kojom pacijenti primaju antitela koja deluju protiv amiloid  $\beta$  dimera). Efikasni agens za aktivnu terapiju nosi oznaku CAD106. On predstavlja agregaciju sastavljenu od jednog do šest amiloid  $\beta$  monomera, povezanih sa nosačem u kome se nalazi ovojni protein bakteriofaga. Injektovanjem datog molekula u organizam pacijenata obolelih od AB dolazi do stvaranja specifičnih antitela koja umanjuju agregiranje amiloidnih naslaga (slika 7). Kod pasivne imunizacije, smatra se da se antitela vezuju za amiloid  $\beta$  dimere. Mikroglije potom prepoznaju novonastale agregacije, što za posledicu ima njihovu eliminaciju. Imunoterapija fokusirana na tau protein još uvek je u povoju.<sup>74</sup>



**Slika 7.** Efekat aktivne imunizacije tkiva u kom su prisutne amiloidne naslage. Isečak tkiva bez dodatka CAD106 (A) i nakon njegovog dodavanja (B). Fibrilarne forme amiloid  $\beta$  proteina označene su strelicama. Prilagođeno iz literature.<sup>74</sup>

Posebno zanimljivo istraživanje na mišjem modelu AB ukazuje da je nefarmakološkim putem tj. primenom skenirajuće ultrazvučne tehnike moguće ukloniti amiloid  $\beta$  segmente i povratiti pamćenje. Pomoću ponovljenih skenirajućih ultrazvučnih tretmana, amiloid  $\beta$  uklonjen je iz segmenata mišjeg mozga, bez potrebe za dodatnim terapijskim agensima (slika 8). Zapravo, konfokalnom mikroskopijom i trodimenzionalnom rekonstrukcijom utvrđeno je značajno povlačenje amiloid  $\beta$  segmenata u lizozime aktiviranih mikroglija, ćelija odgovornih za očuvanje imuniteta CNS. Kod 75% miševa podvrgnutih ultrazvučnom tretmanu došlo je do uklanjanja amiloidnih naslaga; isti su imali poboljšani učinak na sva tri testa memorije. Ovi rezultati ukazuju na perspektivu ultrazvučne terapije kao blage i nedestruktivne metode za eliminaciju amiloidnih naslaga.<sup>75</sup>



**Slika 8.** (A) Isečci različitih regiona moždanog tkiva miševa bez izlaganja ultrazvučnom tretmanu, odnosno nakon izlaganja istom. (B) Crvenom bojom markirane su kompaktne, zrele amiloidne naslage, dok su difuznije naslage markirane crnom bojom. (C) Efekat ultrazvuka uočava se poređenjem tretiranog i netretiranog tkiva (amiloidne naslage obojene su tioflavinom). Prilagođeno iz literature.<sup>75</sup>

Princip ove metode zasniva se na intravenskom injektovanju (u miševu) mikro-mehurića inertnog gasa okruženih lipidnom membranom. Ovi mehurići, zatim, bivaju akustično aktivirani dejstvom ultrazvuka, što uslovljava njihovu ekspanziju i

kontrakcije. Opisani procesi dovode do privremenog poremećaja strukture krvnih zidova što, u stvari, otvara krvno-moždanu barijeru, slabljenjem čvrstih veza karakterističnih za datu strukturu. Sam mehanizam kojim dolazi do transporta amiloid  $\beta$  segmenata još uvek nije poznat, baš kao ni mehanizam apsorpcije od strane mikroglia.<sup>75</sup>

Iako direktna povezanost Alchajmerove bolesti sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom još uvek nije potvrđena, zanimljivo je da kod pacijenata koji boluju od AB postoji izvesna prevalenca ka oboljevanju i od ALS. Ne isključuje se ni mogućnost da obe ove neurodegenerativne bolesti imaju iste uzročnike.<sup>76</sup> ALS je neurodegenerativna bolest sa neizbežno smrtnim ishodom. Obično pogađa ljude srednje životne dobi i razvija se u obliku progresivne paralize (usled degeneracije motornih neurona), pri čemu smrt nastupa za oko pet godina. Patogeneza ove bolesti nije dovoljno poznata, a trenutno ne postoji efikasna terapija.<sup>16</sup> Kod 15 – 20 % pacijenata obolelih od ALS uočena je mutacija gena za proizvodnju Cu, Zn superoksid-dismutaze (Cu, Zn-SOD), zbog čega se ova bolest povezuje sa slobodnim radikalima.<sup>13,77</sup> Cu, Zn-SOD u organizmu konvertuje superoksidni radikal-anjon do kiseonika i vodonik-peroksida. Pošto je aktivnost ovog enzima kod ALS pacijenata umanjena, dolazi do povećanja nivoa slobodnih radikala u organizmu, što dovodi do oštećenja motornih neurona. Ne samo da mutiranjem Cu, Zn-SOD preostaju male količine funkcionalnog enzima, već mutirani dobija novu ulogu. Prema ne sasvim utvrđenom mehanizmu, mutirana Cu, Zn-SOD ponaša se kao katalizator u procesima kojima nastaju slobodni radikali.<sup>13</sup> Pored opisanih procesa, poznato je i da na mestima oštećenja neurona dolazi do povećanja koncentracije NO<sup>\*</sup> radikala.<sup>77</sup>

### **2.3. Biološka aktivnost i terapijski potencijal avarola**

Prirodni proizvodi morskog porekla već decenijama privlače pažnju biologa i hemičara. Mora su staništa bogate biološke raznolikosti, pošto u njima žive predstavnici čak 34 od ukupno 36 filuma živog sveta naše planete, sa približno 300 000 različitih morskih vrsta do sada poznatih čoveku. Ipak, ograničena dostupnost organizama otežavala je sistematični pristup izučavanju morskog sveta. Sa razvojem opreme za njihovo prikupljanje, došlo je do konstantnog napretka u razumevanju evolutivne istorije i prilagodljivosti stanovnika mora na različite uslove svog životnog okruženja.<sup>78</sup>

Tokom proteklih šest i po decenija objavljen je značajan broj radova u kojima su okarakterisana mnoga prirodna organska jedinjenja izolovana iz morskih organizama. Procenjuje se da je iz morskih organizama izolovano više od 10 000 jedinjenja sa potencijalnim farmakološkim dejstvom.<sup>79</sup> Po svojoj hemijskoj strukturi, ne mogu se uporediti sa prirodnim proizvodima kopnenog porekla.

Premda se ova jedinjenja trenutno ne koriste u lečenju AB, značajan broj bazičnih (fundamentalnih) istraživanja ukazuje na njihovu moguću primenu u tretmanu ove bolesti. Do sada ispitivana jedinjenja poreklom iz morskih organizama (kao i njihovi derivati) uglavnom su pokazali potencijal u inhibiciji enzima acetilholinesteraze (AChE), poput seskviterpenskih acetata, plastohinona, farnesilacetona, derivata pirola i bromotirozina.<sup>80</sup> S druge strane, alkaloid himenialdisin u stanju je da inhibira fosforilaciju tau proteina, što predstavlja jedan od mogućih načina lečenja AB koji je još uvek nedovoljno ispitan.<sup>81</sup>

Jedna od najšire zastupljenih grupa organskih jedinjenja kod organizama morskog dna su terpenoidni hinoni i hidrohinoni. Broj novootkrivenih struktura pomenutog tipa konstantno raste. Hinoni i hidrohinoni morskog porekla privukli su pažnju naučnika zbog toga što pored svoje specifične i raznolike strukture, poseduju i značajnu biološku aktivnost, između ostalog, antioksidativnu, citotoksičnu, antibakterijsku, insekticidnu i anti-HIV.<sup>82,83</sup> Eksperimentalno je ustanovljena visoka antioksidativna aktivnost pojedinih hidrohinona poreklom iz morskih organizama.<sup>84,85</sup> Morski sunđeri posebno su bogat izvor datih supstanci. Pretpostavlja se da postoje već oko 700-800 miliona godina, i predstavljaju najrasprostranjeniji filum morskih organizama, sa oko 15 000 vrsta.<sup>86</sup> Sunđeri se mogu podeliti u tri glavne klase: Calcarea (imaju karbonatni skelet), Hexactinellidae (sazdani od silikatnih igličastih niti) i Demospongiae (sazdani od igličastih struktura proteinskog porekla). Oni su najprimitivniji višecelijski organizmi bez organizovanih sistema tkiva i organa. Predstavljaju deo faune morskog dna, i mogu se naći u svim delovima morskog sveta, od plitkog priobalja do velikih dubina okeana.<sup>87</sup> Žive u simbiozi sa različitim bakterijama, koja do danas nije detaljnije proučena. Hraneći se sistemom filtracije, oni vare organsku materiju radi proizvodnje metaboličke energije. Pošto morski sunđeri poseduju širok spektar biosintetskih sposobnosti, oni predstavljaju vrlo zanimljiv izvor molekula (ili modela za sintezu strukturnih analoga) sa potencijalnom primenom u



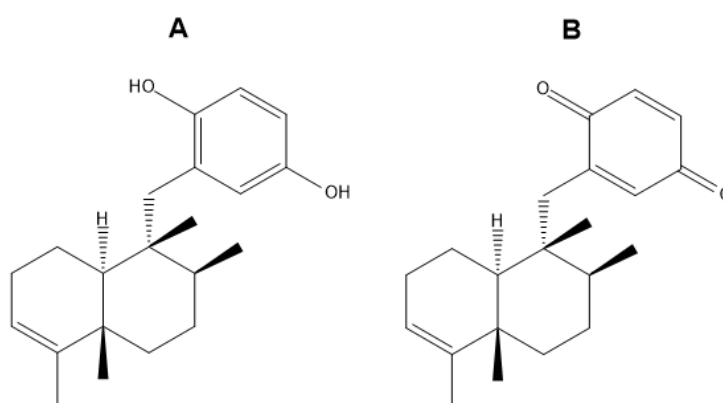
terapiji različitih bolesti.<sup>88</sup> S obzirom na to da su nepokretni, bez fizičkih mogućnosti za odbranu, sunđeri su evoluirali tako da su iznašli alternativne načine za samoodbranu.<sup>78</sup> Poznato je da ovi organizmi proizvode biološki aktivna jedinjenja čija je uloga, po svojoj prilici, zaštitna, tj. u odbrani od predatora.<sup>1,2</sup> Različiti faktori regulišu proizvodnju sekundarnih metabolita kod sunđera – abiotički (temperatura, svetlost, salinitet vode, zagađujuće materije) i biotički (način rasta, prostorna kompeticija, predatori, bakterijski simbionti). Zanimljivo je da je koncentracija sekundarnih metabolita najveća u perifernim delovima sunđera. Uprkos značajnom broju hinona i hidrohina poreklom iz mora, od kojih mnogi pokazuju antiinflamatorna svojstva, mali je broj objavljenih radova o njihovom potencijalnom terapeutskom efektu u lečenju AB.<sup>83,89</sup>

Avarol predstavlja seskviterpenoidni hidrohinon izolovan iz morskog sunđera *Dysidea avara* (Schmidt, 1862) (slika 9), zajedno sa manjim količinama njegovog oksidovanog oblika, avarona.<sup>1,2,90</sup> Količina avarola izolovana iz pomenutog sunđera iznosi 18% njegove suve mase. Taksonomski, sunđer *Dysidea avara* pripada filumu Porifera, a u okviru njega klasi običnih sunđera (Demospongiae), te redu Dytioceratida, porodici Dysideidae. Ima telo ružičaste boje, mestimično končaste strukture, i u stanju je da apsorbira velike količine vode. Živi u vodama Sredozemlja i Atlantskog okeana, posebno u priobalju Brazila i saharke Afrike, na dubinama do 80 metara. Zanimljivo je da iz filuma Porifera potiče čak oko 50% svih prirodnih proizvoda izolovanih iz morskih beskičmenjaka, a da je klasa Demospongiae najbogatiji izvor sekundarnih metabolita. Avarol je uspešno izolovan i iz nekoliko drugih sunđera iste porodice, ali ga najviše ima u sunđeru *Dysidea avara*.<sup>91</sup>



**Slika 9.** Mediteranski sunđer *Dysidea avara* fotografisan kod Starigrada (Republika Hrvatska). Fotografiju ustupio Dalibor Andres, vlasnik autorskih prava.

Hemijska reaktivnost i biološka aktivnost avarola i avarona (slika 10) trenutno je najviše izučavana u odnosu na ostale hinone i hidrohinoone poreklom iz morskih organizama, uprkos relativno malom broju dostupnih publikacija.<sup>92</sup> Avarol i avaron (kao i njihovi derivati) spadaju među najznačajnije sekundarne metabolite morskih organizama, zbog toga što poseduju širok spektar biološke aktivnosti i nisku toksičnost.<sup>68</sup> Konkretno, avarol odlikuju brojna farmakološka svojstva, uključujući antioksidativnu, antiinflamatornu, antipsorijatičnu, antitumorsku, antibakterijsku, antimikrobnu i anti-HIV aktivnost.<sup>5,93,94</sup> Ovaj redoks par (avarol i avaron) ispoljava i antimutageni efekat.<sup>3,4,95</sup> Pored ostalih, ističe se značajna anti-DPPH radikalna aktivnost.<sup>2</sup> Avarol i avaron podležu vremenski i pH-zavisnoj oksido-reduktivnoj interkonverziji (redoks potencijal ovog para molekula iznosi -0.53 V), tako da se u svakom posmatranom sistemu može očekivati prisustvo oba molekula u različitom odnosu, premda je avarol znatno stabilniji oblik.<sup>78</sup> Avarol i avaron *in vitro* dovode do inhibicije agregacije trombocita.<sup>96</sup> Poznato je i da avarol poseduje anestetički efekat i nisku toksičnost.<sup>97</sup> Eksperimentalno je ustanovljeno da se *in vitro* avarol vezuje za molekule DNK i modifikuje nukleinske baze.<sup>98</sup> Takođe, otkriveno je i da avaron i njegovi metilamino derivati dovode do oštećenja DNK.<sup>99</sup>



**Slika 10.** Struktura avarola (A) i njegovog oksidovanog oblika, avarona (B).

Pretpostavlja se da je hidrohinoonski segment avarola i avarona odgovoran za njihovu biološku aktivnost, dok ostatak molekula u ovim procesima igra marginalnu ulogu.<sup>10</sup> Ova pretpostavka izvedena je na osnovu istraživanja kojima je ustanovljeno da pri reakcijama između avarola s jedne, i proteina i nukleinskih kiselina s druge strane, dolazi do nukleofilne adicije pomenutih vrsta na hidrohinoonsko jezgro. Pri ovim



reakcijama moguće je umrežavanje proteina i nukleinskih kiselina, ali i stvaranje monoaddukata. Ovakvi mehanizmi eksperimentalno su potvrđeni.<sup>100</sup>

Avarol, avaron i njihovi derivati pokazuju specifičnu aktivnost za ćelije leukemije, čak za red veličine veću nego prema bilo kojim drugim tumorskim ćelijama, a ujedno i veću od njemu srodnih prirodnih molekula.<sup>101,102</sup> Ovo je potvrđeno kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* eksperimentima, što pomenuta jedinjenja čini pogodnim vodećim strukturama za razvoj novih lekova u tretmanu leukemije. Pretpostavljeni mehanizam antitumorske aktivnosti uključuje sposobnost redoks para hinon/hidrohinon da reverzibilno formira intermedijerne radikale koji ćelijske komponente oštećuju direktno ili indirektno, formiranjem toksičnih kiseoničnih radikala. Eksperimentalno je, međutim, utvrđeno da avarol ne dovodi do smrti zdravih ćelija.<sup>78</sup> Novijim istraživanjem ustanovljeno je da ovo jedinjenje selektivno indukuje i smrt tumorskih ćelija pankreasa.<sup>103</sup>

*In vitro* eksperimentima potvrđeno je svojstvo avarola i avarona da uspešno inhibiraju replikaciju HIV virusa. Uporedo su testirani i različiti derivati avarona, ali nisu pokazali veću aktivnost od avarola i avarona. Pretpostavlja se da je za inhibiciju aktivnosti HIV-1 reverzne transkriptaze potrebno prisustvo hidroksilne grupe na hidrohinoskom segmentu molekula. Ipak, ova dva jedinjenja nisu se pokazala klinički primenljivim kod pacijenata obolelih od AIDS-a.<sup>5</sup> Verovatni mehanizam dejstva avarola ne odnosi se na inhibiciju transkriptaze, već na inhibiciju njene biosinteze, koja započinje neposredno nakon infekcije HIV-1 virusom. S druge strane, većina jedinjenja pokazala je sposobnost inhibicije multiplikacije polio virusa (koji je takođe RNK virus).<sup>78,104</sup>

Pojedini tio derivati avarola imaju sposobnost inhibicije enzima acetilholinesteraze.<sup>105</sup> Abnormalna aktivnost ovog enzima jedan je od faktora koji doprinose razvoju senilne demencije i AB.<sup>3</sup> Za razliku od avarola i avarona, izvesni 3' i 4' tio derivati avarola umereno su inhibirali dati enzim. Poređenja radi, alkaloid galantamin, jedan od tri terapeutika koji se koriste u kliničkom tretmanu AB, inhibira AChE pri 0.01 µg. Generalno posmatrano, alkaloidi jesu dobri inhibitori datog enzima; međutim, istovremeno ispoljavaju niz sporednih (neželjenih) efekata, što ih ne čini idealnim lekovima u tretmanu AB. Zapravo, do sada korišćena jedinjenja sa

holinergičkim dejstvom efikasna su jedino na nivou otklanjanja simptoma AB, uz ograničeno dejstvo na progresiju bolesti. Shodno tome, danas ne postoje efikasni terapeutici sposobni da spreče ili uspore razvoj AB. Upravo u pomenutoj činjenici leži mogućnost primene semi-sintetičkih tio i amino derivata avarola i avarona u lečenju pomenute bolesti, pošto avarol ne spada u grupu alkaloida, već terpenoida.<sup>106,107</sup> Osim toga, studija na mozgu pacova u uslovima *in vivo* ukazala je da avarol nije neurotoksičan.<sup>108</sup> Od izuzetne važnosti je i podatak da ovaj seskviterpenoidni hidrohion može da prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, s obzirom da je baš ta barijera česta prepreka u razvoju novih efikasnih lekova za tretman AB.<sup>11</sup> Do danas, u literaturi ne postoji dovoljno podataka o tome da li avarol i njegovi derivati imaju uticaja na agregaciju amiloid  $\beta$  proteina i strukturnih promena tau proteina, ključnih procesa pri razvoju ove bolesti, pa bi nova istraživanja u tom smeru mogla biti od farmakološkog značaja.<sup>2</sup> Pojedini tio-derivati avarola poseduju i antipsorijatično dejstvo.<sup>109,110</sup>

Inhibitorska aktivnost avarola i avarona, zajedno sa još devet njihovih derivata, ispitivana je za reakcije u kojima učestvuju enzimi (citohromi P450).<sup>111</sup> Ustanovljeno je da avarol i avaron najbolje inhibiraju enzimске aktivnosti pomenutih citohroma, inače odgovornih za oksidaciju steroida, masnih kiselina i ksenobiotika. Sem toga, poznato je i da avarol inhibira aktivnost Cu, Zn-SOD, koja učestvuje u razvoju ALS.<sup>112</sup>

Avarol je potencijalni antimitotski agens, pošto je ustanovljeno da inhibira tubulin, molekul odgovoran za polimerizaciju/depolimerizaciju ćelijskih mikrotubula, potrebnu za formiranje deobnog vretena. Sprečavanje ovog procesa je značajno za uspešnost hemoterapije kod različitih oblika kancera. Avarol snažno *in vitro* inhibira polimerizaciju tubulina od kog su sazdane mikrotubule moždanih ćelija. Ova pojava potvrđena je viskozimetrijskim analizama i elektronskom mikroskopijom. Ustanovljeno je i da avarol deluje citostatički tako što inhibira mitozu ćelija limfoma *in vitro*<sup>113-115</sup> i *in vivo* aktivnije nego citostatik bleomicin koji ima kliničku primenu.<sup>78</sup>

Otkriveno je i da avarol poseduje značajnu citotoksičnu aktivnost prema humanom karcinomu plazma ćelija (Kalerova bolest). Ove ćelije u normalnim fiziološkim uslovima imaju ulogu u proizvodnji antitela. Karcinom plazma ćelija ogleda se u agregaciji abnormalnih ćelija ovog tipa u koštanoj srži. U takvim uslovima, dolazi

do smanjenja proizvodnje normalnih krvnih zrnaca. U *in vitro* uslovima, avarol se pokazao citotoksičnim prema pomenutim ćelijama sa  $IC_{50} = 3.16 \mu M$ , što je poredbeno sa rokaglamidom upotrebljenim kao kontrolna proba ( $IC_{50} = 3.94 \mu M$ ).<sup>116</sup>

Usled niske citotoksičnosti i antioksidativne sposobnosti, avarol i avaron su i potencijalni UV-B fotoprotektivni agensi. Preparati različitog sastava, sa visokim sadržajem avarola, koriste se u prevenciji psorijaze, dermatitisa i raka kože. Sem toga, njihova primena isprobava se i kod tumora gastrointestinalnog i urinarnog trakta, čak i virusnih infekcija. Antitumorsko dejstvo avarola i avarona ispoljava se posredstvom reaktivnih kiseoničnih radikala, ali i putem arilovanja pojedinih biomolekula uključenih u proces razvoja tumora.<sup>117</sup> Pojedini tiosalicilni derivati avarola pokazali su se kao snažni inhibitori nastanka superoksidnog radikala u humanim neutrofilima.

Citostatička aktivnost avarola i avarona, niska toksičnost potvrđena u eksperimentima sa miševima, sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i stimulacije sinteze interferona, čine ova jedinjenja pogodnim za dalje sintetičke transformacije, u cilju poboljšanja njihovog dejstva.<sup>117</sup>

Istraživanjem koje se odnosilo na antiradikalnu aktivnost metanolnih ekstrakata različitih vrsta sunđera sa područja Mediterana ustanovljeno je da ekstrakt sunđera *Dysidea avara* deluje antiradikalno prema NO radikalu. Sem toga, ovaj ekstrakt ispoljio je naj snažnije dejstvo prema DPPH i superoksidnom radikalu. Ovakav rezultat je posebno zanimljiv zbog toga što je poznato da kada superoksidni radikal reaguje sa NO radikalom, kao proizvod nastaje znatno reaktivnije i oksidativnije jedinjenje, peroksinitritni jon ( $ONOO^-$ ), koji dovodi do fragmentacije DNK i lipidne peroksidacije.<sup>16,77</sup> Sem toga, ustanovljeno je da su uzorci istog sunđera prikupljeni sa različitih lokaliteta pokazali različitu antiradikalnu aktivnost. To ukazuje na postojanje uticaja životnog okruženja na hemijski sastav strukture koja čini sunđer, i proizvodnju njegovih metabolita. Pored toga, na različitu antiradikalnu aktivnost možda su uticali i mikroorganizmi koji žive na sunđerima, ili karakteristike vode u njihovom okruženju (temperatura, pH vrednost, salinitet i drugo).<sup>86</sup>

Iz uzoraka sunđera *Dysidea avara* prikupljenih sa različitih lokaliteta (Solomonska ostrva, Japan i drugi), pored avarola izolovani su i njegovi strukturni analozi. Sem toga, iz različitih sunđera koji pripadaju istoj porodici, izolovana su

jedinjenja čiji je biosintetski prekursor avarol. Većina ovih jedinjenja podvrgnuta je različitim analizama u cilju ispitivanja njihove citotoksičnosti i biološke aktivnosti. Pojedina jedinjenja poput diacetilavarola i melemeleona B pokazala su citotoksičnost i inhibitoriska svojstva koja po intenzitetu odgovaraju vrednostima dobijenim za avarol.<sup>5</sup>

Avarol, avaron i njihovi derivati ispoljavaju antigljivično i antibakterijsko dejstvo prema različitim sojevima Gram-pozitivnih bakterija.<sup>118-121</sup> Posebno se ističe antibakterijsko dejstvo avarola na *Streptococcus pneumoniae*, *Erysipelotrix rhusiopathiae* i *Salmonella typhimurium*.

Lizozim je enzim koji se koristi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, a poznato je da u obliku dimera ispoljava antiviralna i antiinflamatorna svojstva. Modifikacijom ovog enzima pomoću avarona dobijaju se biokonjugati čija antibakterijska dejstva su snažnija u odnosu na dejstva lizozima i avarona pojedinačno.<sup>122</sup>

Sa aspekta razvoja novih lekova protiv AB, potrebno je istaći i nedavnu *in vitro* proveru antimikrobne aktivnosti avarola na određene sojeve streptokoka i kandida. Naime, poznato je da su bakterije i gljivice u dentalnim naslagama uključene u razvoj periodontalne bolesti – stanja koje dovodi do zapaljenskih procesa i oštećenja desni i struktura koje daju potporu zubima. Ovi procesi mogu se iz usne duplje preneti na krvotok, a odatle širom organizma, između ostalog i do moždanog tkiva. S druge strane, u sprovedenim istraživanjima ustanovljeno je prisustvo bakterija i gljivica u mozgu pacijenata obolelih od AB. Snažno dejstvo avarola na testirane sojeve streptokoka i kandidate dodatno potkrepljuje terapijski potencijal hemije avarola u terapiji AB.<sup>123</sup>

Na osnovu podataka u literaturi može se zaključiti da bi avarol mogao da inspiriše novu ili unapredi postojeću terapiju AB koja bi, pre svega, bila zasnovana na njegovoj antiradikalnoj aktivnosti.

Pomalo neočekivana primena avarola i njegovih derivata izučavana je za potrebe brodograditeljske industrije. Naime, poznato je da kada se bilo koji objekat postavi u morsku vodu, na njegovoj površini dolazi do akumulacije organske materije rastvorene u vodi, a potom i do kolonizacije takve površine bakterijama i jednoćelijskim organizmima. Ovakav mikrobn film postepeno dovodi do naseljavanja drugih morskih

organizama poput algi, briozoa i školjki. Njihovo prisustvo dovodi do oštećenja površinske zaštite i ubrzanog propadanja materijala. Dosadašnji biocidni agensi koji se koriste za izradu zaštitnih premaza pokazali su se štetnim sa ekološkog stanovišta. Uočeno je da su morski sunđeri relativno nenaseljeni ovakvim organizmima, verovatno usled proizvodnje metabolita koji sprečavaju njihov razvoj. Iz tog razloga, ovakvi molekuli mogli bi biti upotrebljeni za zaštitu struktura koje se nalaze pod vodom. Od posebnog su značaja molekuli koji su slabo rastvorni u vodi, zbog produžene biološke aktivnosti premaza u koje bi bili dodati. Avarol i njegovi derivati su upravo zbog toga idealni kandidati za izradu zaštitnih premaza. Avarol je pokazao značajnu aktivnost protiv određenih sojeva bakterija, algi, ali i umerenu toksičnost prema larvama rakova.<sup>124,125</sup> Pojedini derivati avarola pokazali su jednak nivo aktivnosti, bez toksičnosti prema pomenutim larvama, pa predstavljaju jedinjenja pogodna za zaštitu materijala u brodogradnji.<sup>126</sup>

Kritični problem pri razvoju novih terapeutika na bazi morskih proizvoda jeste iznalaženje načina za adekvatno snabdevanje ovim prirodnim molekulima, uz istovremeno očuvanje staništa organizama iz kojih se dobijaju, kao i brojnosti jedinki. Koncentracije mnogih biološki aktivnih jedinjenja u organizmima morskih beskičmenjaka su neretko veoma niske. Primera radi, iz jedne tone sunđera *Lissodendoryx sp.* može se dobiti svega 300 mg smeše dva molekula sa snažnim citostatičkim dejstvom.<sup>127</sup> Zbog toga, prikupljanje velikih količina biomase iz mora radi dobijanja ovakvih jedinjenja može potencijalno dovesti i do izumiranja pojedinih vrsta. Moguća rešenja ovog problema ogledaju se u dobijanju molekula sintetičkim putem, ili uzgoju organizama koji ih proizvode u kontrolisanim uslovima, bilo u laboratoriji ili u posebnim uzgajalištima u moru. Premda je avarol moguće sintetisati u laboratorijskim uslovima, pokazalo se da je postojeći postupak za njegovu sintezu složen. Prvi put, avarol je laboratorijski sintetisan pre oko tri decenije, u formi racemske smeše. U narednom periodu pokušani su različiti postupci njegove sinteze, ali je problem uvek bio veliki broj koraka i nizak prinos avarola. Do sada je razvijena visokoefikasna totalna sinteza ovog molekula polazeći od (+)-5-metil-Wieland-Miescher ketona. Sinteza se vrši u 16 koraka, a prinos avarola iznosi 84%.<sup>18</sup> Ipak, postavlja se pitanje ekonomske isplativosti ovakvih postupaka nad ekstrakcijom avarola iz prirodnih izvora. Još uvek nema ni dostupnih informacija o tome da li je moguće uzgajati morski sunđer *Dysidea*

*avara* u cilju dobijanja avarola prirodnim putem. Trenutno, ovaj sunder se ne nalazi na listi ugroženih vrsta.

Za sada, postoji jedan alternativni način za *in vitro* dobijanje avarola, koji ujedno predstavlja i potvrdu pretpostavke da avarol sintetiše sunder *Dysidea avara*, a ne mikroorganizmi koji žive na njemu.<sup>128</sup> Postupak je razvijen po analogiji sa postojećim procedurama za uzgoj bakterija i gljivica. Kada se izolovane (pojedinačne) ćelije ovog sundera prenesu u sud sa morskom vodom obogaćenom jonima kalcijuma i magnezijuma, nakon dva do tri dana one spontano formiraju okruglaste agregate nalik tkivu (nazvane primorfi), u kojima dolazi do sinteze DNK i proliferacije. Nakon duže inkubacije, ovi agregati formiraju mrežaste strukture koje prekrivaju dno posude za inkubaciju ili slobodno plutaju po površini. Iz takvih struktura nije izolovan bakterijski RNK materijal, pa se sa sigurnošću može reći da je avarol isključivo metabolit sundera. Prinos avarola na ovaj način iznosi 1.4 µg na svakih 100 µg pomenutih agregata, što je poredbeno sa količinom avarola koju *Dysidea avara* proizvodi u prirodnom okruženju (1.8 µg/100 µg). Ustanovljeno je da pojedinačne ćelije sundera nemaju sposobnost sinteze avarola. Tek kada formiraju agregate, ispoljava se njihova telomerazna aktivnost (započinje sinteza molekula DNK). Pomenuti postupak potencijalno se može primeniti za komercijalnu proizvodnju avarola.<sup>129</sup>

Uprkos svim potencijalno korisnim biološkim aktivnostima avarola, njegova primenljivost u terapeutske svrhe možda se mora posmatrati sa izvesnom rezervom. Zbog svoje strukture, avarol potencijalno spada u grupu jedinjenja sklonih davanju lažnih pozitivnih rezultata pri različitim analizama.<sup>130</sup> Ispitivanjem povezanosti strukture i aktivnosti različitih jedinjenja, ustanovljeno je da ona koja sadrže kateholnu i hinonsku grupu imaju sklonost ka neselektivnoj redoks reaktivnosti, heliranju jona metala i interakciji sa nukleofilnim grupama prisutnim u bočnim lancima proteina. Često je nepoznat pravi mehanizam reakcija ovih jedinjenja, a veliki broj njih u praksi ne uspeva da pokaže teorijski predviđenu aktivnost. Ipak, važno je napomenuti da se među jedinjenjima koja daju lažne pozitivne rezultate pri različitim analizama nalaze mahom hinoni, ali ne i hidrohinoni. Osim toga, poznato je i da jedinjenja koja se strukturno uklapaju u ovu grupu ipak vrlo efikasno interaguju sa biološkim metama, i uveliko se koriste kao lekovi. Takođe, iako avarol sadrži terpenoidnu grupu za koju se

smatra da nije nosilac biološke aktivnosti, to ne znači da nije modulator iste. Ovo je posebno zanimljivo ako se zna da je hidrohionon toksičan, kancerogen i mutagen.<sup>131,132</sup>

## 2.4. Računarske metode

### 2.4.1. Osnove teorijske hemije

Teorijska hemija bavi se proučavanjem strukture i dinamike hemijskih sistema i predviđanjem njihovih termodinamičkih i kinetičkih svojstava primenom kvantne, klasične i statističke mehanike. Onda kada su matematičke metode dovoljno razvijene da se na proučavanje hemijskih procesa mogu primeniti putem računara, teorijska hemija postaje računarska hemija (nazvana još i molekulsko modelovanje)<sup>133</sup>. Molekulsko modelovanje zasniva se na primeni zakona fizike, hemije, kao i kompjuterske tehnologije za proučavanje molekula i struktura koje oni grade. Molekulskim modelovanjem mogu se dobiti informacije o geometriji molekula, energiji molekula i prelaznih stanja, reaktivnosti, izgledu UV-Vis, IC, NMR i EPR spektara posmatranih molekula, načinu interakcije supstrata i enzima, fizičkim svojstvima supstanci i drugim značajnim parametrima.<sup>134</sup> Modeli u matematičkom smislu predstavljaju pojednostavljeni, idealizovani opis datog sistema, u cilju lakšeg izračunavanja i predviđanja njegovih svojstava.<sup>135</sup> Različiti modeli koriste različite aproksimacije. Modele možemo podeliti u dve grupe: klasične i kvantno-hemijske.

Klasični modeli su oni kod kojih se za modelovanje molekulskih sistema koriste principi Njutnovske mehanike. Kod ovih modela, molekuli su aproksimirani kao skup lopti povezanih oprugama. Takav pristup naziva se molekulska mehanika. Aproksimacije primenjene kod molekulsko-mehaničkih modela čine proračune brzim, ali nedovoljno dobro opisuju procese poput formiranja i raskidanja hemijskih veza.<sup>133</sup>

Kvantno-hemijski modeli zasnivaju se na određivanju energije i drugih svojstava molekula rešavanjem nerelativistične, vremenski nezavisne Šredingerove jednačine<sup>136</sup>:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

gde je  $\hat{H}$  hamiltonijan sistema, odnosno operator ukupne energije,  $\Psi$  talasna funkcija sistema, a  $E$  ukupna energija sistema.

Hamiltonijan za sistem koji se sastoji od N elektrona i M jezgara može se zapisati u sledećem obliku<sup>136</sup>:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_n + \hat{V}_{en} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{nn} =$$

$$-\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^N \Delta_i - \sum_{A=1}^M \frac{\hbar^2}{2m_A} \Delta_A - \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A e^2}{r_{iA}} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{e^2}{r_{ij}} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B e^2}{R_{AB}} \quad (2)$$

gde je  $\hat{T}_e$  operator kinetičke energije svih elektrona,  $\hat{T}_n$  operator kinetičke energije svih jezgara,  $\hat{V}_{en}$  Kulonova sila privlačenja elektrona i jezgara,  $\hat{V}_{ee}$  interelektronsko odbijanje,  $\hat{V}_{nn}$  internuklearno odbijanje.  $r_{iA}$  predstavlja rastojanje između i-tog elektrona i A-tog jezgra,  $r_{ij}$  predstavlja rastojanje i-tog i j-tog elektrona,  $R_{AB}$  predstavlja rastojanje između A-tog i B-tog jezgra,  $m_e$  i  $m_A$  predstavljaju mase elektrona i jezgra, a  $Z_A$  i  $Z_B$  su atomski brojevi posmatranih jezgara.

Rešavanjem Šredingerove jednačine za određeni molekul, moguće je dobiti podatke o energiji i talasnoj funkciji koja opisuje taj molekul. Na osnovu talasne funkcije moguće je izračunati raspodelu elektronske gustine, odakle je moguće saznati mnoge korisne informacije, poput polarnosti datog molekula i lokaciji mesta na kojima može doći do interakcije sa nukleofilnim ili elektrofilnim hemijskim vrstama. Ipak, nalaženje egzaktnog rešenja Šredingerove jednačine za hemijski sistem koji ima više od jednog elektrona nije moguće.<sup>137,138</sup> Da bi se ovo prevazišlo, koriste se određene aproksimacije. U zavisnosti od vrste i nivoa upotrebljenih aproksimacija, postoje tri grupe metoda koje se koriste za rešavanje Šredingerove jednačine: *ab initio*, semiempirijske i metode zasnovane na teoriji funkcionala gustine (eng. density functional theory, DFT).<sup>133</sup>

*Ab initio* (lat. od početka, u prenesenom značenju „od prvih principa”) metode zasnivaju se na rešavanju Šredingerove jednačine uz primenu, možda najvažnije, Born-Openhajmerove (Born-Oppenheimer) aproksimacije.<sup>139</sup> Born-Openhajmerova aproksimacija se odnosi na to da se zbog znatno veće mase atomskih jezgara u odnosu na elektrone, ona kreću sporije, pa se može smatrati da se elektroni kreću u polju jezgara koja su trenutno fiksirana u određenim položajima.<sup>140</sup> Time se proračuni pojednostavljaju i ubrzavaju. Najjednostavnija *ab initio* metoda je Hartri-Fokova



(Hartree-Fock) metoda. Njen nedostatak ogleda se u tome što se umesto direktne interakcije između elektrona posmatra kretanje svakog elektrona u usrednjenom polju ostalih elektrona.<sup>137</sup> Iz tog razloga, razvijene su metode koje ove interakcije uzimaju u obzir (post-Hartri-Fokove metode). *Ab initio* metode relativno su „skupe” (spore, zahtevaju više računarskih resursa), ali i znatno preciznije od semiempirijskih metoda.<sup>139</sup>

Semiempirijske metode se, kao i *ab initio* metode, zasnivaju na rešavanju Šredingerove jednačine.<sup>139</sup> Međutim, semiempirijske metode koriste veći broj aproksimacija. Između ostalog, računanje pojedinih vrlo složenih integrala izbegnuto je uvođenjem parametara koji su određeni upoređivanjem odabranih izračunatih svojstava sa eksperimentalnim (empirijskim) vrednostima.<sup>138</sup> Te vrednosti najčešće su termohemijske i spektroskopske prirode. Ovaj postupak se naziva parametrizacija. Na taj način, postiže se da su semiempirijski proračuni „jeftiniji” od *ab initio*, ali još uvek „skuplji” od molekulske-mehaničkih.<sup>139</sup> Nedostatak semiempirijskih metoda je u njihovoj otežanoj primenljivosti kod novih sistema, koji prethodno nisu parametrizovani.

Odabir odgovarajuće metode za proučavanje hemijskih vrsta zavisi u mnogome od njihove prirode, željenog nivoa aproksimacija i brzine proračuna, kao i potrebnog kvaliteta dobijenih rezultata.<sup>136</sup> *Ab initio* i, brže, DFT metode korisne su za proučavanje potpuno novih sistema, ukoliko oni nisu previše veliki. Semiempirijske metode, koje su brže od DFT, mogu se primeniti i na veće sisteme.<sup>137</sup> Molekulska mehanika može se upotrebiti za proučavanje znatno složenijih sistema.<sup>133</sup> Međutim, ona ne daje informacije o elektronskim svojstvima.

Zbog značaja DFT metoda za izradu ove teze, one će biti detaljnije opisane.

#### **2.4.2. Teorija funkcionala gustine**

Teorija funkcionala gustine (DFT) se, kao i *ab initio* i semiempirijske metode, zasniva na rešavanju Šredingerove jednačine. Međutim, za razliku od metoda navedenih u prethodnom poglavlju pomoću kojih se konstruiše i analizira talasna funkcija, pomoću teorije funkcionala gustine se analizira elektronska gustina sistema.<sup>141</sup>

DFT se, između ostalog, zasniva na Hohenberg-Konovoj (Hohenberg-Kohn) teoremi.<sup>142</sup> Prema njoj, elektronska energija osnovnog stanja višeelektronskih sistema u potpunosti je određena elektronskom gustinom. Drugim rečima, talasna funkcija, koja je za sistem od N elektrona funkcija 4N koordinata (3N prostornih i N spinskih), može se zameniti elektronskom gustinom, koja je funkcija samo tri prostorne koordinate,  $\rho_0(x,y,z)$ .<sup>143,144</sup> Na osnovu elektronske gustine se izračunavaju ostala svojstva atoma i molekula. Za datu funkciju  $\rho_0(x,y,z)$  moguće je izračunati bilo koje svojstvo osnovnog stanja, poput energije ( $E_0$ ):<sup>144</sup>

$$\rho_0(x,y,z) \rightarrow E_0 \quad (3)$$

Iz ovog izraza vidi se da je  $E_0$  funkcional  $\rho_0(x,y,z)$ . Funkcional je obrazac putem kog se neka funkcija transformiše u broj. Prema prvoj Hohenberg-Konovoj teoremi, bilo koje svojstvo molekula u osnovnom stanju je funkcional elektronske gustine u osnovnom stanju.<sup>142</sup> Međutim, iako prema teoremi funkcional postoji, ona ne objašnjava kog je on oblika.<sup>145</sup>

Prema drugoj Hohenberg-Konovoj teoremi, bilo koja navedena funkcija elektronske gustine daće vrednost energije koja je veća ili jednaka pravoj vrednosti energije sistema u osnovnom stanju.<sup>142</sup> Međutim, ta vrednost bi bila jednaka stvarnoj vrednosti jedino u slučaju da je poznat egzaktan oblik funkcionala elektronske gustine. Upravo nepostojanje egzaktnog oblika funkcionala dovelo je do razvoja različitih metoda kojima se on aproksimira. Do sada razvijeni funkcionali su zasnovani na aproksimaciji lokalne elektronske gustine (LDA), lokalne gustine elektrona i spina elektrona (LSDA), lokalne gustine elektrona i njenog izvoda (GGA), lokalne gustine elektrona, njenog izvoda i Laplasijana (meta-GGA), a postoje i hibridni funkcionali.<sup>144</sup>

DFT proračuni su brži od *ab initio*, ali uglavnom sporiji od semiempirijskih.<sup>138</sup> DFT metode su relativno novijeg datuma. Najraniju primenu imale su 1980-ih, dok su *ab initio* i semiempirijske metode razvijane još 1960-ih godina.

### 2.4.3. Bazisni skupovi

Postulat na kome počiva linearna kombinacija atomskih orbitala (linear combination of atomic orbitals, LCAO) jeste da se molekulske orbitale mogu formirati kombinovanjem jednostavnijih funkcija (atomskih orbitala)<sup>133,136</sup>. Ove funkcije nazivaju

se bazisne funkcije, i formiraju bazisni skup. LCAO se za slučaj dve atomske orbitale može zapisati kao<sup>133</sup>:

$$\psi = c_1\phi_1 + c_2\phi_2 \quad (4)$$

gde je  $\psi$  talasna funkcija koja opisuje molekulsku orbitalu,  $\phi_1$  i  $\phi_2$  su bazisne funkcije, a  $c_1$  i  $c_2$  su koeficijenti čijim prilagođavanjem se dobija što bolja  $\psi$ . Bazisne funkcije su centrirane na atomskim jezgrima (mada ne nužno), i opisuju raspodelu elektrona oko jezgara, pa je njihovim kombinovanjem moguće opisati raspodelu elektrona u okviru celog molekula. Kao bazisne funkcije se najčešće koriste Slejterove i Gausove funkcije.<sup>146</sup> Orbitale nastale linearnom kombinacijom Gausovih funkcija nazivaju se kontrahovane orbitale. One su uvedene u cilju boljeg aproksimiranja izgleda realne talasne funkcije. Po ovim funkcijama je programski paket Gaussian dobio naziv.<sup>147</sup> Funkcije od kojih se kontrahovane Gausove orbitale sastoje nazivaju se primitivne funkcije.

Bazisni skup sastavljen od minimalnog broja orbitala potrebnih da se opišu svi elektroni u atomu naziva se minimalni bazisni skup.<sup>148</sup> Međutim, pošto pri obrazovanju molekula dolazi do promene oblika i veličine orbitala, minimalni bazisni skup ne može adekvatno opisati molekule, jer je definisan za izolovane atome. U cilju prevazilaženja ovog problema, koristi se kontrahovana orbitala koja sadrži više funkcija različite veličine. Takvi bazisni skupovi nazivaju se dvostruki, trostruki i četverostruki zeta bazisni skupovi. Kod njih svaka kontrahovana orbitala predstavlja kombinaciju dve, tri odnosno četiri primitivne funkcije.<sup>149</sup>

Što je veći bazisni skup upotrebljen, to je talasna funkcija fleksibilnija, a time i rezultati tačniji – do određene granice. Upotrebom bazisnog skupa odgovarajuće veličine, dobijaju se najkvalitetniji mogući rezultati za posmatranu metodu.<sup>150</sup> Nakon toga, svako dodatno povećanje bazisnog skupa neće imati daljeg uticaja na kvalitet rezultata.

Znajući da pri formiranju molekula do najizraženijih promena dolazi kod orbitala koje opisuju valentne elektrone, dok one orbitale koje opisuju unutrašnje elektrone imaju isti oblik koji bi imale kod izolovanih atoma, razvijen je bazisni skup podeljene valentnosti (split-valence basis set).<sup>148</sup> Kod ovog bazisnog skupa, unutrašnji

elektroni prikazuju se pomoću jedne, a valentni elektroni pomoću više kontrahovanih funkcija. Ovi bazisni skupovi nazivaju se Poplovi, po Džonu Poplu (John Pople), koji je započeo njihov razvoj.<sup>147</sup>

Polarizacione funkcije predstavljaju funkcije sa većim kvantnim brojem od onog koji odgovara valentnim elektronima, čime se menja oblik orbitala.<sup>147</sup> Difuzne funkcije omogućuju promenu veličine orbitala i one su neophodne za precizno opisivanje anjona i slabih veza (poput vodonične veze). Kod Poplovih bazisnih skupova, difuzne bazisne funkcije definišu se sa „+” (kada se set difuznih s i p orbitala dodaje svim atomima izuzev atomima vodonika), odnosno „++” (kada se uz prethodni slučaj dodaju još i difuzne s funkcije atomima vodonika).<sup>136,137</sup>

#### 2.4.4. Solvacioni modeli

Procena uticaja okoline, poput rastvarača, na sistem od interesa je važan aspekt računarske hemije. Odvijanje hemijskih reakcija u kojima se javljaju naelektrisani intermedijeri zavisi od prisutnog rastvarača.<sup>151</sup> Modeli kojima se uzima u obzir prisustvo rastvarača mogu se podeliti na dva tipa: eksplicitne – one koji rastvarač opisuju na nivou individualnih molekula, i implicitne – one koji ga tretiraju kao kontinuum. Moguće su i kombinacije ovih metoda, tako da se u prvoj (eventualno i drugoj) solvacionoj ljusci molekuli rastvarača tretiraju individualno, a iza toga kao kontinuum.<sup>136</sup>

Kod eksplicitnih solvacionih modela, slobodna energija solvatacije računa se simuliranjem interakcija između rastvarača i rastvorene supstance. Ovi modeli su obično računarski zahtevniji od implicitnih modela, ali pružaju više detalja i precizniji su.

Modeli kontinuuma posmatraju rastvarač kao uniformni polarizabilni medijum sa dielektričnom konstantom  $\epsilon$ , pri čemu je rastvorena supstanca (jedan ili nekoliko molekula) postavljen u šupljinu pogodnog oblika i veličine u takvom medijumu.<sup>152,153</sup> Kod ovih modela, slobodna energija solvatacije ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) opisana je izrazom<sup>138</sup>:

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{cav}} + \Delta G_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{elec}} \quad (5)$$

gde je  $\Delta G_{cav}$  energija potrebna za formiranje šupljine u koju se smešta rastvorena supstanca,  $\Delta G_{disp}$  energija Van der Valsove interakcije između rastvarača i rastvorene supstance, a  $\Delta G_{elec}$  elektrostatička komponenta, pošto polarizacija između rastvarača i rastvorene supstance indukuje redistribuciju naelektrisanja.

Šupljina u koju se smešta rastvorak u najjednostavnijim slučajevima može imati oblik sfere ili elipsoida, ali može imati i oblik koji odgovara obliku molekula rastvorene supstance. Iako ovakav pristup bolje opisuje pravo stanje sistema, znatno je skuplji za proračune.

Jedan od nedostataka modela kontinuuma na koji je potrebno računati, pri pravljenu kompromisa između kvaliteta rezultata i zahtevnosti proračuna, jeste to da nisu u mogućnosti da opišu intermolekulske interakcije kratkog dometa, kao što su vodonične veze. Ovaj nedostatak prevazilazi se najčešće eksplicitnim dodavanjem molekula rastvarača, posebno pri modelovanju jonskih sistema.<sup>154</sup>

#### **2.4.5. Kvantna teorija atoma u molekulima (QTAIM)**

Godine 1939. objavljeno je delo Lajnusa Polinga (Linus Pauling) „Priroda hemijske veze”, u kom su opisani različiti koncepti interakcije između atoma.<sup>155</sup> Ovo delo unelo je revoluciju u izučavanje načina na koji se atomi udružuju formirajući molekule. Danas se koriste različiti algoritmi za opisivanje čitavog niza različitih parametara koji se tiču strukture molekula. Jedan od ovakvih, revolucionarnih pristupa u izučavanju strukture molekula primenom kvantne mehanike razvijen je od strane Ričarda Badera (Richard Bader) i njegovih saradnika, pod nazivom kvantna teorija atoma u molekulima (Quantum Theory of Atoms in Molecules, QTAIM).<sup>156</sup> Bader je tokom razvoja QTAIM inicijalna istraživanja vršio primenom *ab initio* metoda, pošto DFT metode tada nisu bile dovoljno razvijene.<sup>157</sup> Danas se za potrebe QTAIM analiza najčešće koriste DFT metode, zbog toga što su ovakva izračunavanja jeftinija, a u pojedinim slučajevima kvalitetnije (realnije) opisuju posmatrane sisteme.<sup>158</sup>

DFT i QTAIM dele istu osnovu – obe se zasnivaju na elektronskoj gustini. Za razliku od talasne funkcije, koja je za sistem od  $N$  elektrona funkcija  $4N$  koordinata, elektronska gustina je jednostavnija za rukovanje, s obzirom da je ona funkcija samo tri

prostorne koordinate.<sup>147</sup> Sem toga, elektronska gustina je parametar koji je moguće eksperimentalno odrediti na osnovu spektroskopske analize X-zracima.<sup>157,159</sup>

QTAIM pruža precizan matematički opis značajnih hemijskih pojmova poput hemijske veze i strukture molekula. Ujedno, pomoću QTAIM mogu se odrediti i različita svojstva svakog pojedinačnog atoma u molekulu (naelektrisanje, zapremina, dipolni momenat i drugo). Važno je istaći da QTAIM ima primenu u različitim oblastima, od fizike čvrstog stanja do biohemije i razvoja lekova.<sup>160</sup>

Elektronska gustina je kontinualna nenegativna funkcija koju je moguće definisati u svakoj tački prostora, i predstavlja verovatnoću nalaženja elektrona u posmatranoj tački. Analizom raspodele elektronske gustine, trodimenzioni prostor koji neki molekul zauzima moguće je podeliti na zone u kojima se javljaju lokalni maksimumi, koji odgovaraju položaju atomskih jezgara. Te zone nazivaju se atomski baseni,  $\Omega$ .<sup>157,160</sup> Granice atomskih basena određene su nultom vrednošću fluksa gradijenta elektronske gustine, odnosno uslovom:

$$\nabla\rho(r)\cdot n(r)=0 \quad (6)$$

koji važi za sve tačke površi, gde je  $\nabla\rho(r)$  gradijent elektronske gustine, a  $n(r)$  jedinični vektor normalan na površ. Jedini izuzetak je linija koja spaja dva maksimuma elektronske gustine, a koja se naziva linija veze.<sup>161,162</sup>

Izračunavanjem prvog izvoda elektronske gustine, dobija se set takozvanih „kritičnih tačaka”, u kojima prvi izvod ima nultu vrednost:

$$\nabla\rho(\vec{r}_c)\equiv\left(\frac{\partial\rho}{\partial x}, \frac{\partial\rho}{\partial y}, \frac{\partial\rho}{\partial z}\right)_{\vec{r}_c} = \vec{0} \quad (7)$$

Kritična tačka može biti lokalni minimum, prevojna tačka ili lokalni maksimum. Preciznija karakterizacija vrši se na osnovu analize drugog izvoda elektronske gustine u svakoj kritičnoj tački. Svi drugi izvodi gustine mogu se objediniti u takozvanoj matrici Hesijana:

$$H(\vec{r}) \equiv \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial x \partial y} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial x \partial z} \\ \frac{\partial^2 \rho}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y^2} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y \partial z} \\ \frac{\partial^2 \rho}{\partial z \partial x} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z \partial y} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z^2} \end{pmatrix}_{\vec{r}} \quad (8)$$

Dijagonalizacijom ove matrice, dobija se:

$$A(\vec{r}) = U^{-1} H(\vec{r}) U = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{pmatrix} \quad (9)$$

gde su  $\lambda_1 \leq \lambda_2 \leq \lambda_3$  tri svojstvene vrednosti matrice Hesijana.<sup>160</sup>

Svaka kritična tačka obeležava se kao  $(\omega, \sigma)$ , pri čemu se  $\omega$  naziva rang, a  $\sigma$  potpis. Rang je broj nenulih zakrivljenosti elektronske gustine u kritičnoj tački, a potpis je algebarski zbir predznaka takvih zakrivljenosti. Ukupno postoje četiri vrste kritičnih tačaka:

(3,-3) – Kritična tačka jezgra<sup>160,161</sup> (od eng. nuclear critical point, NCP) – U ovoj kritičnoj tački sve zakrivljenosti imaju negativnu vrednost, pa je u njoj elektronska gustina maksimalna. Ova kritična tačka odgovara položaju jezgra.

(3,-1) – Kritična tačka veze<sup>160,161</sup> (od eng. bond critical point, BCP) – U ovoj kritičnoj tački Hesijan ima dve negativne i jednu pozitivnu zakrivljenost, i u njoj je vrednost gradijenta elektronske gustine,  $\rho$ , jednaka nuli. Ova kritična tačka nalazi se između dve kritične tačke jezgara. Postojanje kritične tačke veze ukazuje na prisustvo hemijske veze između atoma.<sup>163</sup>

(3,+1) – Kritična tačka prstena<sup>160,161</sup> (od eng. ring critical point, RCP) – Dve pozitivne i jedna negativna zakrivljenost odgovaraju ovoj kritičnoj tački. Njeno postojanje ukazuje na prisustvo strukture prstena u ravni koju formiraju pozitivne zakrivljenosti. Kod planarnih molekula, kritična tačka prstena odgovara minimumu elektronske gustine unutar prstena.

(3,+3) – Kritična tačka kaveza<sup>160,161</sup> (od eng. cage critical point, CCP) – Sve tri zakrivljenosti kod ove kritične tačke imaju pozitivan predznak. Ova kritična tačka najčešće se nalazi u centru kaveza koji formiraju okolni atomi.

Linija veze može se definisati kao linija koja spaja dve kritične tačke jezgra kroz kritičnu tačku veze. Ipak, njeno postojanje ne znači da se nužno između posmatranih atoma uspostavlja hemijska veza, već da se javljaju vezivne interakcije.<sup>163,164</sup>

Broj različitih kritičnih tačaka koje mogu da postoje u jednom sistemu je takav da zadovoljava Poenkare-Hofovu (Poincaré-Hopf) relaciju<sup>160,163</sup>:

$$n_{\text{NCP}} - n_{\text{BCP}} + n_{\text{RCP}} - n_{\text{CCP}} = 1 \quad (10)$$

Drugi izvod funkcije elektronske gustine naziva se Laplasijan gustine, i dobija se kao:

$$\nabla \cdot \nabla \rho(r) = \nabla^2 \rho(r) = \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial z^2} \quad (11)$$

Značaj Laplasijana elektronske gustine ogleda se u tome da je na osnovu njegovog predznaka moguće odrediti lokalno povećanje ili smanjenje naelektrisanja u odnosu na njegovo okruženje. Ukoliko Laplasijan ima pozitivan predznak, to ukazuje da je gustina naelektrisanja lokalno smanjena, odnosno reč je o interakciji sistema sa zatvorenim ljuskama. U slučaju da je predznak Laplasijana negativan, tada je naelektrisanje lokalno povećano, što ukazuje na postojanje kovalentne veze.

U kritičnoj tački veze, Laplasijan predstavlja zbir tri zakrivljenosti, pri čemu su dve koje su normalne na liniju veze ( $\lambda_1$  i  $\lambda_2$ ) negativne, a treća koja leži na liniji veze ( $\lambda_3$ ) pozitivna. Negativne zakrivljenosti ukazuju na to u kojoj meri je skoncentrisano naelektrisanje duž linije veze, a pozitivna ukazuje na to u kojoj meri je naelektrisanje skoncentrisano u okviru pojedinačnih atoma.

Kod kovalentne veze (odnosno takozvanih „deljenih interakcija”) dominiraju dve negativne zakrivljenosti usled koncentrisanja elektronske gustine duž linije veze, pa je  $\nabla^2 \rho < 0$ . Pošto  $\lambda_1$  i  $\lambda_2$  imaju velike vrednosti, elektronska gustina ima veliku vrednost. Nasuprot tome, kod jonske i vodonične veze, kao i van der Valsovih interakcija (van der Walls), u regionu kontakta dva atoma dolazi do smanjenja elektronske gustine, pa je  $\nabla^2 \rho$



$> 0$ . Kod ovakvog tipa interakcija vrednost elektronske gustine je mala, i ona je koncentrisana na samim atomima. Na osnovu ovih zaključaka, predznak Laplasijana elektronske gustine mogao bi se upotrebiti za karakterizaciju tipa hemijske veze. Na primer, ukoliko je vrednost Laplasijana pozitivna u nekoj BCP u slučaju vodonične veze, u toj vezi su izraženije elektrostatičke interakcije, dok negativna vrednost Laplasijana upućuje na izraženiju kovalentnu prirodu te veze.<sup>165</sup> Međutim, ovo se mora uzeti sa izvesnom rezervom. Naime, kod izrazito polarnih veza, kao što su veze atoma ugljenika sa atomima F, O, N, Laplasijan može imati oba znaka.<sup>163</sup>

Naelektrisanje atoma predstavlja se kao:

$$q(\Omega) = Z_{\Omega} - N_{\Omega} \quad (12)$$

gde je  $Z_{\Omega}$  naelektrisanje jezgra atoma, dok je  $N_{\Omega}$  ukupna populacija elektrona u atomu kao delu posmatranog molekula:

$$N_{\Omega} = \int_{\Omega} \rho(r) dr \quad (13)$$

Indirektni eksperimentalni dokazi potvrđuju fizičku prirodu naelektrisanja i elektronske populacije definisane pomoću QTAIM metode.<sup>163</sup> Naelektrisanje atoma je merljiv parametar, koji, zajedno sa svojom promenom, doprinosi različitim merljivim veličinama: dipolnim momentima molekula, njegovoj polarizabilnosti, intenzitetima infracrvene i ramanske apsorpcije i drugim. Primenom uslova nultog fluksa na raspodelu naelektrisanja u molekulu, on se može izdeliti u segmente koji se međusobno ne preklapaju. Ti segmenti su zapravo atomi.<sup>162</sup>

Eliptičnost veze,  $\varepsilon$ , predstavlja još jednu značajnu karakteristiku veze, pošto pruža informaciju o anizotropiji.<sup>166,167</sup> Eliptičnost veze predstavlja meru koncentrisanja gustine naelektrisanja u ravni u kojoj se nalazi linija veze. Matematički, eliptičnost se može zapisati kao:

$$\varepsilon = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} - 1 \quad (14)$$

pri čemu su  $\lambda_1$  i  $\lambda_2$  svojstvene vrednosti Hesijana elektronske gustine negativnog predznaka, tako da je  $\lambda_1 < \lambda_2 < 0 < \lambda_3$ . Pošto su  $\lambda_{1/2}$  povezani sa nagomilavanjem

negativnog naelektrisanja u smeru normalnom na liniju veze, male vrednosti eliptičnosti karakteristične su za  $\sigma$  vezu. Veće vrednosti  $\varepsilon$  ukazuju na pojavu rasplinjavanja elektronskog oblaka, što se pripisuje  $\pi$  karakteru veze. Ova pojava se može odnositi na slobodni elektronski par akceptora i O...H vodoničnu vezu. Drugim rečima, kada je  $\lambda_1 = \lambda_2$ , tada je  $\varepsilon=0$ , pa je veza cilindrično simetrična.<sup>163,164,168</sup> Primer su C – C veza u molekulu etana ili trostruka veza u molekulu etina. Može se reći da je eliptičnost mera  $\pi$ -karaktera vezivanja, sve do pojave dvostruke veze, kada eliptičnost dostiže maksimum. U smeru od dvostruke ka trostrukoj vezi trend je obrnut, pa se vrednost eliptičnosti smanjuje sa porastom reda veze. Do toga dolazi jer kada je red veze 3, ona ponovo poprima cilindričnu simetriju. Na osnovu pomenutih svojstava, eliptičnost u kritičnoj tački veze može se definisati kao mera anizotropije krive elektronske gustine u smerovima normalnim na vezu (nulta vrednost eliptičnosti ukazuje na odsustvo anizotropije). Eliptičnost predstavlja distorziju koju hemijska veza trpi težeći da zauzme cilindrični oblik.<sup>168</sup> Tipičan primer promene eliptičnosti u zavisnosti od tipa hemijske veze jeste eliptičnost u kritičnoj tački C-C veze u seriji etan ( $\varepsilon=0,00$ , jednostruka veza) eten ( $\varepsilon=0,33$ , dvostruka veza) etin ( $\varepsilon=0,00$ , trostruka veza). Eliptičnost aromatične veze iznosi približno 0,23 kod benzena. Od samog početka razvoja QTAIM, eliptičnost se upotrebljava za kvantifikovanje udela dvostruke veze u molekulima. Analizom eliptičnosti u kritičnoj tački veze, moguće je razlikovati jednostruke, izolovane dvostruke, kao i različite veze sa delimično dvostrukim karakterom. Ovaj parametar moguće je u izvesnoj meri upotrebiti i za određivanje konjugovanosti i aromatičnosti. Zanimljivo je da sa porastom dužine veze, eliptičnost opada nelinearno, prateći smanjenje reda veze. Na sličan način eliptičnost je korelisana i sa delokalizacijom elektrona.<sup>159</sup>

Red veze predstavlja broj elektronskih parova koje dele dva atoma između kojih se posmatrana veza uspostavlja. Intenzitet razmene elektrona između basena atoma A i basena atoma B naziva se indeks delokalizacije,  $DI(A,B)$ , i matematički se definiše kao:

$$DI(A,B) = 2 | F^\alpha(A,B) | + 2 | F^\beta(A,B) | \quad (15)$$

gde je  $F(A,B)$  Fermijeva (Enrico Fermi) korelacija za elektrone različitog spina ( $\alpha$  ili  $\beta$ ), kojom se isključuje postojanje dva elektrona paralelnog spina u istoj tački prostora.<sup>163</sup>

Delokalizacioni indeksi mogu se izračunati za bilo koja dva atoma, bez obzira da li su oni direktno vezani ili ne. Dok raspodela elektrona u okviru jednog atomskog basena daje informacije o naelektrisanju atoma i polarnosti veze koju takav atom gradi,  $\delta(A,B)$  izračunata za dva direktno vezana atoma predstavlja meru reda veze, ukoliko su elektronski parovi među njima podjednako raspodeljeni.<sup>169</sup> Pošto su delokalizacioni indeksi definisani na osnovu raspodele elektronskih parova, njihove vrednosti ne mogu se dobiti iz eksperimenata (difrakcija X-zraka), za razliku od raspodele elektronske gustine.<sup>163</sup>

Zapremina atoma definisana je kao prostor unutar izopovrši koja se odnosi na elektronsku gustinu određene vrednosti, najčešće se za vrednost  $\rho(r) = 0,001$  au. Postoje dva razloga za odabir upravo ove vrednosti. Najpre, ona najpribližnije odgovara eksperimentalnim van der Valsovim zapreminama u gasovitoj fazi. Takođe, ova vrednost obuhvata više od 99% elektronske populacije celog molekula.

Električni dipolni momenat molekula može se predstaviti izrazom:

$$\mu = - \int [r-R_0] \rho(r) dr + \sum_{\Omega=1}^{Na} Z_{\Omega} [R_{\Omega}-R_0] \quad (16)$$

gde je  $\rho(r)$  elektronska gustina u tački  $r$  realnog prostora,  $Z_{\Omega}$  je naelektrisanje jezgra atoma  $\Omega$ , a  $R_0$  je arbitarni centar koordinatnog sistema za posmatrani molekul.<sup>163</sup> Za neutralne molekule,  $\mu$  ne zavisi od  $R_0$ . Primenom QTAIM, moguće je podeliti ukupan dipolni momenat molekula u pojedinačne doprinose svakog atoma koji čine posmatrani molekul.

Dipolni moment svakog molekula određen je prenosom naelektrisanja i polarizacijom atoma. Član koji potiče od prenosa naelektrisanja predstavljen je izrazom:

$$\mu_c = \sum_{\Omega} q(\Omega) X_{\Omega} \quad (17)$$

gde je  $X_{\Omega}$  vektor položaja atomskog jezgra u odnosu na neku arbitrarnu tačku.<sup>170</sup>

Polarizacija atoma ( $\mu(\Omega)$ ), je vektor sastavljen iz sledećih komponentata:

$$\mu(\Omega) = \begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -e \int_{\Omega} x\rho(r)dr \\ -e \int_{\Omega} y\rho(r)dr \\ -e \int_{\Omega} z\rho(r)dr \end{pmatrix} \equiv -e \int_{\Omega} r_{\Omega}\rho(r)dr \quad (18)$$

intenziteta:

$$|\mu(\Omega)| = \sqrt{\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2} \quad (19)$$

pri čemu se početak vektora  $r_{\Omega}$  nalazi u jezgri atoma  $\Omega$ .

#### 2.4.6. Mehanizmi prenosa atoma vodonika

Kako pretpostavljeni mehanizam antiradikalne aktivnosti avarola prema različitim slobodnoradikalnim vrstama uključuje prenos atoma vodonika između ovih vrsta i hidrohinskog segmenta avarola, potrebno je razmotriti po kom mehanizmu do tog prenosa dolazi. Primenom QTAIM analize moguće je doći do informacija kojima se stiže uvid u mehanizam prenosa atoma vodonika.

Pošto se atom vodonika sastoji iz dve celine, protona i elektrona, transfer ovog atoma može se odvijati putem nekoliko mehanizama.<sup>171-174</sup> Proton i elektron mogu biti preneti istovremeno ili svaki zasebno, a molekuli rastvarača takođe mogu učestvovati u procesu prenosa. Svi ovi mehanizmi nazivaju se formalnim prenosom vodonika (formal hydrogen transfer, FHT).<sup>171</sup> U zavisnosti od broja koraka koje ovaj proces uključuje, razlikuju se dva opšta tipa mehanizama prenosa atoma vodonika<sup>171-174</sup>:

*Prenos atoma vodonika u jednom koraku:* Ako se prenos atoma vodonika dešava u jednom elementarnom koraku, radi se o prenosu atoma vodonika (hydrogen atom transfer, HAT), kada se proton i elektron prenose sa jedne na drugu hemijsku vrstu kao jedna celina, ili spregnuti prenos protona i elektrona (od eng. proton-coupled electron transfer, PCET), ako se kreću zasebno. U ovom slučaju, kretanje protona može prethoditi kretanju elektrona, elektron može biti prenet pre protona, ili se prenos može desiti istovremeno.

*Zaseban prenos protona i elektrona:* Zaseban transfer protona i elektrona ne mora se dešavati u jednom elementarnom koraku, već može uključivati i formiranje intermedijera. Zavisno od redosleda prenosa čestica, moguće je razlikovati dva mehanizma: sekvencijalni proton-elektron prenos (od eng. proton-electron sequential transfer, PEST), i sekvencijalni elektron-proton prenos (od eng. electron-proton sequential transfer, EPST). U slučaju PEST-a, dolazi do formiranja predreakcionog kompleksa među reaktantima. U narednom koraku dolazi do prenosa protona i formiranja intermedijera. Konačno, u trećem koraku dolazi do prenosa elektrona i nastanka proizvoda. U slučaju da do formiranja intermedijera dođe usled prenosa elektrona, a u narednom koraku dođe do prenosa protona, ovaj proces naziva se sekvencijalni elektron-proton prenos.

Najsloženiji mehanizmi prenosa atoma vodonika uključuju molekule rastvarača, i poznati su kao rastvaračem potpomognuti prenos protona (od eng. solvent assisted proton transfer, SAPT). Ovde najpre dolazi do prenosa protona sa molekula donora na molekul rastvarača (ovaj korak naziva se gubitak protona). Donor bez protona zapravo predstavlja još bolji donor elektrona. Zavisno od toga koja čestica prva stiže do akceptora, postoje dve mogućnosti. Prva mogućnost je da elektron prelazi sa donora na akceptor, što je praćeno prelaskom protona sa molekula rastvarača na akceptor. Ovaj proces poznat je kao sekvencijalni gubitak protona i transfer elektrona (od eng. sequential proton-loss electron-transfer, SPLET). Druga mogućnost postoji ukoliko je afinitet akceptora za prijem elektrona mali: najpre proton sa molekula rastvarača prelazi na akceptor, pri čemu nastaje radikal-katjon (bolji akceptor elektrona), nakon čega na njega prelazi elektron. Ovaj mehanizam poznat je kao sekvencijalni zahvat protona i prenos elektrona (od eng. sequential proton-gain electron-transfer, SPGET).

Pošto se mnogi FHT procesi odigravaju u jednom elementarnom koraku, značajna pažnja posvećena je razlikovanju HAT i PCET mehanizama.<sup>175-179</sup> Uticaj supstituenata na reakcije serije supstituisanih fenola sa hidroperoksil radikalom u gasovitoj fazi proučavani su primenom QTAIM analize.<sup>180</sup> Na osnovu promena u svojstvima atoma idući od predreakcionog kompleksa ka prelaznom stanju (smanjenje vrednosti zapremine atoma vodonika, elektronske gustine i dipolnog momenta), zaključeno je da se apstrakcija atoma vodonika odvija putem PCET mehanizma. Zanimljiva je i reakcija hvatanja hidroperoksil radikala pomoću fenola i toluena.<sup>181</sup>

Osим što je ustanovljeno da reakciju sa toluenom karakteriše visoka energijska barijera, pokazano je i da neki radikali mogu učestvovati u različitim tipovima mehanizama, (HAT ili PCET) zavisno od prirode antioksidansa. Za *trans*-resveratrol, ustanovljeno je da se transfer atoma vodonika na hidrosilni radikal predominantno odvija putem SEPT mehanizma (ovo je primer reakcije koja se odvija u više koraka), iako dolazi i do pojave drugih mehanizama prenosa.<sup>182</sup>

Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti velikog broja fenolnih jedinjenja, pod pretpostavkom da u ovim reakcijama dolazi do apstrakcije vodonika, ustanovljeno je da su među najreaktivnijim molekulima oni sa hidrohinskim strukturnim motivom.<sup>183</sup> Teorijska analiza antiradikalske aktivnosti hidrohina koja je usledila pretežno se temeljila na proučavanju struktura koje se odnose na stacionarna stanja.<sup>180</sup> Međutim, pojedinosti još uvek nisu potpuno razjašnjene. Na primer, iako je analizom reaktanata i prelaznog stanja moguće razlikovati HAT i PCET mehanizam, ovaj pristup ne objašnjava da li kod PCET mehanizma kretanje protona dovodi do prelaska elektrona, ili je obrnut slučaj. Pregledom literature, stiče se utisak do sada praktično nije vršena detaljna analiza hemijskih transformacija do kojih pri ovim reakcijama dolazi duž čitavog reakcionog puta, izuzev analize lokalne elektrofilnosti.<sup>184</sup> Proučavanje promena u elektronskoj gustini dalo bi detaljniji uvid u mehanizam prenosa naelektrisanja, što je od posebnog značaja za razumevanje antiradikalske aktivnosti derivate hidrohina. Iz tog razloga, u istraživanju koje je predmet izučavanja ove doktorske disertacije, biće analizirana antiradikalska svojstva hidrohina (HQ) u reakciji sa hidrosilnim i hidroperoksilnim radikalom, sa posebnim osvrtom na tri ključna atoma – donora i akceptora vodonika, kao i vodonika koji učestvuje u ovom prenosu. Istraživanje će se zasnivati na proučavanju promena u odabranim svojstvima duž puta minimalne energije.

## **2.5. Elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija**

### **2.5.1. Opšta teorija elektronske paramagnetne rezonantne spektroskopije**

Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR), poznata i pod nazivom elektronska spinska rezonancija (ESR), ili ređe kao elektronska magnetna rezonancija

(EMR), važna je spektroskopska metoda za izučavanje paramagnetnih materijala, odnosno onih koji sadrže nesparene elektrone. Po svom konceptu, EPR veoma je slična nuklearnoj magnetnoj rezonanciji (NMR), poznatijoj metodi u širim krugovima. Obe metode zasnivaju se na interakciji između elektromagnetnog zračenja i magnetnih momenata, s tim što kod EPR-a magnetni momenti potiču od elektrona.<sup>20,185</sup>

EPR se zasniva na merenju apsorpcije mikrotalasnog zračenja koja odgovara energijskim prelazima nesparenog elektrona između različitih spinskih energijskih nivoa kada se on izloži dejstvu magnetnog polja. Na ovaj način mogu se dobiti značajne strukturne i dinamičke informacije (kinetika) posmatranog sistema, bez direktnog uticaja na sam uzorak ili tok reakcije.<sup>186</sup>

Razvoj EPR tehnike započeo je 1921. godine, kada su nemački fizičari Verne Gerlah i Oto Štern emitovali snop atoma srebra kroz magnetno polje, i uočili da on daje jednu traku na staklenom zastoru, a da sa povećanjem intenziteta polja ta traka biva sve šira, sve dok se ne podeli na dva dela.<sup>187</sup> Međutim, teorijski osnovi ove pojave tada nisu bili dovoljno poznati. Pravi zamah u razvoju ove tehnike dogodio se krajem drugog svetskog rata, nakon što je odgovarajuća mikrotalasna aparatura napravljena od delova opreme za radare. Prvi EPR spektar snimio je 1944. sovjetski fizičar Jevgenij Zavojskij (Евгений Завойский), proučavajući magnetne osobine različitih neorganskih soli.<sup>188,189</sup> Tek oko godinu dana kasnije snimljen je prvi NMR signal. Ipak, dalji razvoj EPR tehnike teкао je sporo, zbog visoke cene aparature i nedostatka adekvatne elektronske opreme.<sup>189</sup>

EPR je tehnika koja je dugo bila manje poznata naučnicima, mahom zbog nedostatka EPR-aktivnog materijala. Molekuli u prirodi su retko paramagnetici, zbog toga što je građenje hemijske veze praćeno sparivanjem elektrona, tako da je rezultujući spin celog molekula jednak nuli. Mali broj prirodnih paramagnetika je ujedno najveća mana, ali i najveća prednost EPR tehnike. S jedne strane, ova tehnika ograničena je na nekoliko paramagnetnih molekula, radikala i kompleksa prelaznih metala, pa je često potrebno veštački proizvesti hemijske vrste sa nesparenim elektronima (spinski obeleživači i spinske probe). S druge strane, ovakva selektivnost predstavlja prednost pri izučavanju kompleksnih sistema, pošto mali broj supstanci može dati EPR signal, te nema pozadinskih signala.<sup>190,191</sup>

Kod većine hemijskih vrsta, elektroni se javljaju u parovima, tako da je ukupni magnetni momenat jednak nuli. Međutim, paramagnetni molekuli imaju takvu elektronsku strukturu da poseduju elektron koji nema partnera suprotnog spina. Ukoliko postoji nesporeni elektron, njegovo ugaono kretanje generiše magnetno polje, tako da se isti ponaša kao magnet, odnosno magnetni dipol koji ima magnetni momenat ( $\mu$ ). Razlike u energiji koje proučava EPR spektroskopija mahom potiču od interakcije magnetnog momenta nesporenog elektrona sa magnetnim poljem  $B_0$  (koje proizvodi magnet u laboratorijskim uslovima). Ova pojava naziva se Zemanova elektronska interakcija.<sup>191</sup> Tada elektron kruži oko ose polja, bilo paralelno ili antiparalelno u odnosu na vektor magnetnog polja, čime su definisana dva energijska nivoa, određena spinskim magnetnim kvantnim brojem  $M_S$ . Ovaj kvantni broj može imati vrednosti  $M_S = +1/2$  i  $M_S = -1/2$ . Nesporeni elektron biće u stanju sa minimumom energije kada se njegov  $\mu$  nalazi u pravcu magnetnog polja  $B_0$ , a u stanju maksimuma energije kada se njegov  $\mu$  nalazi nasuprot magnetnog polja  $B_0$ .<sup>186,192</sup> Energija svake od ovih orijentacija proizvod je  $\mu$  i  $B_0$ , pri čemu je<sup>190</sup>:

$$\mu = M_S g_e \beta \quad (20)$$

gde je  $\beta$  konstanta konverzije koja se naziva Borov magneton (iznosi  $9,2741 \cdot 10^{-24}$  J/T), a  $g_e$  je spektroskopski  $g$ -faktor (Landeov faktor) slobodnog elektrona koji ima vrednost 2,0023. Iz ovoga sledi da su energije elektrona kojima odgovaraju spinska stanja  $M_S = +1/2$  i  $M_S = -1/2$ , respektivno<sup>186,191,193</sup>:

$$E_{1/2} = \frac{1}{2} g_e \beta B_0 \quad (21)$$

$$E_{-1/2} = -\frac{1}{2} g_e \beta B_0 \quad (22)$$

Razlika u energijama između ova dva energijska nivoa predstavlja Zemanovo cepanje, koje je direktno srazmerno jačini magnetnog polja  $B_0$  (slika 11). U molekulu sa nesporenim elektronom moguće je indukovati prelaze između ovih elektronskih spinskih energijskih nivoa, izlaganjem elektrona dejstvu elektromagnetnog zračenja čija je frekvencija jednaka frekvenciji njihove precesije.<sup>194,192</sup> Pošto se najveći broj

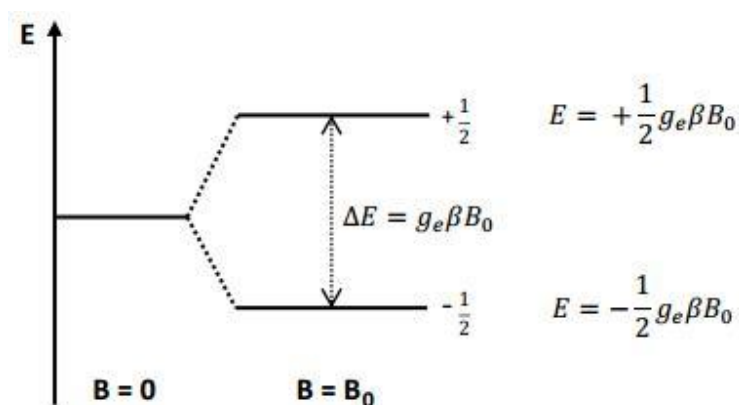


nesparenih elektrona nalazi na nižem energijskom nivou, dolazi do apsorpcije energije mikrotalasnog zračenja koje emituje izvor<sup>195,196</sup>.

Matematički zapisan, uslov za rezonanciju je:

$$h\nu = g_e\beta B_0 \quad (23)$$

na osnovu čega se zaključuje da će se apsorbovati ona energija zračenja izvora koja je jednaka energijskoj razlici između energijskih nivou elektrona koju uzrokuje spoljašnje magnetno polje.<sup>191</sup>

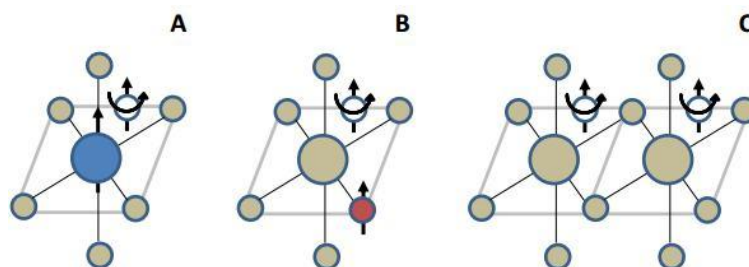


**Slika 11.** Raspodela energijskih nivou elektronskog spina u funkciji magnetnog polja  $B_0$ .

Do apsorpcije mikrotalasnog zračenja dolazi pri specifičnim kombinacijama frekvencije mikrotalasa i jačine magnetnog polja, koje zavise od prirode svake paramagnetne vrste. Pošto se ove apsorpcije javljaju samo kod paramagnetika, ne dolazi do apsorpcije od strane neradikalnih vrsta, koje bi eventualno ometale detekciju radikala. U tome se ogleda značajna prednost EPR spektroskopije u odnosu na druge spektroskopske i elektrohemijske metode<sup>46</sup>.

Izgled EPR spektra ne zavisi samo od broja nesparenih elektrona, već i od njihove interakcije sa okolinom. Naime, EPR tehnika razmatra tri tipa mogućih interakcija (slika 12). Interakcija nesparenog elektrona sa magnetnim momentom jezgra predstavlja nuklearnu hiperfinu interakciju; u stvari, hiperfinom se naziva ako potiče od jezgra sa koga potiče i nespareni elektron, a superhiperfinom ukoliko potiče od

susednog jezgra. Treći tip interakcija su spin-spin interakcije između dva nesparena elektrona sa različitih atoma u okviru istog molekula.<sup>190,197</sup>



**Slika 12.** Tipovi magnetnih interakcija od značaja za EPR: (A) hiperfina interakcija; (B) superhiperfina interakcija; (C) spin-spin interakcija.

Nastanak EPR spektra može se objasniti na primeru sistema koji sadrži elektronski spin ( $S$ ) i nuklearni spin ( $I$ ). Na elektronski spin posredstvom nuklearnog spina deluje magnetno polje jezgra. Interakcija ova dva spina je znatno slabija od Zemanove interakcije (barem dva reda veličine), pa dovodi do malih promena u EPR spektru, koje se nazivaju hiperfinom strukturom. Rezonantni uslov usled hiperfine interakcije može se predstaviti izrazom:

$$E = g\beta B + AM_I \quad (24)$$

gde je  $A$  konstanta hiperfinog cepanja, koja pruža informaciju o intenzitetu interakcije između jezgra i elektrona, a  $M_I$  je magnetni spinski kvantni broj.  $A$  je u direktnoj vezi sa rastojanjem između pikova na EPR spektru (slika 13), i ukazuje na intenzitet delokalizacije nesporenog elektrona u odnosu na posmatrano jezgro.<sup>198</sup> Pošto za svaki  $I$  postoji  $2I + 1$  mogućih vrednosti magnetnog spinskog kvantnog broja  $M_I$  ( $M_I = I, I-1, \dots, 0, \dots, -I+1, -I$ ), hiperfina interakcija elektronskog spina sa nuklearnim spinom ( $I \neq 0$ ) dovodi do podele Zemanovog prelaza u  $2I + 1$  linija jednakog intenziteta. Na primer, interakcija elektrona sa jezgrom sa  $I = \frac{1}{2}$  (koje može biti proton) daće EPR spektar sačinjen od dve linije. Lokalno polje jezgra ( $B_{loc}$ ) može delovati tako što će bilo pojačavati bilo oslabiti primenjeno magnetno polje  $B_0$ . Usled toga, osnovni i pobuđeni energijski nivoi dele se na dva, pa se na spektru detektuju dve linije umesto jedne (slika 13).<sup>186,191,192</sup> Do prelaza između spinskih nivoa dolazi u skladu sa izbornim pravilom

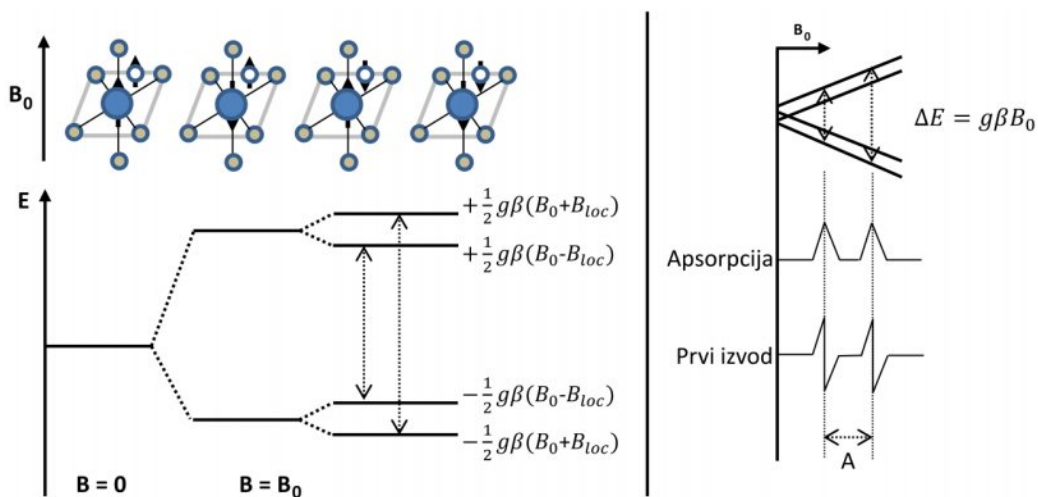
$\Delta M_s = \pm 1$ . Sem toga, za slučaj hiperfinog cepanja uvodi se i dodatno izborno pravilo,  $\Delta M_I = 0$ .

Položaj pikova na EPR spektru zavisi od strukture, konformacije, fizičkog stanja i pokretljivosti date paramagnetne vrste, kao i uticaja rastvarača. Broj pikova nastalih usled interakcije nesparenog elektrona sa magnetnim jezgrima koja su među sobom ekvivalentna može se izračunati pomoću izraza:

$$\text{Broj pikova} = 2nI + 1 \quad (25)$$

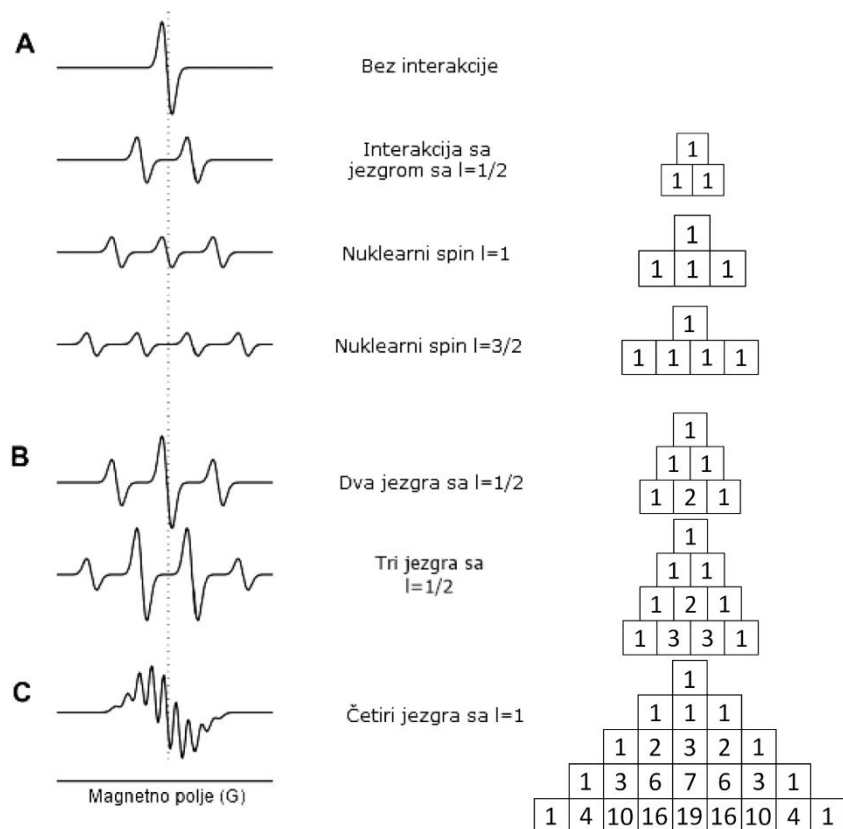
gde je  $I$  nuklearni spin datog jezgra, a  $n$  broj takvih jezgara. U nekim slučajevima, pikovi se javljaju na istoj frekvenciji i jačini polja, pa dolazi do njihove superpozicije<sup>46</sup>. U slučaju da se radi o jezgrima koja su neekvivalentna, prethodni izraz postaje:

$$\text{Broj pikova} = (2I + 1)^n \quad (26)$$



**Slika 13.** Nastanak EPR spektra.

Hiperfina interakcija može dovesti do toga da EPR spektar izgleda krajnje složeno (slika 14).<sup>192,199</sup>



**Slika 14.** Odabrani primeri hiperfinskih interakcija.

Pri interakciji nesporenog elektrona sa jezgrima različitih magnetnih svojstava (slika 14 A), izvorni signal podeljen je na dva ili više signala jednakog intenziteta. Važno je uočiti da se ukupni intenzitet signala ne menja, pa usled toga amplituda signala biva sve manja i manja. Interakcija sa više od jednog jezgra sa magnetnim svojstvima (slika 14 B) dovodi do promene oblika linije EPR signala. Spektar hemijske vrste koja interaguje sa četiri identična jezgra prikazan je na slici 14 C. Bez obzira na broj hiperfinskih linija, EPR spektar uvek je centriran u oblasti Zemanovog prelaza, označenog isprekidanom linijom na slici 14. Dijagram pored signala (Paskalov trougao) objašnjava na koji se način mogu izračunati relativni intenziteti različitih traka.

Analogno hiperfinoj interakciji, i susedna jezgra mogu interagovati sa nesporenim elektronom. Takve interakcije nazivaju se superhiperfine interakcije. Sa teorijskog aspekta, ove interakcije su slične hiperfinoj interakciji (pošto se takođe radi o interakciji elektronskog i nuklearnog spina), ali su znatno manjeg intenziteta. Intenzitet ovih interakcija zavisi od delokalizacije nesporenog elektrona između posmatranih

jezgara, i opada sa porastom broja veza u njegovoj okolini. Superhiperfina interakcija obično se može uočiti jedino kod atoma direktno vezanih za onaj koji sadrži nespareni elektron.<sup>197</sup>

Do sada je posmatran sistem koji poseduje jedan nespareni elektron, pa ima spin  $S = \frac{1}{2}$ . Međutim, postoje i sistemi koji imaju više nesparenih elektrona. Na primer, jon Ni (II) ima dva nesparena elektrona, pa je njegov spin dva puta po  $\frac{1}{2}$ , odnosno  $S = 1$ . Sistemi sa  $S = \frac{1}{2}$  nazivaju se nisko-spinskim, a sistemi sa  $S \geq 1$  visokospinskim. Za sistem koji ima  $n$  nesparenih elektrona, broj spinskih energijskih nivoa biće  $2S + 1$ . Ova vrednost naziva se spinski multiplicitet.<sup>191</sup> Visokospinski sistemi čine oko polovine paramagnetnih vrsta. Da bi došlo do Zemanove interakcije, neophodno je primeniti spoljašnje magnetno polje. Međutim, čak i u njegovom odsustvu, kod visokospinskih sistema dolazi do interakcije između nesparenih elektrona. Ova interakcija naziva se zbog toga interakcija nultog polja. Ona je obično znatno snažnija od Zemanove interakcije koju je moguće postići u spektrometru koji radi u X oblasti (više o X-oblasti rečeno je u poglavlju 2.5.2.). Jedan od načina da se ovaj problem prevaziđe u toj oblasti mikrotalasnog zračenja jeste rad na nižim temperaturama.<sup>185</sup>

S obzirom da kombinacija frekvencije mikrotalasa i snage magnetnog polja pri kojoj dolazi do apsorpcije (rezonancije) zavisi od prirode radikala, različite vrste radikala (i jona metala) davaće signal najčešće u različitim regionima skeniranog magnetnog polja. Kod različitih spektroskopskih metoda uobičajeno je prikazivanje apsorpcionog spektra. Međutim, kod EPR spektroskopije se rezultat snimanja prikazuje kao prvi izvod apsorpcionog spektra (slika 13). Značajno poboljšanje odnosa signal-šum postiže se modulacijom magnetnog polja, obično frekvencijom od 100 kHz. Ovim postupkom, EPR signal u rezonantnom polju transformiše se u sinusoidu čija amplituda je proporcionalna nagibu apsorpcione linije. Ako je amplituda modulacije dovoljno mala u odnosu na širinu linije, modulirani signal se dobija u formi prvog izvoda.<sup>200</sup> Izvodi višeg reda mogu se koristiti za prikazivanje EPR signala, ali se mora imati u vidu da sa porastom reda izvoda raste i rezolucija, ali opada osetljivost. U praksi se iz tog razloga, osim ponekad izvoda drugog reda, ne koriste izvodi višeg reda.<sup>193</sup>

Apsorpciona linija (pik) ima određenu širinu, zbog toga što do apsorpcije mikrotalasnog zračenja dolazi u određenoj (karakterističnoj) oblasti širine magnetnog

polja, pri čemu intenzitet apsorpcionog maksimuma opada sa odstupanjem od uslova rezonancije.<sup>191,193</sup> Teorijski, širina apsorpcione linije na EPR spektru je veoma mala, reda veličine oko 0,1 G. Međutim, relaksacioni procesi mogu dovesti do skraćanja vremena života pobuđenog stanja, a time i do proširenja apsorpcionih linija. Ovo je posebno izraženo kod kompleksa prelaznih metala.<sup>197</sup> Pošto se EPR signal ne gubi ni nakon uzastopnih snimanja, mora postojati način da spinski sistem izgubi višak energije i vrati se u prvobitno stanje. Do razmene energije može doći između elektronskog spina posmatranog elektrona i okoline ili spina susednog elektrona. U skladu sa tim, dva ključna relaksaciona procesa koji dovode do širenja linija su spin-okolina i spin-spin relaksacija.<sup>197,201</sup> Svaku od njih karakteriše odgovarajuće relaksaciono vreme:  $T_1$  za spin-okolina i  $T_2$  za spin-spin relaksaciju. Oba relaksaciona vremena povezana su sa širinom spektralne linije ( $\Delta B_s$ ) posredstvom izraza:

$$\Delta B_s \propto \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (27)$$

Može se reći da je  $T_1$  vreme odraz toga koliko je snažno spinski sistem vezan za okolinu (kristalnu rešetku).<sup>193</sup> Sa kraćim  $T_1$  vremenom raste doprinos spin-okolina relaksacije širini spektralne linije. Snimanjem pri sniženim temperaturama usporava se relaksacija, pa se dobijaju spektri sa izraženijim pikovima.<sup>191</sup>

Prostor ispod apsorpcione linije (odnosno njenog dvostrukog integrala, ukoliko je signal snimljen kao prvi izvod) direktno je proporcionalan spinskoj koncentraciji, odnosno količini paramagnetnih centara (spinova) u rezonatorskom prostoru.<sup>193</sup> Iz tog razloga, moguće je odrediti apsolutnu koncentraciju radikalske vrste, poređenjem ovog podatka sa standardom, pa je EPR spektroskopija takođe i kvantitativna metoda<sup>22</sup>. Međutim, pošto je ovo veoma teško izvodljivo kod složenih spektara ili u slučaju postojanja loše bazne linije, očitavanje visine jednog ili više pikova na spektru često se koristi umesto podatka o površini ispod pika, mada nam pri tome danas pomažu kompjuterske simulacije EPR spektara.

Informacije o prirodi posmatrane radikalske vrste pruža  $g$ -vrednost. Većina ugljenično centriranih radikala ima  $g$ -vrednosti bliske onoj za slobodni elektron. Susedne grupe koje se ponašaju kao donori ili akceptori elektronske gustine menjaju  $g$ -vrednost na karakterističan i predvidljiv način. Radikali sa značajnom spinskom

delokalizacijom (posebno na heteroatomima) imaju visoke  $g$ -vrednosti, a ove promene su posebno izražene kod jona metala.<sup>46</sup>

Parametri od značaja za karakterizaciju EPR spektara su položaj apsorpcionih maksimuma, njihov broj i intenzitet, uzajamni odnos njihovih intenziteta i međusobno rastojanje, njihov oblik i širina. Ovi parametri su u direktnoj vezi sa strukturom posmatrane hemijske vrste, načinom na koji ona interaguje sa okolinom i procesima kojima podleže tokom analize.<sup>193</sup> Izuzev svojstava samog uzorka, na oblik EPR spektara može se uticati i variranjem parametara uređaja.

Prethodno je rečeno da spektroskopski  $g$ -faktor (Landeov faktor) za slobodan elektron ima vrednost 2,0023. Međutim, usled prisustva drugih elektrona u atomu, odnosno spinsko-orbitalnih sprezanja između elektronskih spinova i okolnog elektrostatičkog polja, ova vrednost je drugačija.<sup>202</sup> Pošto orbitale u molekulu poseduju prostornu orijentaciju, intenzitet ovog sprezanja zavisi od posmatranog smera, pa se kaže da je anizotropan. U rastvorima niske viskoznosti, ova anizotropija je usrednjena, pošto molekuli mogu brzo da menjaju smer rotacije u svim pravcima. Međutim, kada se paramagnetni molekuli nađu u fiksnom položaju (kod kristala),  $g$ -faktor bi se menjao sa svakom promenom položaja uzorka u rezonatoru. Za svaki paramagnetni molekul moguće je definisati koordinatni sistem, kod koga je (po konvenciji)  $z$ -osa paralelna sa pravcem primenjenog polja. Duž svake od njih moguće je meriti vrednost  $g$ -faktora, pa oni u skladu sa osom nose oznaku  $g_x$ ,  $g_y$  i  $g_z$ . U zavisnosti od simetrije elektronske raspodele,  $g$  vrednost može biti izotropna ( $g_x = g_y = g_z = g_{iso}$ ) kod idealnih oktaedarskih sistema, a anizotropija može postojati i kod aksijalnih ( $g_x = g_y \neq g_z$ ) i rombičnih ( $g_x \neq g_y \neq g_z$ ) sistema.<sup>203</sup> Za sistem aksijalne simetrije, vrednosti  $g$  duž  $z$ -ose obeležavaju se još i kao  $g_{\perp}$ , a vrednosti duž  $x$ - i  $y$ -ose kao  $g_{\parallel}$ . Magnetno polje koje proizvodi EPR uređaj ( $B$ ) nema isti intenzitet na mestu na kome se nalazi elektron, već je na tom mestu njegov efektivni intenzitet ( $B_{eff}$ ):

$$B_{eff} = B + B_{loc} \quad (28)$$

gde  $B_{loc}$  predstavlja uticaj lokalne sredine. Usled različite orijentacije molekula, a time i različite vrednosti  $B_{eff}$ , različit je i rezonantni uslov za prelaz između osnovnih elektronskih nivoa. Pošto su  $g$  i  $B_{eff}$  povezani kroz uslov za rezonanciju, ta razlika

označava se kao  $g$ -anizotropija. Za prethodni slučaj rotiranja kristala u rezonatoru, dobila bi se tri različita spektra pomereni jedan u odnosu na drugi. Kod praškastih supstanci, zbog vrlo raznolike orijentacije molekula, došlo bi do superponiranja ovih spektara. Pošto pomeraj ne mora biti veliki, posledično bi došlo do proširenja linija na spektru.<sup>204</sup>

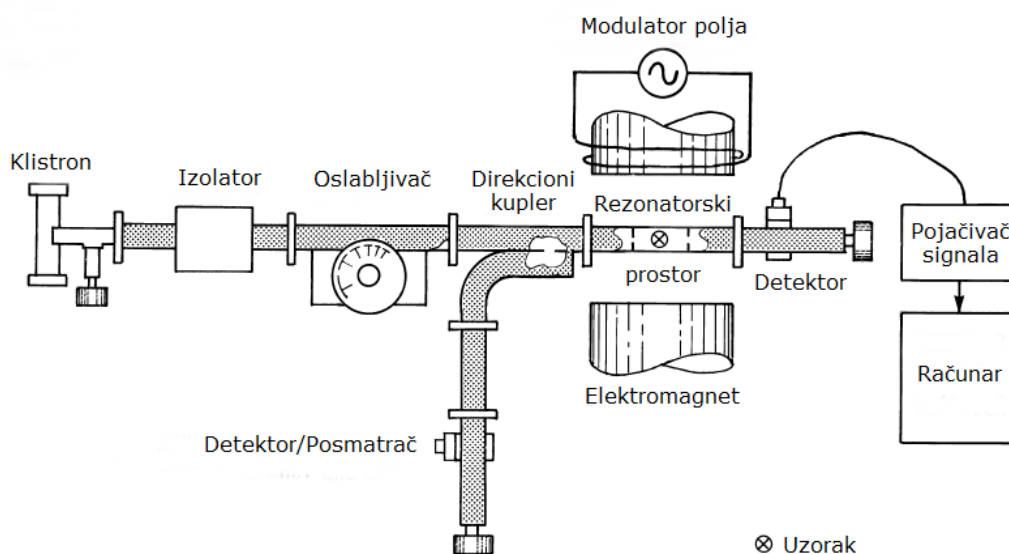
Pored  $g$ -anizotropije, nespareni elektron može usled interakcije sa magnetnim dipolima okolnih jezgara učestvovati u hiperfinim cepanjima, dajući anizotropnu finu strukturu na EPR spektrima. Usled toga, u EPR spektroskopiji od značaja je i hiperfina, takozvana  $A$ -anizotropija.<sup>205</sup> Ovaj vid anizotropije odnosi se na veličinu hiperfinog cepanja. Kao i u slučaju  $g$ -anizotropije, kod tečnosti niskog viskoziteta dolazi do usrednjavanja interakcije između elektrona i dipola jezgra koje je dovoljno udaljeno. Zbog toga se smatra da ova interakcija ne dovodi do cepanja linija kod ovakvih sistema. Nasuprot tome, kod kristala i rigidnih sistema uopšte, upravo ova interakcija doprinosi anizotropnoj komponenti hiperfinog sprežanja.<sup>185</sup> I kod  $A$ -anizotropije je (kao i kod  $g$ -anizotropije) važan položaj magnetnog momenta elektrona u odnosu na magnetno polje koje generiše uređaj, pošto komponente magnetnog polja nisu jednake u svim pravcima (lokalno magnetno polje zavisi od magnetnih momenata jezgara). U zavisnosti od ugla pod kojim se dipolni moment elektrona nađe u odnosu na dipolni moment jezgra, energijski nivoi se mogu različito cepati, što dovodi do pomeranja spektralnih linija. Analogno  $g$ -anizotropiji, kod praškastih sistema bi došlo do širenja linija usled mnoštva različitih orijentacija molekula, i posledičnog usrednjavanja anizotropnog efekta.<sup>204</sup> Kod mnogih sistema dolazi kako do  $g$ -, tako ujedno i do  $A$ -anizotropije. To dovodi i do pomeranja hiperfinog multipliteta kao celine sa promenom orijentacije uzorka, ali i do promene rastojanja linija kojima je predstavljen na spektru.<sup>185</sup> Pošto je konstanta hiperfinog cepanja ( $A$ ) tenzor, kod sistema sa aksijalnom simetrijom moguće je koristiti oznake  $A_{\perp}$  i  $A_{\parallel}$ , po identičnoj analogiji kao i kod  $g$ -anizotropije.

### **2.5.2. Detekcija EPR signala i primena EPR spektroskopije**

EPR signal detektuje se EPR spektrometrom (slika 15). Postoje dva tipa EPR spektrometara: CW (continuous wave) i FT (Fourier transform). CW je zastupljeniji tip, i kod njega se rezonantni uslov postiže promenom jačine magnetnog polja pri fiksnoj frekvenciji zračenja (mada mogu postojati manje varijacije elektromagnetnih talasa). FT



spektrometri funkcionišu tako što se spinovi prisutni u uzorku postavljenom u magnetnom polju fiksne jačine perturbuju pulsom zračenja čiji intenzitet odgovara rezonantnoj frekvenciji. Detektor ne vrši direktnu detekciju apsorpcije, već meri razliku u intenzitetu zračenja (usled spektroskopskih prelaza) reflektovanog iz rezonatorskog prostora, što posredstvom Furijeove transformacije biva prevedeno u EPR spektar. Ovakvo rešenje pruža mogućnost brže akvizicije spektara, proučavanje molekulskog kretanja i poboljšanje tehnike EPR oslikavanja (EPR imaging)<sup>206</sup>.



**Slika 15.** Šema EPR spektrometra. Prilagođeno iz literature.<sup>185</sup>

Do rezonancije dolazi pri jačini polja od oko 3500 G (0,35 T), čemu za slobodni elektron ( $g = 2,0023$ ) odgovara mikrotalasno zračenje frekvencije 9,5 GHz. Ova frekvencija zračenja koristi se kod većine EPR spektrometara koji rade u X-oblasti, i obuhvata region mikrotalasnog zračenja srednje frekvencije. Ove frekvencije nemaju značajnog uticaja na sam uzorak prilikom *in vitro* ili *ex vivo* merenja. Međutim, za *in vivo* merenja koriste se niže frekvencije mikrotalasnog zračenja i niži intenzitet magnetnog polja. Ovo je neophodno kako bi se omogućila adekvatna prodornost zračenja, a izbegli dielektrični gubici usled nerezonantne apsorpcije mikrotalasnog zračenja od strane vode. Sem toga, EPR spektrometri mogu koristiti i zračenje drugih frekvencija: L-oblast (1.1 GHz), S-oblast (3.0 GHz), Q-oblast (34.0 GHz), W-oblast (94.0 GHz) i druge. Nazivi oblasti potiču od razvoja vojne tehnike iz perioda Drugog

svetskog rata, i ne prate posebnu logiku (na primer, X je oznaka za nešto tajno, nepoznato neprijatelju).<sup>191</sup>

Izvor mikrotalasnog zračenja obično je klitron, vakuumska cev sposobna da proizvodi mikrotalasne oscilacije u uskoj oblasti frekvencija, koje se mogu regulisati bilo mehaničkim podešavanjem klitrona bilo promenom napona struje kojom se on napaja. Kod novijih instrumenata, klitron je zamenjen Ganovom diodom. Ona proizvodi zračenje stabilnije frekvencije i ima duži radni vek. Ovako nastali mikrotalasi potom se transportuju kroz uređaj koaksijalnim kablovima, provodnim trakama (stripline) ili talasovodima. Snaga izvora mikrotalasa EPR spektrometara koji rade u X-oblasti je obično oko 400 mW, ali je normirana, tako da radna snaga tokom eksperimenata iznosi 200 mW. To je učinjeno delom da bi snaga zračenja bila konstantna, a delom zbog toga što realna snaga izvora opada tokom njegovog životnog veka, ali normirana ostaje jednaka.<sup>191,200</sup>

Na svom putu do uzorka mikrotalasi najpre stižu do izolatora. Ovaj uređaj služi za minimiziranje većih perturbacija mikrotalasnog izvora do kojih dolazi ukoliko u sistemu postoji povratno reflektovanje mikrotalasne energije ka izvoru. Izolator propušta mikrotalasnju energiju u smeru prema uzorku i usporava njen povratak ka izvoru. Nakon prolaska kroz izolator, mikrotalasi stižu do oslabljivača (atenuatora) sa ulogom da prilagodi jačinu mikrotalasa koji dolaze do uzorka. Naime, oslabljivač sadrži apsorptivni element kojim se postiže ovaj efekat, tako što deo zračenja biva konvertovan u toplotu. Mala količina inicijalnog zračenja (oko 1%) odvaja se posebnim talasovodom neposredno pre attenuatora, i usmerava ka detektoru, koji ga registruje kao referentno.<sup>185,207</sup>

U narednoj fazi, mikrotalasi stižu do direkcionog kuplera (koji se još naziva i cirkulator). On služi da usmeri mikrotalase prema rezonatorskom prostoru, ali i da reflektovanu energiju iz njega usmeri prema detektoru. Neposredno pre nego što mikrotalasnju zračenje dospe do rezonatorskog prostora, ono nailazi na iris. Iris je uređaj koji reguliše intenzitet zračenja koje ulazi u rezonator, odnosno koje se iz njega reflektuje. Sam iris je prorez kroz koji zračenje dospeva u rezonator, a neposredno pre proreza nalazi se teflonski zavrtanj na koji je pričvršćena metalna pločica. Posredstvom

elektromotora, zavrtnanj se može podešavati tako da se metalna pločica pomera naviše ili naniže, menjajući snagu zračenja koje ulazi u rezonator.<sup>5,208</sup>

Preostalo mikrotalasno zračenje koje se reflektuje sa detektora, vraća se u cirkulator, odakle biva usmereno u poseban talasovod, na čijem kraju se pretvara u toplotu. Na taj način osigurava se da se zračenje ne vraća ka izvoru.

Prethodno opisane komponente (sem irisa) obično su smeštene u zaštitnu metalnu kutiju, i sve skupa čine „mikrotaladni most”. On se najčešće postavlja na izdignutu podlogu, kroz koju iz mosta izlazi talasovod na čijem dnu se nalazi rezonator (naziva se još i rezonatorski prostor, odnosno rezonatorska šupljina).

Najvažniji deo EPR spektrometra je rezonator u koji se postavlja uzorak. On se obično nalazi ispod mikrotalasnog mosta, tako da prolazi između dva pola elektromagneta. Rezonator je izrađen tako da se u njegovoj unutrašnjosti može formirati serija stojećih mikrotalasa, pri čemu rezonator izdvaja i pojačava signal mikrotalasa tačno određene frekvencije. Frekvencija izvora podešava se tako da odgovara frekvenciji rezonatorskog prostora. Iz tog razloga za različitu oblast mikrotalasnog zračenja koriste se različiti rezonatori. Kod X-oblasti, rezonatori su četvrtasti ili cilindrični, dok kod visokofrekventnih oblasti oni mogu imati složenije oblike, ili čak ne moraju ni postojati. Tokom rezonancije gustina energije u rezonatoru može biti hiljadu puta veća od one u talasovodu, što povećava verovatnoću detekcije rezonantne apsorpcije uzorka. Frekvencija mikrotalasnog zračenja izvora može se podešavati (tjunovati) u ograničenom frekvencijskom opsegu (10% od ukupne frekvencije). To je neophodno zbog toga što uslov za rezonanciju biva ispunjen pri neznatno različitim frekvencijama zračenja, u zavisnosti od toga šta se u rezonatoru nalazi (da li je prazan, sadrži kivetu sa uzorkom, rashladni sistem).<sup>185,191,209</sup>

Intenzitet linija EPR spektra zavisi i od položaja uzorka, pa se za merenja uglavnom koriste cilindrične kvarcne kivete čija orijentacija u magnetnom polju nema uticaja na intenzitet dobijenog EPR signala. Uzorak se u kivetu postavlja tako da se po njenom unošenju u rezonatorski prostor nađe u regionu gde komponenta magnetnog polja zračenja ima maksimalnu, a komponenta električnog polja minimalnu vrednost. Uzorci koji se analiziraju EPR tehnikom mogu biti čvrsti ili tečni, pri čemu se tečni

unose u kvarcne kapilare, ili u posebna teflonska creva koja se potom stavljaju u kvarcnu kivetu, odnosno druge specijalno dizajnirane nosače.<sup>191</sup>

Prilikom rada sa EPR spektrometrom, statično magnetno polje mora biti stabilno i dobro kontrolisano. Razlike u jačini ovog polja zapravo se prevode u odgovarajuće razlike u razdvajanju energijskih nivoa,  $\Delta E$ . Elektromagnet je uobičajeni izvor statičnog magnetnog polja kojim se postiže razdvajanje spinskih energijskih nivoa. Izrađen je od gvozdениh poluga oko kojih su namotane bakarne žice, povezane sa izvorom električne energije. Odgovarajući rad uslovljen mu je stabilnim napajanjem električnom energijom i odgovarajućim hlađenjem (najčešće vodenim).<sup>185</sup> EPR spektrometri namenjeni za analize u X-oblasti sadrže magnet sa intenzitetom polja do 6000 G (0.6 T).

Modulacija polja vrši se pomoću Helmholtzovih zavojnica postavljenih na svakoj strani rezonatorske šupljine duž pravca prostiranja magnetnog polja. Pri uspostavljanju rezonancije, njegova uloga je da kroz promenu polja poveća odnos signal/šum, čime se modifikuje amplituda reflektovanih talasa, najčešće na 100 kHz. Ovaj postupak transformiše EPR signal u sinusoidu čija je amplituda srazmerna nagibu rezonantne linije.<sup>200</sup>

Nakon izlaganja uzorka dejstvu magnetnog polja, on apsorbuje deo zračenja, tako da detektor registruje malo smanjenje intenziteta zračenja. Najčešće korišćeni detektor u EPR tehnici jeste Šotkijev (Schottky) diodni kristal. Ovaj uređaj pretvara mikrotalasnu snagu u električnu struju. Pri vrednostima snage mikrotalasa manjim od 1  $\mu\text{W}$ , detektovana struja direktno je proporcionalna snazi mikrotalasa.<sup>210</sup> Pri većim snagama, detektovana struja srazmerna je kvadratnom korenu snage mikrotalasa (ovi detektori nazivaju se linearnim). Za kvantitativna određivanja, zbog bolje osetljivosti, pogodno je da detektor radi u linearnoj oblasti. Optimalna jačina struje koja stiže na detektor iznosi 200  $\mu\text{A}$ . Kako bi se to obezbedilo, deo mikrotalasnog zračenja izvora biva preusmeren u referentnu granu, gde se reguliše njegova snaga, nakon čega detektor biva snabdeven dodatnom snagom mikrotalasnog zračenja. Sem toga regulisan je i fazni pomeraj, kako bi se obezbedilo da mikrotalasi iz referentne grane budu u istoj fazi sa signalnim mikrotalasnim zračenjem pri dolasku do detektora. Detektori ovog tipa obično se izrađuju od silicijuma i volframa i izuzetno su osetljivi (primera radi, dejstvom statičkog elektriciteta lako se mogu oštetiti).<sup>209</sup> Iz tog razloga, automatski je

regulisano da ukoliko do detektora stigne struja jačine veće od 400  $\mu\text{A}$ , snaga mikrotalasa koje emituje izvor preventivno bude umanjena.

Rezultat snimanja EPR spektrometrom obično je u formi xy-grafika prvog izvoda apsorpcionog spektra. Jačina magnetnog polja predstavljena je na x-osi, a intenzitet struje detektora na y-osi.

Kompjuterski softver kod EPR uređaja može biti pasivan (samo prikuplja podatke sa detektora) ili aktivan (pruža mogućnost finog podešavanja i kalibracije uređaja). Noviji uređaji mahom imaju aktivan kompjuterski softver.

Načini primene EPR spektroskopije u biomedicini su u stalnom porastu. Sa lakšom dostupnosti i nižom cenom EPR uređaja (već postoje prenosive verzije kojima je moguće raditi jednostavnija snimanja), ova metoda postaje standardna u mnogim biohemijskim laboratorijama.<sup>22</sup>

EPR spektroskopija jedna je od retkih metoda sposobnih za direktnu detekciju radikalskih vrsta u složenim sistemima poput ćelija i uzoraka tkiva. Po definiciji, slobodni radikali su vrste koje sadrže nesparene elektrone, pa su samim tim paramagnetici. Svojstvo paramagnetičnosti čini osnovu detekcije slobodnih radikala posredstvom EPR spektroskopije.<sup>211</sup> Iako se ova metoda specifično primenjuje samo za proučavanje vrsta koje imaju nesparene elektrone, i iznačajno je osetljivija u poređenju sa drugim spektroskopskim metodama (granica osetljivosti EPR spektroskopije je reda veličine  $10^{-8} - 10^{-9}$  M), niska koncentracija radikalskih vrsta prisutnih u biološkim sistemima (obično piko ili nanomolarnog reda veličine) čini njihovu detekciju veoma otežanom.<sup>46</sup> Sem toga, pojedine radikalske vrste su toliko reaktivne da nikada ne dostižu koncentraciju potrebnu za detekciju EPR-om. Primer je hidroksilni radikal, koji reaguje sa drugim hidroksilnim radikalima ili organskim molekulima u difuziono kontrolisanim procesima. Brzina ovih reakcija ograničena je učestalošću sudara hidroksilnog radikala sa drugim hemijskim vrstama. Zbog toga je direktna detekcija ovog radikala u biološkim sistemima praktično neizvodljiva.<sup>211</sup>

### **2.5.3. „Spin-trap” EPR tehnika**

Slobodnoradikalske vrste od biološkog značaja su najčešće  $S = \frac{1}{2}$  sistemi. Biradikalske vrste nisu toliko uobičajene, a do sada u živim ćelijama nisu detektovane

vrste sa više od dva nesparena elektrona. Iako ovo naizgled pojednostavljuje primenu EPR-a u izučavanju bioloških sistema, problem koji se javlja jeste stabilnost radikalskih vrsta. Neke vrste reaguju sa okolinom toliko brzo da ih je nemoguće detektovati kao takve (u svom izvornom obliku), dok neke poseduju dovoljnu stabilnost. Neke radikalske vrste, čak i kada su prisutne u koncentracijama većim od  $10^{-8}$  M ne mogu se izučavati na sobnoj ili fiziološkoj temperaturi, pošto su vremena njihove spinske relaksacije veoma kratka, zbog čega su linije njihovih pikova previše široke da bi se mogle direktno proučavati EPR-om. To je slučaj sa superoksidnim i hidroksilnim radikalom.<sup>212</sup> Takođe, u biološkim sistemima dolazi do istovremene proizvodnje više od jedne radikalske vrste, što dodatno otežava EPR studije.<sup>213</sup>

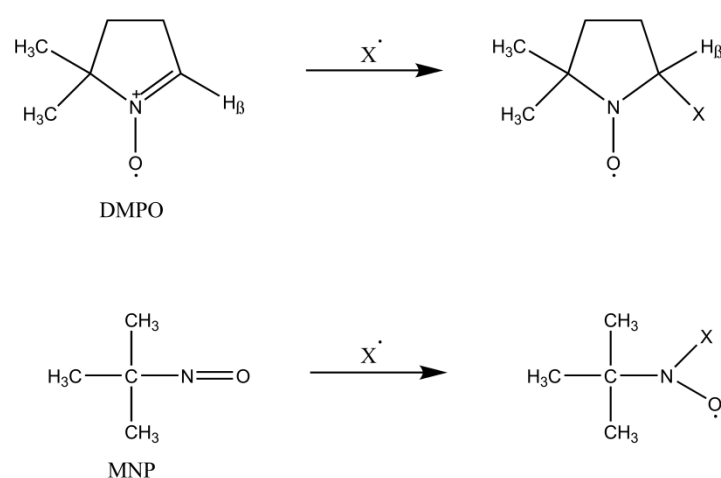
Problem detekcije kratkoživećih slobodnoradikalskih vrsta do sada je prevaziđen na dva načina: hemijskom stabilizacijom posredstvom interakcije sa dijamagnetnom vrstom, tako da nastaje novi radikal sa dužim vremenom života, ili fizičkom stabilizacijom zamrzavanjem na temperaturama ne većim od 175 K.<sup>191</sup> Nedostatak stabilizacije zamrzavanjem je u tome što se radikal više ne nalazi u tečnom okruženju, a nastali anizotropni efekti mogu otežati njegovu identifikaciju. Sem toga, za zamrzavanje je potrebno 5 – 10 ms.<sup>211</sup>

Posebna tehnika u EPR spektrometriji je takozvana tehnika hvatanja spinova, poznatija pod engleskim nazivom „spin-trap” tehnika. Hvatači spinova, odnosno spin-trapovi su dijamagnetne supstance koje reaguju sa radikalima (obično posredstvom dvostruke veze u svojoj strukturi), formirajući radikale (adukte) koji su stabilniji u odnosu na radikale posredstvom kojih su nastali. Ovi proizvodi potom mogu biti detektovani i analizirani primenom EPR spektrometrije.<sup>185</sup> EPR spektri spinskih adukata pružaju kvantitativnu informaciju o količini radikala prisutnih u datom uzorku, ali se pomoću njih može identifikovati i vrsta radikala (na osnovu konstanti hiperfinog cepanja, širine linija i simetrije).<sup>214</sup> Metodologija spin-trapovanja razvijana je još krajem šezdesetih godina prošlog veka, a usavršio ju je Edvard Janzen (Edward Janzen) 1984. godine.<sup>22,23</sup>

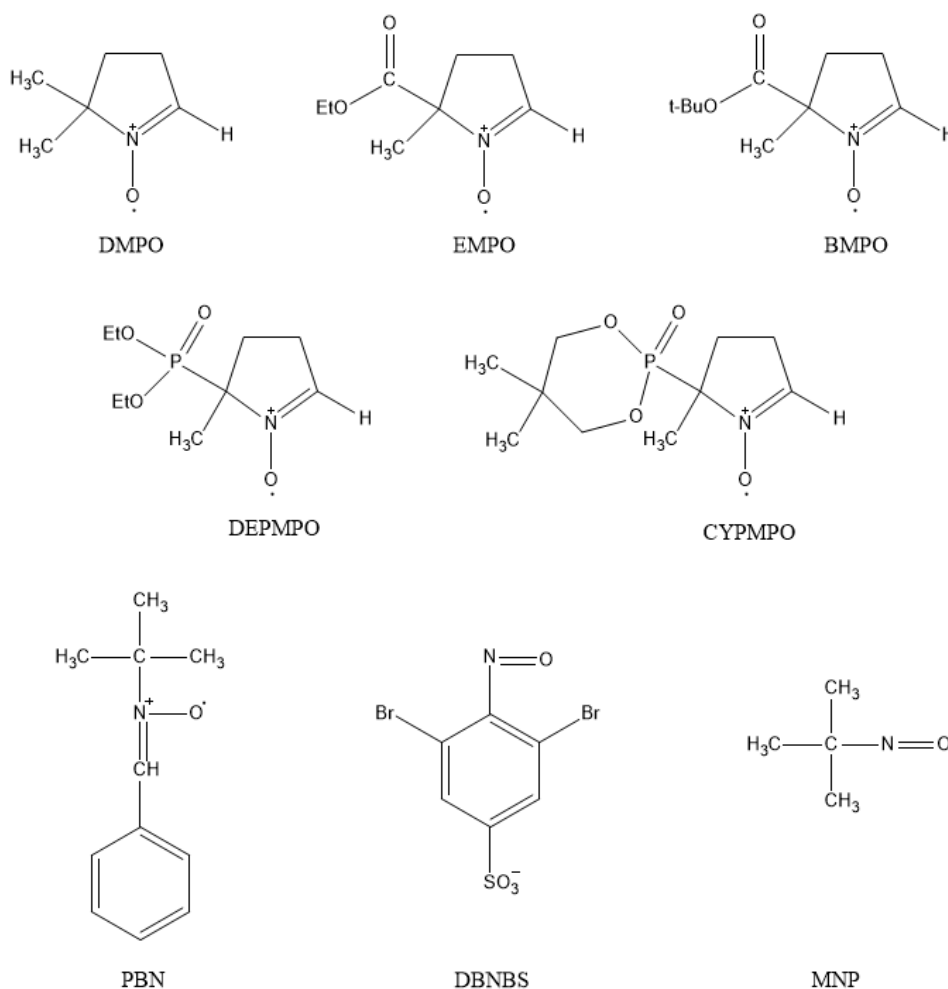
Spin-trapovi nisu pogodni za stabilizaciju makromolekulskih radikala zbog niske reaktivnosti usled sternih razloga. Oni se koriste za stabilizaciju fiziološki značajnih malih molekula, poput hidroksilnog ili superoksidnog radikala. Uprkos značajnoj koristi

primene spin-trapova, jedan od nedostataka ove tehnike je gubitak informacija o prirodi i koncentraciji izvorne radikalske vrste.<sup>191</sup>

Najrasprostranjenija jedinjenja koja se koriste kao spin-trapovi sadrže nitronsku ili ređe nitrozo grupu. Obe ove klase jedinjenja sa izvornom slobodnoradikalском vrstom formiraju adukt u obliku nitroksidnog slobodnog radikala (slika 16).<sup>211</sup> Spin-trapovi koji sadrže nitronsku grupu najčešće se sintetišu modifikacijom 5,5-dimetil-1-pirolin-*N*-oksida (DMPO), a oni sa nitrozo grupom modifikacijom 2-metil-2-nitrozopropana (MNP), (slika 17).<sup>46,191,212</sup>



**Slika 16.** Formiranje adukata spin-trapova DMPO i MNP.



**Slika 17.** Strukture često korišćenih spin-trapova.

Prednost primene spin-trapova sa nitrozo grupom ogleda se u tome da polazna radikalska vrsta biva direktno vezana za atom azota iz nitrozo grupe, pa se tako nađe u neposrednoj blizini nesparenog elektrona lokalizovanog na nitrozo grupi. To omogućuje detekciju dodatnih hiperfinskih kuplovanja koja potiču od jezgara koja imaju ukupan magnetni momenat različit od nule. Ipak, nedostatak ovih spin-trapova je to što dugoživeće adukte formiraju sa vrlo malim brojem radikala. Sem toga, termički i fotohemijski su nestabilni, pa razlaganjem daju različite radikalske vrste, što dovodi do pojave artefakata na EPR spektrima i komplikuje analizu.<sup>193,212</sup>

Adicijom polazne radikalske vrste na nitrone, nastaju stabilni aminoksil radikali. Nitronski trapovi daju širi spektar različitih dugoživećih spinskih adukata (ugljenično, kiseonično, sumporno i azotno centriranih) u odnosu na trapove sa nitrozo grupom.<sup>46,211</sup>



Ipak, polazna radikalska vrsta (slobodni radikal koji se vezuje za spin-trap) je kod ovih trapova udaljenija od nitroksidne grupe, usled čega kod nekih nitronskih trapova dolazi do minimalnog ili nikakvog hiperfinog kuplovanja od strane te radikalske vrste (slika 16). To u izvesnoj meri otežava njenu identifikaciju, pošto se onda ona zasniva isključivo na uticaju polazne radikalske vrste na hiperfino kuplovanje magnetnih centara iz samog trapa (obično nitroksidnog azota i susednih atoma vodonika). Ipak, kod većine nitronskih trapova intenzitet hiperfinog kuplovanja koje potiče od  $\beta$  vodonikovog atoma (slika 16) značajno zavisi od konformacije nitronskog prstena, na koju utiče u značajnoj meri osnovna radikalska vrsta. Na taj način je moguće doći do podataka o prirodni polazne radikalske vrste.<sup>46</sup> Jedan od najčešće korišćenih spin-trap molekula je DMPO. On je relativno stabilan, a spektre njegovih adukata je relativno jednostavno interpretirati zbog različitih vrednosti konstante hiperfinog cepanja (posebno u slučaju superoksidnog i hidroksilnog radikala).<sup>213</sup> Nažalost, ovaj trap je često neselektivan, sa aduktima koji često imaju kratko vreme života. Noviji spin-trap, čiji je prekursor DMPO, jeste DEPMPO (5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-*N*-oksid). Ovaj molekul reaguje sa hidroksilnim radikalima dajući pri tome dovoljno stabilne adukate koje je moguće detektovati EPR spektrometrijom. Na taj način prevazilazi se problem direktne detekcije hidroksilnih kao i drugih radikala EPR metodom, koji nastaje usled njihovog kratkog vremena života.<sup>215</sup> Pošto je DEPMPO zapravo fosforilovani analog spin-trapa DMPO, prisustvo <sup>31</sup>P doprinosi dodatnom hiperfinom cepanju EPR spektralnih linija, tako da svaki njegov spin-adukt ima karakterističan multipletni EPR signal sa minimum osam pikova, koji je toliko specifičan da se može smatrati „otiskom prsta” tog radikala. Postojanje tolikog broja pikova je u izvesnoj meri problematično, posebno kod bioloških sistema kod kojih može istovremeno biti prisutno više različitih radikalskih vrsta. Na EPR spektrima snimljenim u takvim uslovima može doći do preklapanja pikova, čime se otežava identifikacija adukata. Ovi problemi prevazilaze se primenom različitih tehnika multivarijantne analize i složenih matematičkih algoritama u cilju izolovanja spektara pojedinačnih adukata.<sup>216</sup>

Analiza kinetike *in vivo* primenom spin-trapova, u slučaju hidroksilnog i superoksidnog radikala, je otežana i zato što formirani adukti bivaju redukovani od strane sveže proizvedenih radikala, a dolazi i do konverzije DEPMPO/OOH adukta u DEPMPO/OH adukt. Jedno od rešenja za ovaj problem je i korišćenje nitroksidnih

spinskih proba umesto spin-trapova. Za razliku od trapova, spinske probe su već same po sebi stabilni radikali, koji u reakciji sa drugim radikalima bivaju prevedeni u formu hidroksilamina, usled čega se smanjuje intenzitet pikova na njihovim EPR spektrima.<sup>213</sup>

Ponekad je potrebno izvršiti i kompjuterske simulacije eksperimentalno dobijenih EPR spektara pri trapovanju, kako bi se odredile tačne vrednosti konstanti hiperfinog kuplovanja. To se najčešće vrši u slučaju da spektar sadrži više od jedne komponente.

Sa aspekta hemijske kinetike, važno je da se reakcije formiranja adukta između spin-trapa i radikala dešavaju vrlo brzo, pošto to povećava izgleda za dobijanje intenzivnog EPR signala. Zapravo, poželjno je da je brzina nastanka adukta velika, a brzina njegovog razlaganja što manja. Uobičajeno je da se koriste visoke koncentracije trapa (mM ili M), jer se time postiže efikasnije trapovanje.<sup>46</sup>

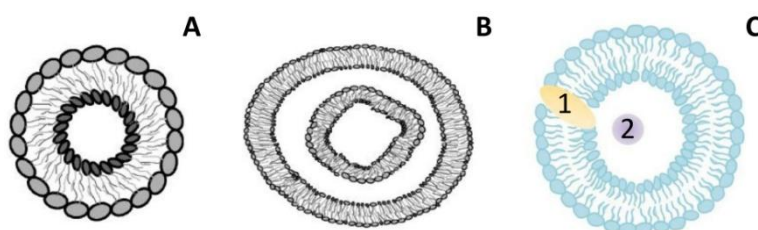
Iako komercijalno dostupni spin-trapovi imaju deklarirani nivo čistoće >99%, pošto se u eksperimentima koriste u visokoj koncentraciji, i koncentracija kontaminanata je povećana. Ukoliko su oni u formi radikala ili jedinjenja koja mogu formirati radikale, to predstavlja ozbiljan eksperimentalni problem. Iz tog razloga, do sada je razvijeno više metoda za dodatno prečišćavanje spin-trapova.<sup>217,218</sup>

## 2.6. Lipozomi

Lipozomi su prvi sistemi nanometarskih dimenzija za transport lekova koji su ušli u kliničku upotrebu. Prvi put su u literaturi opisani 1961. godine.<sup>21</sup> Njihov razvoj započeo je 1965. godine, a 1995. su prvi put upotrebljeni u terapeutske svrhe.<sup>219</sup>

Sama ideja o proizvodnji lipozoma javila se još pri izučavanju ćelijskih membrana. Prirodne ćelijske membrane sastoje se od lipidnog dvosloja u koji su integrisani ili na njegovoj površini vezani različiti molekuli poput proteina, i drugih, manjih molekula. Pošto je uočeno da prirodni lipidi (mahom su to fosfolipidi) mogu da se samoorganizuju u vezikule (dvosloje sfernog oblika), pretpostavljeno je da do istog efekta može doći i kod njihovih sintetičkih analoga.<sup>220</sup> Lipozomi predstavljaju lipidne vezikule sastavljene iz jednog ili više koncentričnih lipidnih dvosloja razdvojenih vodom, koji okružuju vodeno središte.<sup>221</sup> Može se reći da su lipozomi pojednostavljeni model ćelijske membrane, bez njenih ostalih elemenata. U zavisnosti od načina

pripreme, lipozomi mogu biti veličine od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara. Sem toga, mogu se sastojati iz različitog broja lipidnih dvosloja, imati različit sastav i naelektrisanje.<sup>219</sup> Na osnovu strukture (broja lipidnih dvosloja od kojih su sazdani), lipozomi se mogu podeliti na jednoslojne i višeslojne (slika 18). Jednoslojni lipozomi mogu se dalje podeliti prema veličini na male (do 100 nm) i velike (do 1  $\mu\text{m}$ ) jednoslojne vezikule. Kod višeslojnih lipozoma, individualni slojevi su složeni koncentrično, poput opni u glavici luka, prečnika do 20  $\mu\text{m}$ .<sup>222,223</sup>



**Slika 18.** Jednoslojni (A) i višeslojni (B) lipozomi. Hidrofobni lek (1) inkorporiran u membranu i hidrofilni lek (2) enkapsuliran unutar hidrofilnog jezgra lipozoma (C).

Slika prilagođena iz literature.<sup>224,225</sup>

Lipozomi se najčešće prave od fosfolipida, mahom od neutralnog fosfatidilholina i negativno naelektrisane fosfatidinske kiseline, fosfatidilglicerola, fosfatidilserina i fosfatidiletanolamina. Svako od ovih jedinjenja ima različitu kombinaciju lanaca masnih kiselina u svom hidrofobnom delu. U slučaju da je potrebno proizvesti katjonske lipozome, u tu svrhu koristi se stearylamin. Pored naelektrisanja, i broj dvostrukih veza u ugljovodoničnim lancima ovih molekula odgovoran je za rigidnost i fluidnost lipozoma.<sup>226</sup> Osim toga, lipozomi se mogu praviti i od posebno sintetisanih lipidnih komponenti, koje poseduju specifične funkcionalnosti.

Postoji nekoliko postupaka za pravljenje lipozoma, a neretko se mogu dobiti i njihovom kombinacijom.<sup>227</sup> Najjednostavniji postupak svodi se na formiranje tankog lipidnog filma (obično na zidu staklenog balona), rastvaranjem lipidnih komponenti u pogodnom (lako isparljivom) rastvaraču, i potom uparavanjem tog rastvarača pod vakuumom. Hidratacijom ovog filma, dolazi do formiranja lamelarnih struktura, koje se pri vorteksovanju, mešanju ili mućkanju kidaju i ponovo formiraju, pri čemu se hidrofobne ivice okreću ka unutrašnjosti, dajući lipozome. Nešto složeniji metod podrazumeva sonikaciju. Nakon dodavanja vode (ili odgovarajućeg vodenog rastvora) u

lipidnu sredinu, na ovakav sistem deluje se ultrazvukom. To se postiže bilo unošenjem posude u ultrazvučno kupatilo, ili postavljanjem vrha posebne ultrazvučne probe direktno u rastvor. Pri ovom postupku, potrebno je voditi računa o tome da upotreba ultrazvuka može dovesti do lokalnog pregrevanja suspenzije, pa je poželjno dodati led u ultrazvučnu kadu.<sup>224,227</sup> Metod obrnuto-faznog uparavanja je posebno koristan, pošto se njime dobijaju lipozomi u koje je moguće uneti znatno više vodenog rastvora. Metod se zasniva na sonikaciji vodenog rastvora (koji može sadržati i komponentu koju je potrebno transportovati lipozomima) zajedno sa organskim rastvaračem u kome se nalaze rastvorene lipidne komponente od kojih će lipozomi biti sazdana. Sporim uparavanjem organskog rastvarača nastaje želatinozna masa iz koje nastaju micidele, oko kojih se zatim u slojevima formiraju lipozomi. Prethodno opisanim metodama teško je kontrolisati dimenzije lipozoma. Zbog toga je pogodno lipozome praviti ekstruzijom kroz membrane odgovarajućih dimenzija.<sup>228</sup> Komponente koje je potrebno transportovati lipozomima mogu se ili dodati direktno u vodeni rastvor kojim se vrši hidratacija (u slučaju da se radi o jedinjenjima rastvornim u vodi), ili u organsku fazu koja sadrži lipide potrebne za njihovo formiranje (u slučaju da se radi o lipofilnim jedinjenjima). Poboljšanje enkapsulacije vodorastvornih jedinjenja postiže se ukoliko se već formirani lipozomi dehidriraju uz dodatak komponente koju je potrebno enkapsulirati. Prilikom rehidratacije, potrebno je vodu dodavati u veoma malim inkrementima, i po dodatku svakog inkrementa vorteksovati suspenziju. Usled bliskog kontakta lipida i dodatog jedinjenja, efikasnost enkapsulacije biva značajno povećana.<sup>224</sup>

Zbog svoje biokompatibilnosti, niske toksičnosti, mogućnosti transporta kako hidrofilnih, tako i hidrofobnih supstanci (slika 18), razgradivosti bez formiranja po zdravlje štetnih proizvoda, lipozomi su postali predmet sve većeg broja različitih farmakoloških, biohemijskih i medicinskih studija.<sup>228</sup> Lipozomi u organizam mogu biti uneti intravenski, oralno, putem respiratornog trakta, a mogu se koristiti i topično.<sup>223,225,229</sup> Integrisanje bioaktivnih jedinjenja u lipozome vrši se radi prevazilaženja različitih problema koji ometaju njihovu primenu u terapijske svrhe. Upotrebom lipozoma, hidrofobni lekovi mogu se indirektno učiniti vodorastvornim, mogu se izbeći njihova neželjena fiziološka svojstva (toksičnost), i može se kontrolisati njihova biodistribucija i vreme zadržavanja u organizmu.<sup>230-235</sup> Kod oralne primene

lekova, lipozomi se ponašaju kao zaštitna barijera, koja sprečava dejstvo enzima prisutnih u digestivnom traktu, želudačnog soka, žuči i crevne flore na sam lek.<sup>225,228</sup>

Primena lipozoma u terapijske svrhe može se dalje unaprediti modifikovanjem njihove površine ili strukture ligandima pogodnim za ciljan transport ovakvih lipozoma do željenih organa. U tu svrhu najčešće se koriste antitela i različiti peptidi, ali razvijeni su i termosenzitivni i pH-senzitivni lipozomi, koji reaguju na fiziološke karakteristike tkiva.<sup>236</sup> Zanimljiva je i upotreba lipozoma kao transportera lekova koji nisu ni enkapsulirani ni ugrađeni u strukturu lipozoma. Naime, moguće je površinu lipozoma modifikovati supstancama koje potom interaguju sa lekovima, bilo tako što se za njih direktno vezuju, ili formiraju džepove u koje potom lek može biti smešten.<sup>235,237</sup> Takvi lipozomi nazivaju se stelt lipozomima (od eng. stealth – prikriiven).

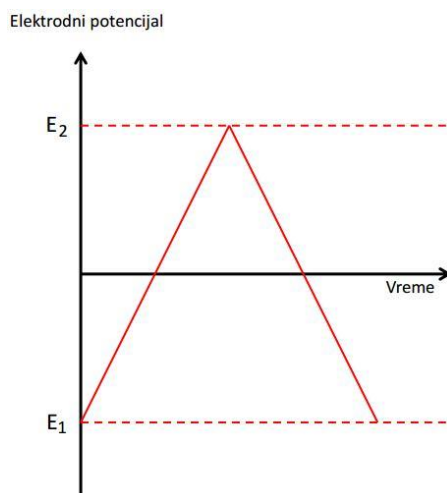
Osim lipozoma, ispitivana je i mogućnost primene micela za transport lekova. Iako je dokazano da je to moguće, prednost lipozoma ogleda se u tome što su pogodni za transport i hidrofilnih i hidrofobnih supstanci, i što je, zbog njihove veličine, po jedinici lipozoma moguće transportovati znatno veću količinu datog jedinjenja nego u slučaju micela.<sup>238</sup> Međutim, primena lipozoma sa sobom nosi i izvesna ograničenja. Troškovi proizvodnje lekova enkapsulacijom u lipozomima su relativno visoki. Osim toga, ustanovljeno je i da tokom transporta lekova, može doći do njihovog curenja iz lipozoma.<sup>239</sup> Jedno od ograničenja je i brza eliminacija lipozoma iz organizma putem fagocita u jetri i slezini.<sup>240</sup> Iako se lipozomi ponašaju poput biomembrana, organizam ih ipak prepoznaje kao strana tela. Ovaj problem je donekle prevaziđen smanjenjem dimenzija lipozoma i modifikacijom njihovog sastava.<sup>241</sup> U organizmu se najduže zadržavaju nenaelektrisani lipozomi dimenzija manjih od 0,05  $\mu\text{m}$ .<sup>242</sup> Eksperimentalno je ustanovljeno da lipozomi sastavljeni od fosfatidilholina iz jajeta i holesterola bivaju znatno sporije eliminisani iz organizma, a i ova formulacija je dodatno unapređivana.<sup>243</sup>

## 2.7. Ciklična voltometrija

Ciklična voltometrija je najčešće korišćena tehnika za dobijanje neophodnih informacija o elektrohemijским reakcijama. Prvi put je primenjena 1938, a detaljnije objašnjena 1948. godine.<sup>244</sup> Ciklična voltometrija predstavlja jednu od najznačajnijih metoda elektrohemijske analize. Primenjuje se, između ostalog, za ispitivanje

mehanizama organskih reakcija, kao i za izučavanje termodinamičkih, kinetičkih i elektrohemijskih osobina različitih redoks sistema. Sem toga, svoju primenu ova metoda ima i u oblastima poput nauke o materijalima, fotonici, citologiji, neurologiji i drugim.<sup>245</sup> Ciklična voltametrija je pogodna kako za inicijalna proučavanja potpuno novih sistema, tako i za proučavanja krajnje komplikovanih elektrodnih reakcija u organskoj hemiji, farmaciji i hemiji prirodnih proizvoda. Rezultati ciklovoltametrijskih eksperimenata mogu dati uvid u redoks mehanizme u kojima učestvuju biomolekuli i produbiti razumevanje mnogih *in vivo* redoks procesa.<sup>244</sup>

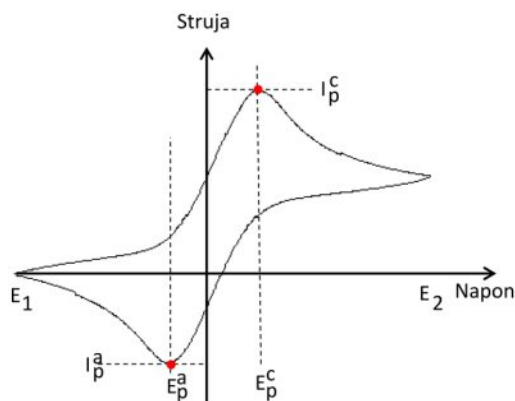
Ciklična voltametrija je elektrohemijska metoda koja se zasniva na cikličnoj promeni elektrodnog potencijala radne elektrode od početne vrednosti  $E_1$  do vrednosti  $E_2$  (slika 19).<sup>246</sup> Skeniranje se vrši odgovarajućom brzinom uz merenje vrednosti jačine struje nastale kao posledica razmene elektrona između površine elektrode i redoks-aktivnih vrsta prisutnih u rastvoru.<sup>247</sup>



**Slika 19.** Grafik promene elektrodnog potencijala u toku vremena.

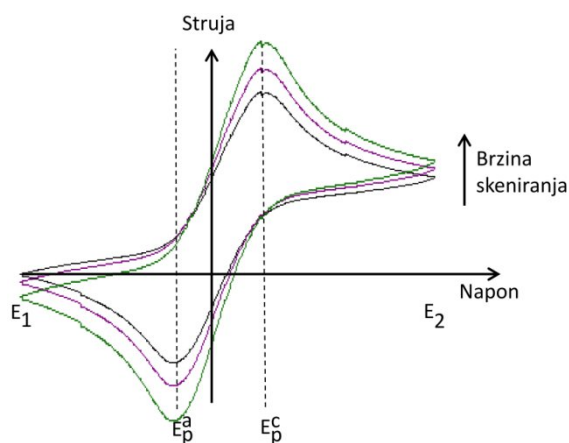
Snimanje ciklovoltamograma počinje se na potencijalu pri kome se ne dešavaju procesi oksidacije ili redukcije elektroaktivne vrste.<sup>247</sup> Potencijal se zatim menja u katodnom ili anodnom smeru potencijalskog prozora u kome se merenje vrši, do tačke na kojoj dolazi do razmene elektrona (oksidacije ili redukcije), pri čemu se na ciklovoltamogramu pojavljuje pik jačine struje. Kao rezultat prethodno navedenih elektrohemijskih procesa dobija se ciklični voltamogram prikazan na slici 20. Vreme snimanja jednog ciklusa zavisi od prozora potencijala i brzine skeniranja.<sup>246</sup>

Svaki ciklični voltamogram karakterišu struja pika i potencijal pika. Karakteristični pikovi koji se javljaju na cikličnom voltamogramu (obeleženi crvenim kružićima na slici 20) nastaju kao posledica formiranja koncentracionog gradijenta na površini elektrode, koji se ne može ukloniti usled difuzionih ograničenja.<sup>248</sup>



**Slika 20.** Izgled cikličnog voltamograma reverzibilnog procesa. Karakteristični maksimumi označeni su crvenom bojom.

Povećanjem brzine polarizacije elektrode, to jest brzine skeniranja, povećava se i intenzitet struje pika  $I_p$  (slika 21).<sup>249</sup> Za određivanje reverzibilnosti sistema su bitna dva parametra, odnos intenziteta pikova struje  $I_p^a/I_p^c$ , i razlika između potencijala pikova  $E_p^a - E_p^c$ .<sup>244</sup>



**Slika 21.** Povećanje intenziteta pika sa povećanjem brzine skeniranja kod potpuno reverzibilnog elektrohemijskog procesa. Ciklovoltamogram prikazan crnom bojom sniman je najmanjom brzinom, a ciklovoltamogram prikazan zelenom bojom sniman je najvećom brzinom skeniranja.

Svi elektrohemijski procesi mogu se podeliti na reverzibilne, ireverzibilne i kvazireverzibilne. Vrednost jačine struje pika kod reverzibilnih elektrohemijskih sistema data je Randles-Ševčikovom (Randles-Sevcik) jednačinom, koja za temperaturu od 25°C ima oblik<sup>248,250</sup>:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot A \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2} \cdot C_o \quad (29)$$

gde je  $I_p$  – vrednost granične difuzione struje (visina pika),  $\nu$  – brzina promene potencijala (brzina skeniranja) ( $Vs^{-1}$ ),  $n$  – broj razmenjenih elektrona,  $A$  – površina mikroelektrode ( $cm^2$ ),  $D$  – difuzioni koeficijent elektroaktivne vrste ( $cm^2/s$ ),  $C_o$  – koncentracija elektroaktivne vrste O u rastvoru ( $mol/cm^3$ ).

Odnos  $I_p^a/I_p^c$  za reverzibilni sistem iznosi 1, i nezavisan je od brzine polarizacije i koeficijenta difuzije. Ipak, ta nezavisnot nije apsolutna, već važi za dovoljno velike difuzione koeficijente (tj. za suviše male difuzine koeficijente proces neće biti reverzibilan). Sem ovoga, svaki snimljeni ciklični voltamogram za reverzibilne procese ima izvesne opšte karakteristike:<sup>244,246</sup>

- a. Razlika potencijala između pikova je:

$$\Delta E = E_p^a - E_p^c = \frac{59}{n} (mV) \quad (30)$$

- b. Intenzitet struje određenog pika proporcionalan je korenu brzine skeniranja  
c. Potencijal pika se ne menja sa promenom brzine skeniranja

Osim reverzibilnih, postoje i ireverzibilni sistemi. Prenos elektrona je kod njih spor. Vrednost jačine struje pika za ireverzibilan proces na 25°C data je jednačinom<sup>248,250</sup>:

$$I_p = 2,99 \cdot 10^5 \cdot (\alpha n)^{1/2} \cdot A \cdot (D \cdot \nu)^{1/2} \cdot C_o \quad (31)$$

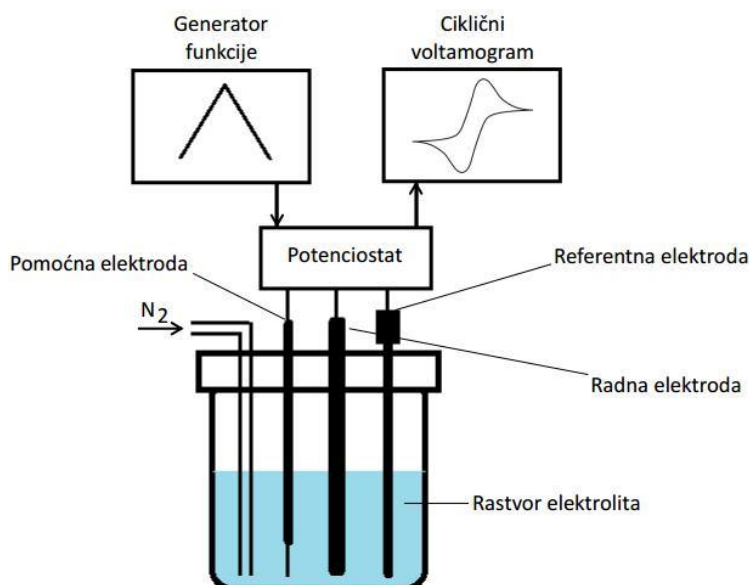
gde je  $\alpha$  koeficijent prenosa elektrona, i ima vrednost između 0 i 1.

Potencijal na kome se nalazi pik pri ireverzibilnom procesu zavisi od konstante brzine elektrodne reakcije. Za ireverzibilne procese je karakteristična velika razmaknutost između vrednosti potencijala na kojima se pojavljuju pikovi ( $\Delta E > 59/n$  mV), a često i potpuni izostanak pika u povratnom delu ciklovoltamograma.<sup>248</sup>

Između ova dva slučaja postoji veliki broj tzv. kvazireverzibilnih procesa. Kvazireverzibilni procesi zavise od brzine difuzije i kinetike elektrodnog procesa.



Za snimanje ciklovoltamograma koristi se potenciostat sa troelektrodnim sistemom koji se sastoji od radne, pomoćne i referentne elektrode (slika 22).<sup>251</sup>



**Slika 22.** Šematski prikaz sistema za cikličnu voltametriju.

U ćeliju za cikličnu voltametriju postavljene su tri elektrode i uvodnik za barbotiranje azota ili argona koji služi za uklanjanje kiseonika iz sistema. Uklanjanjem kiseonika eliminišu se voltametrijski talasi koji potiču od njegove redukcije, a koji često prekrivaju voltametrijske talase ispitivane elektroaktivne vrste, i na taj način otežavaju ispitivanje.<sup>250,252</sup>

Pravilan odabir radne elektrode je od ključnog značaja za eksperiment. Redoks potencijal molekula koji se analizira mora se nalaziti u opsegu potencijala u kome pozadinske struje, koje potiču od same elektrode neće ometati određivanje. Kao radne elektrode koriste se elektrode od zlata, srebra, staklastog ugljenika (dobijenog pirolizom fenol-formaldehidnih smola u inertoj atmosferi), platine, ugljeničnih vlakana utopljenih u polimernu matricu i drugih materijala.<sup>251</sup> Elektrode od platine i zlata, koje su među najčešće korišćenim radnim elektrodama, koriste se za ispitivanje kako organskih, tako i neorganskih supstancija, zbog toga što imaju visoku vrednost nadnapona za izdvajanje kiseonika, što omogućava skeniranje u široj oblasti anodnih potencijala. Nasuprot tome, niska vrednost nadnapona za izdvajanje vodonika limitira upotrebu ovakvih elektroda u široj oblasti katodnih potencijala što, između ostalog, zavisi i od pH vrednosti sredine u kojoj se vrši snimanje cikličnih voltamograma.

U nevodenim rastvorima, nadnapon kiseonika i vodonika nemaju uticaja na određivanje, ali umesto toga, značajan faktor postaje potencijal razlaganja nevodenog rastvarača i pomoćnog elektrolita. Takođe, eventualno prisutna voda koja čini nečistoću nevodenog rastvarača, sužava opseg potencijala u kome se vrši određivanje, u zavisnosti od količine prisutne vode.<sup>248</sup>

Uloga pomoćne elektrode je da omogući protok naelektrisanja (elektrona u spoljašnjem električnom kolu i jona kroz rastvor). Kao pomoćne elektrode najčešće se upotrebljavaju elektrode od inertnih materijala, kao što su plemeniti metali, grafit i staklasti ugljenik. Najčešće primenjivane pomoćne elektrode su platinska žica i mrežica.<sup>251</sup>

Referentna elektroda služi za merenje elektrodnog potencijala radne elektrode. Ova elektroda ima konstantan potencijal pri konstantnoj koncentraciji anjona koji su prisutni u teško rastvornoj soli kojom je metal od kog je izrađena prevučen na konstantnoj temperaturi, i na osnovu toga biva ustanovljen potencijal radne elektrode u datom sistemu.<sup>252</sup> U ovu svrhu se najčešće koriste zasićena kalomelova ili srebro/srebro-hloridna elektroda za ispitivanja u vodenim sistemima, dok se za nevodene rastvarače koristi Ag/Ag(I) elektroda (koja predstavlja srebrnu žicu u rastvoru AgNO<sub>3</sub> u osnovnom elektrolitu koji je primenjen za određivanja).<sup>249,251</sup> U slučaju alkalnih vodenih rastvora uobičajena je upotreba Hg/HgO elektrode ispunjene rastvorom odgovarajućeg hidroksida. U rastvorima hlorida može da se primeni i sama srebrna žica. Električni otpor sistema radna-referentna elektroda je takav da onemogućava protok električne struje upotrebom otpornika visoke otpornosti (preko 10<sup>11</sup>Ω). Elektromotorna sila troelektrodnog sistema definisana je jednačinom <sup>252</sup>:

$$E_{\text{primenjeno}} = E_r - E_{\text{ref}} + I \cdot R \quad (32)$$

gde su:  $E_r$  – potencijal radne elektrode,  $E_{\text{ref}}$  – potencijal referentne elektrode,  $I \cdot R$  – omski pad napona koji potiče od otpora rastvora koji se nalazi u voltametrijskoj ćeliji.

Osnovni elektrolit bi trebalo da ima što veći opseg potencijala u kome je elektro-neaktivan. Odabir rastvarača koji se koriste za pripremu rastvora zavisi od rastvorljivosti osnovnog elektrolita i analita, njegove polarnosti, fizičkih konstanti rastvarača i uslova pri kojima se merenje izvodi.<sup>251</sup> Veliki broj elektrohemijskih merenja se vrši u rastvoru pomoćnog elektrolita čija je koncentracija 50-100 puta viša od

koncentracije analita. Njegova osnovna uloga u sistemu je da omogući provođenje električne struje kroz rastvor povećanjem električne provodljivosti.<sup>252</sup>

## 2.8. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

Ultraljubičasta-vidljiva (UV-Vis, od eng. ultraviolet-visible) spektroskopija bavi se proučavanjem elektromagnetnog zračenja u opsegu talasnih dužina od 200 do 800 nm. Ovaj opseg može se dalje podeliti na blisku ultraljubičastu (200-400 nm) i vidljivu oblast (400-800 nm).<sup>253</sup> Pošto zračenje u navedenoj oblasti apsorbiraju elektroni, ova metoda naziva se i elektronska spektroskopija. Prva merenja apsorpcije svetlosti iz vidljivog dela spektra (kolorimetrija) izvršena su 1830. godine. Iako je ultraljubičasto zračenje otkriveno 1801. godine, usled nedostatka adekvatnih uređaja za njegovu detekciju, tek tridesetih i četrdesetih godina prošlog veka došlo je do potpunog razvoja UV-Vis spektroskopije.<sup>252</sup>

Prilikom apsorpcije zračenja odgovarajuće talasne dužine, elektroni iz stanja niže energije (osnovnog stanja) prelaze u stanje više energije (pobuđeno stanje). Apsorbovana energija odgovara razlici energija između ova dva stanja. Ovo više energijsko stanje je nestabilno, i višak energije se gubi u procesima relaksacije, poput emisije svetlosti. Najveća verovatnoća prelaska elektrona u molekulu je iz najviše popunjene molekulске orbitale (HOMO) u najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (LUMO). Kod većine molekula, popunjene molekulске orbitale sa najnižom vrednosti energije su  $\sigma$  orbitale, koje odgovaraju  $\sigma$  vezama.  $\pi$  orbitale imaju nešto veću vrednost energije, a orbitale u kojima su smešteni elektronski parovi koji ne učestvuju u vezivanju, nevezivne ( $n$ ) orbitale imaju još veću vrednost energije. Nepopunjene, odnosno antivezivne orbitale ( $\sigma^*$  i  $\pi^*$ ) imaju najveću vrednost energije.<sup>254</sup> U gotovo svim molekulima, elektroni mogu proći kroz nekoliko različitih prelaza između nivoa različite energije. Apsorpcijom zračenja u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra, pored elektronskih prelaza dolazi i do pobuđivanja vibracija i rotacija, za šta je potrebna znatno manja energija.<sup>252,253</sup> Pošto se može dogoditi veliki broj različitih prelaza, sa malom međusobnom energijskom razlikom, na UV-Vis spektru se opaža široka apsorpciona traka, koja je zapravo sačinjena od mnoštva vrlo usko razmaknutih linija, centriranih oko talasne dužine na kojoj se dešava najintenzivniji prelaz. Pošto su molekuli kod kojih se javlja apsorpcija svetlosti okruženi molekulima rastvarača, usled

njihove uzajamne interakcije i razmene energije, apsorpcioni maksimumi (pikovi) poprimaju gladak, kontinualni oblik.<sup>246</sup>

Što je veći broj molekula koji mogu apsorbovati svetlost date talasne dužine, to će veći biti i intenzitet pika na apsorpcionom spektru. Intenzitet apsorpcije definisan je pomoću Lamber-Berovog zakona (Lambert-Beer):<sup>253</sup>

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \times c \times l \quad (33)$$

gde je  $A$  apsorbancija,  $I_0$  intenzitet upadnog zračenja,  $I$  intenzitet zračenja nakon prolaska kroz uzorak,  $c$  koncentracija uzorka,  $l$  dužina putanje zračenja kroz uzorak, a  $\varepsilon$  molarni ekstinkcioni koeficijent. Molarni ekstinkcioni koeficijent predstavlja konstantu koja karakteriše datu hemijsku vrstu, u određenom rastvaraču, na određenoj talasnoj dužini.

U slučaju sistema koji sadrže više od jedne komponente (pod uslovom da među njima ne dolazi do interakcija), Lamber-Berov zakon se može proširiti, tako da apsorbancija biva aditivna<sup>246</sup>:

$$A = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i \times c_i \times l \quad (34)$$

U skladu sa Lamber-Berovim zakonom, kalibraciona kriva (apsorbancija prikazana u funkciji koncentracije) trebala bi biti prava linija. Međutim, u praksi dolazi do odstupanja od linearnosti. Odstupanje se može javiti jer ovaj zakon važi za niske koncentracije supstanci, pošto pri višim pojedinačne čestice date hemijske vrste prestaju da se ponašaju nezavisno jedna od druge. Kao rezultat njihovih interakcija, dolazi do promene vrednosti  $\varepsilon$ . Sem toga,  $\varepsilon$  može zavisiti i od indeksa refrakcije uzorka, koji ne mora biti konstantan pri većim koncentracijama. Takođe, do odstupanja od Lamber-Berovog zakona može doći i usled pojave hemijskih reakcija među prisutnim molekulima u rastvoru, ili konstrukcionih ograničenja samog uređaja.<sup>246</sup>

Veze i funkcionalne grupe u molekulu koje imaju sposobnost apsorpcije ultraljubičastog ili vidljivog zračenja nazivaju se hromofore.<sup>252</sup> Ukoliko su za hromofore direktno vezane zasićene grupe sa slobodnim elektronskim parovima (–OH, –NH<sub>2</sub>, –SH, –Cl), onda dolazi do pomeranja apsorpcije ka većim talasnim dužinama.

Takve grupe nazivaju se auksohrome. U zavisnosti od načina promene izgleda (položaj i intenzitet) apsorpcionog maksimuma na UV-Vis spektru, razlikuju se četiri efekta<sup>253</sup>:

*Batohromni efekat* – predstavlja pomeranje pika ka većim talasnim dužinama (crvenom delu spektra). Naziva se i crveni pomeraj.

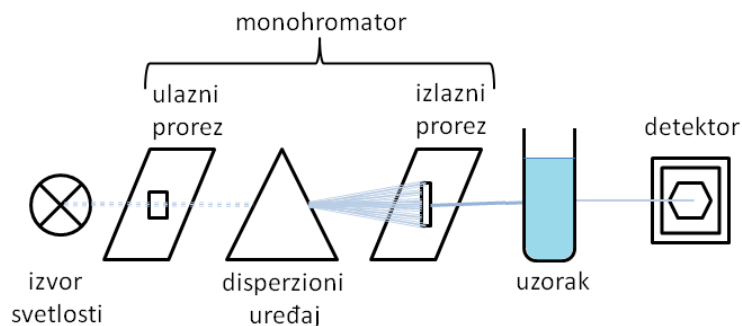
*Hipsohromni efekat* – predstavlja pomeranje pika ka manjim talasnim dužinama. Naziva se i plavi pomeraj

*Hiperhromni efekat* – predstavlja pojačanje apsorpcije

*Hipohromni efekat* – predstavlja smanjenje apsorpcije

Pri interpretaciji UV-Vis spektara, važno je obratiti pažnju na složenost spektra, njegov položaj u odnosu na vidljivu oblast, kao i na intenzitet i broj pikova koji se na njemu mogu opaziti. Mnoštvo traka koje se protežu i u vidljivu oblast obično ukazuje na postojanje konjugovanih i aromatičnih hromofora, dok mali broj pikova ukazuje na postojanje malog broja konjugovanih jedinica.<sup>254</sup> Identifikacija jedinjenja na osnovu UV-Vis spektara danas je olakšana postojanjem zbirke spektara velikog broja jedinjenja.

Najjednostavniji uređaj za detekciju UV-Vis zračenja je jednozračni fotometar.<sup>252</sup> Kod njega se primenom odgovarajućeg filtera selektuje svetlost određene talasne dužine koju emituje izvor. Snop svetlosti po prolasku kroz filter i uzorak dolazi do detektora. Kod ovakvih uređaja je potrebno najpre potpuno tamnim filterom izvršiti kalibraciju na propustljivost od 0 %, a zatim snimiti baznu liniju pomoću rastvora (slepa proba), koji sadrži sve potrebne komponente izuzev samog analita.<sup>246</sup> Zbog toga što se filter mora podesiti za svaku novu talasnu dužinu, a potom ponovo izvršiti kalibraciju i snimanje bazne linije, fotometri nisu pogodni za snimanje čitavog apsorpcionog spektra. Napredniji uređaji koriste monohromatore za odabir talasne dužine, i nazivaju se spektrofotometri (slika 23).<sup>252</sup> Njima je moguće snimiti čitav apsorpcioni UV-Vis spektar. Oni mogu biti jednozračni i dvozračni.<sup>246</sup> Dvozračni su pogodniji za upotrebu, pošto se kod njih slepa proba i uzorak nalaze na zasebnim putanjama svetlosti, a detektor je konstruisan tako da propustljivost uzorka koriguje za vrednost propustljivosti slepe probe.<sup>252</sup>



**Slika 23.** Šematski prikaz spektrofotometra. Prilagođeno iz literature.<sup>252</sup>

UV-Vis spektroskopija ima široku primenu u laboratorijskoj praksi. Ova metoda svoju popularnost, pored jednostavnosti i pristupačnosti opreme, duguje i činjenici da mnoga organska i neorganska jedinjenja apsorbuju svetlost u UV-Vis oblasti, ili se mogu modifikovati tako da se taj efekat postigne. UV-Vis spektroskopija je vrlo pogodna za kvantitativnu analizu, gde se nepoznata koncentracija datog analita jednostavno može očitati sa kalibracione prave. Sem toga, ova metoda najčešće se koristi za određivanje konstanti brzine i ravnoteže hemijskih reakcija, konstanti disocijacije, i različite rutinske enzimske testove.<sup>255</sup> Nedostaci primene ove metode ogledaju se u tome da je moguće proučavati samo jedinjenja koja apsorbuju svetlost u UV ili vidljivom delu spektra, pri čemu je moguć rad isključivo sa tečnim uzorcima. Dobijeni rezultati nekada mogu u značajnoj meri zavisiti od pH, temperature, prisustva nečistoća. Zbog teškoća u interpretaciji spektara složenih uzoraka, za identifikaciju nepoznatih komponenti je često potrebno osloniti se na pouzdanije metode.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Računarske metode

Za analizu sistema sa otvorenim ljuskama, kao što su slobodni radikali, neophodno je korišćenje neograničene metode (eng. unrestricted method) u okviru koje se koriste različite prostorne orbitale za sve elektrone, čak i za one elektrone koji su spareni.

#### 3.1.1. $\omega$ B97XD funkcional elektronske gustine

$\omega$ B97XD funkcional spada u grupu hibridnih funkcionala sa korekcijom za interakcije dugog dometa. Pošto ovaj funkcional dobro opisuje i jake i slabe interakcije, pogodan je za proračune kod kojih dolazi do formiranja i raskidanja kovalentnih, odnosno vodoničnih veza.<sup>256-262</sup> Ovakve interakcije su prisutne pri formiranju i raskidanju veza pre, odnosno nakon prelaznog stanja.

#### 3.1.2. M06-2X funkcional elektronske gustine

M06-2X funkcional je hibridni funkcional koji pripada grupi Minesota funkcionala (nazvanih po Univerzitetu na kome su razvijeni), jednih od najčešće korišćenih u DFT proračunima.<sup>263</sup> Kod ovog funkcionala, 32 empirijski optimizovana parametra uključena su u složeni funkcional izmene i korelacije elektrona.<sup>264</sup> M06-2X funkcional koristi se za termohemijske i kinetičke proračune. Posebno dobri rezultati dobijaju se primenom ovog funkcionala kod sistema koji uključuju organske radikale.<sup>265</sup>

#### 3.1.3. Bazisni skup 6-311++G(2d,2p)

6-311++G(2d,2p) je bazisni skup podeljene valentnosti kod koga se elektroni unutrašnjih ljuski prikazuju pomoću jedne kontrahovane funkcije, opisane pomoću šest primitivnih funkcija. Valentni elektroni kod ovog bazisnog skupa prikazuju se pomoću tri kontrahovane funkcije, pri čemu prvu čine tri, a drugu i treću po jedna primitivna funkcija. Da bi se uzela u obzir promena oblika orbitala u toku hemijske reakcije d orbitale su pridružene atomima ugljenika i kiseonika, a p orbitale atomima vodonika, dok su difuzne funkcije dodate svim atomima.

### 3.1.3. Model polarizabilnog kontinuuma

Model polarizabilnog kontinuuma (eng. polarizable continuum model, PCM) jedan je od najčešće korišćenih solvatacionih modela. Razvijan je od 1981. godine<sup>266</sup>. Kod PCM modela, rastvorena supstanca je opisana kvantnomehantički, a rastvarač je aproksimiran kao kontinuum bez strukture, čija je priroda definisana električnom permitivnošću,  $\epsilon$ , kao i nizom parametara.

Nedostatak ovog modela ogleda se u nemogućnosti preciznog opisa interakcije molekula rastvorene supstance i rastvarača, kao što je obrazovanje vodonične veze. Takođe, nije u mogućnosti da opiše prenos protona ili elektrona sa molekula rastvorene supstance na molekul rastvarača i obrnuto.

### 3.1.4. Kvantna teorija atoma u molekulima (QTAIM)

Topologija elektronske gustine analizirana je pomoću AIMALL programskog paketa.<sup>267</sup> Akcent QTAIM analize stavljen je na delove sistema od interesa u toku reakcije prenosa atoma vodonika, odnosno na dve ključne veze u tom procesu: vezu između atoma vodonika i kiseonika na hidrohionu ( $\text{H-O}^{\text{HQ}}$ ) koja se raskida i vezu između atoma vodonika i kiseonika na radikal (H-O<sup>rad</sup>) koja se formira.

## 3.2. Hemikalije

1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholin (DPPC) kupljen je od Bachem, (Švajcarska). Hloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) i 30 % vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kupljeni su od proizvođača Lach-Ner (Češka Republika). Gvožđe (II) sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), etanol, riboflavin i askorbinska kiselina kupljeni su od proizvođača Merck KGaA (Nemačka). AccuGENE dejonizovana 18 M $\Omega$  voda kupljena je od proizvođača Lonza (Belgija). Natrijum-nitroprusid ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ) kupljen je od proizvođača Kemika (Hrvatska). *N*-(ditiokarboksi)sarkozin, diamonijumova so (DTCS) kupljena je od proizvođača Chemos CZ (Češka Republika). 5-doksil-stearinska kiselina (5-DS) kupljena je od proizvođača Sigma-Aldrich (Sjedinjene Američke Države). Dietilentriaminpentasilicetna kiselina (DTPA) kupljena je od proizvođača Sigma-Aldrich (Švajcarska). Monobazni natrijum fosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), dvobazni natrijum fosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), hipoksantin i ksantin-oksidaza kupljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (Nemačka). 5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirrolin-*N*-



oksid (DEPMPO) kupljen je od proizvođača Focus Biomolecules (Sjedinjene Američke Države). Hemikalije potrebne za prečišćavanje DEPMPO, Kalijum–heksacijanoferat (III) ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), jonski izmenjivač DEAE Sephadex A-25 i aktivni ugalj kupljeni su od proizvođača Merck KGaA (Nemačka). Metanol je kupljen od proizvođača POCH (Poljska). Avarol je izolovan iz morskog sunđera *Dysidea avara* na Institutu za biomolekularnu hemiju, CNR-ICB, u Pucioliju – Napulj (Italija). Sve navedene hemikalije bile su analitičke čistoće i korišćene su bez prethodnog prečišćavanja, izuzev DEPMPO, koji je prečišćen u skladu sa procedurom opisanom u literaturi<sup>217</sup>, kao i avarola, prečišćenog u Institutu na kome je i izolovan.

### 3.3. Izolovanje avarola

Avarol je izolovan iz morskog sunđera *Dysidea avara* prikupljenog u napuljskom zalivu, u skladu sa prethodno opisanom procedurom.<sup>129</sup> Komadići tkiva sunđera *Dysidea avara* preliveni su dvostruko većom zapreminom etanola, nakon čega je izvršena homogenizacija u Daunsovom homogenizatoru. Homogenat je potom tri sata lagano mućkan, nakon čega je u smešu dodat etil-acetat. Ovako dobijeni ekstrakt osušen je pomoću anhidrovanog  $MgSO_4$ , nakon čega je rastvarač uparen do suva pod vakuumom. Avarol je identifikovan tankoslojnom hromatografijom, i dalje prečišćen primenom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC).

### 3.4. Sinteza avarolskih i 100 % DPPC lipozoma

Pored različitih korisnih svojstava po ljudsko zdravlje koje avarol poseduje, od posebnog značaja je i njegovo svojstvo da prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Ovo je važno zbog proučavanja mogućnosti njegove primene u prevenciji Alchajmerove bolesti na nivou eliminacije slobodnih radikala kao njenih potencijalnih uzročnika, a bez štetnih efekata po sam organizam. Međutim, problem koji se dodatno javlja jeste nerastvorljivost avarola u vodi, čime se isključuje mogućnost njegove distribucije do mozga putem krvi.<sup>268</sup> Direktno unošenje u mozak bilo bi rizično i terapijski nepraktično. Kao moguće rešenje za prevazilaženje ovog problema, avarol je moguće ugraditi u lipidne strukture kao što su lipozomi, koji bi, zahvaljujući svojoj polarnosti mogli znatno jednostavnije da transportuju avarol kroz vodenu sredinu.<sup>269,270</sup>

Avarolski lipozomi pripremljeni su od avarola (10 %) i DPPC (90 %) modifikovanom metodom tankog filma.<sup>227</sup> Ukupna masa DPPC i avarola iznosila je 2,5 mg. Avarol i DPPC rastvoreni su u smeši hloroforma i metanola (u zapreminskom odnosu 4:1, respektivno) u balonu sa okruglim dnom. Rastvarač je polako uparen na sobnoj temperaturi primenom vakuuma uparivača. Tanki film koji se formirao na zidovima balona hidratisan je sa 2 ml 18 MΩ dejonizovane vode u inkrementima od po 250 µl, pri čemu je nakon svakog inkrementa sadržaj balona vorteksovan 3 minuta, i potom 3 minuta bio izložen dejstvu ultrazvuka. Nakon toga, suspenzija je podvrgnuta sonikaciji u trajanju od 20 minuta u ultrazvučnoj kadi. Temperatura vode u ultrazvučnoj kadi kontrolisana je i regulisana dodatkom leda tako da ne prelazi 30 °C.

Ista procedura primenjena je i za dobijanje 100 % DPPC lipozoma, koji su tokom eksperimenata upotrebljeni kao referentni.

### **3.5. Ekstruzija lipozoma**

Iako je sonikacija relativno jednostavan postupak formiranja lipozoma, kontrola uslova kod ove tehnike je teško izvodljiva, usled čega se formiraju lipozomi nejednakih dimenzija i loše stabilnosti, a efikasnost enkapsulacije je niska. Kvalitet lipozoma može se poboljšati ekstruzijom. Ekstruzija je proces propuštanja multilamelarnih lipozoma kroz filter/membranu sa porama definisanih dimenzija, u cilju dobijanja suspenzije lipozoma čiji prosečni prečnik odgovara prečniku pora filtera/membrane.<sup>271</sup> Ekstruzijom je moguće proizvesti unilamelarne liposome u fiziološki značajnom opsegu dimenzija od 30 – 200 nm.<sup>272</sup> Tkiva imaju bolju propustljivost za liposome ovih dimenzija, u odnosu na liposome koji imaju veći prečnik. Sa druge strane, lipozomi pomenutih dimenzija se i sporije uklanjaju iz organizma, što je važno zbog mogućnosti produžene isporuke supstanci koje su u njim ugrađene/enkapsulirane.<sup>273</sup> U cilju dobijanja lipozoma uniformne veličine, suspenzija je ekstrudovana upotrebom Avanti Mini-Extruder seta, proizvođača Avanti polar lipids (Sjedinjene Američke Države), kroz membranu čija je veličina pora 100 nm. Za ekstruziju su korišćeni Hamilton špricevi zapremine 1 ml. Ekstruzija je vršena tako da je suspenzija lipozoma propuštena kroz membranu ukupno 21 put, s tim da je nakon poslednjeg prolaza zadržana u onom špricu iz kojeg ekstruzija nije započela.<sup>274</sup>

### **3.6. Dijaliza lipozoma**

Nakon ekstruzije, potrebno je prečistiti liposome od neugrađenih komponenti i eventualno prisutnih nečistoća. U tu svrhu može se koristiti nekoliko različitih tehnika poput dijalize i gel-filtracija, najčešće primenjivanih.<sup>272</sup> Dijaliza je tehnika prečišćavanja koja najmanje utiče na integritet lipozoma. Avarolski i referentni lipozomi dijalizovani su upotrebom Servapor MWCO 12 000 – 14 000 creva za dijalizu proizvođača SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka), propustljivog za molekule manje od 12-14 000 Da. Dijaliza je vršena 72 h u 300 ml dejonizovane vode na +4 °C na tamnom mestu, uz mešanje pomoću magnetne mešalice. Voda je menjana svakih 24 h. Nakon dijalize, suspenzija lipozoma je koncentrovana do ukupne zapremine od 250 µl pomoću vakuumnog koncentratora Concentrator plus proizvođača Eppendorf (Nemačka). Krajnja koncentracija lipozoma bila je 4 mM.

### **3.7. Određivanje veličine lipozoma**

U cilju određivanja veličine lipozoma, upotrebljena je tehnika dinamičkog rasejanja svetlosti (eng. dynamic light scattering, DLS).<sup>275</sup> Kod ove tehnike, uzorak lipozoma biva obasjan snopom laserskog zračenja, koje se odbija o površinu lipozoma koji se Braunovski kreću, nakon čega njegov intenzitet biva izmeren pod datim uglom. Intenzitet svetlosti menja se u toku vremena, usled kretanja lipozoma. Na osnovu promene intenziteta svetlosti u vremenu, izračunava se korelaciona funkcija. Daljom analizom ove funkcije dobijaju se informacije o raspodeli veličina čestica, pošto se čestice većih dimenzija kreću sporije od onih čije su dimenzije male.<sup>276</sup>

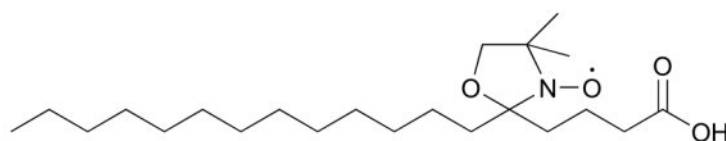
U svrhu DLS merenja, 100 µl avarolskih, odnosno 100 % DPPC lipozoma razblaženo je dejonizovanom vodom do zapremine od 1 ml. Određivanje veličine lipozoma izvršeno je na temperaturi od 25 °C.

### **3.8. EPR merenja**

#### **3.8.1. Spinsko obeležavanje lipozoma**

U cilju dobijanja informacija o dinamici lipidnog dvosloja avarolskih i referentnih lipozoma, upotrebljena je spinski obeležena masna kiselina 5-DS (slika 24). Ugrađivanjem ove spinske probe u lipozomske strukture može se, između ostalog, steći

uvid u lokalnu dinamiku njihovog neposrednog okruženja.<sup>277</sup> 5-DS je masna kiselina obeležena nitroksidnom grupom (koja je stabilni radikal) na petom mestu, koje se nalazi bliže početku doksilnog hidrofobnog repa. Ova spinska proba ugrađuje se u lipidni dvosloj bez formiranja zasebne faze.<sup>277,278</sup> Kretanje i ugaona orijentacija nitroksidne grupe u odnosu na graničnu dodirnu površinu lipida i vode direktno utiče na izgled EPR spektara ovih spinskih proba.<sup>279</sup> U zavisnosti od položaja doksil grupe duž ugljovodoničnog lanca, lipidni dvosloj može biti ispitivan na različitim dubinama. 5-DS se rutinski koristi za ispitivanje oblasti koja se nalazi blizu površine lipidnog dvosloja.<sup>280</sup>



**Slika 24.** Strukturna formula spinske probe 5-DS.

U cilju spinskog obeležavanja, 7,5  $\mu$ l 1 mM rastvora 5-DS u etanolu preneto je u mikrocentrifušku tubicu od 500  $\mu$ l i upareno do suva u vakuum koncentratoru. Nakon formiranja tankog filma 5-DS, preko njega je dodato 30  $\mu$ l avarolskih, odnosno referentnih 100 % DPPC lipozoma. Suspenzija je vorteksovana 2 minuta, nakon čega je 5 minuta inkubirana na sobnoj temperaturi. Potom je sadržaj mikrocentrifuške tubice prenet u teflonsko crevo prečnika 1 mm. Snimanje EPR spektara vršeno je pri sledećim uslovima: centar polja 3500 G, snaga mikrotalasa 10 mW, frekvencija mikrotalasa 9,85 GHz, modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 1 G, 5 akumulacija.

### **3.8.2. Određivanje anti-hidroksilne aktivnosti avarolskih lipozoma spin-trap EPR tehnikom**

U cilju kvantifikacije količine  $\cdot$ OH radikala, kao i proučavanja kinetike redukcije signala DEPMPO/OH spin-adukta,  $\cdot$ OH radikal je generisan u Fentonovoj reakciji.<sup>216,281</sup> Spin-trap DEPMPO je odabran zbog svoje visoke selektivnosti i dugog polu-života DEPMPO/OH spinskog adukta (132 minuta).<sup>282</sup> Kako bi se izbegao uticaj prirodnog procesa degradacije DEPMPO/OH spin-adukta, kao i uticaj njegove eventualne interakcije sa avarolom na EPR signal, bilo je važno snimiti EPR spektar odmah nakon iniciranja Fentonove reakcije, što je u ovom slučaju iznosilo 2 minuta.

U 26  $\mu\text{l}$  suspenzije avarolskih lipozoma dodato je 2  $\mu\text{l}$  vodenog rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  (finalna koncentracija u ispitivanom uzorku iznosila je 0,35 mM) i 1  $\mu\text{l}$  rastvora DEPMPO (finalna koncentracija iznosila je 3,5 mM). Po dodatku 1  $\mu\text{l}$  vodenog rastvora  $\text{FeSO}_4$  (finalna koncentracija iznosila je 0,15 mM), smeša je prenetu u teflonsko crevo prečnika 1 mm, i EPR spektar je snimljen 2 minuta po dodatku  $\text{FeSO}_4$ , pri sledećim uslovima: centar polja 3500 G, snaga mikrotalasa 10 mW, frekvencija mikrotalasa 9,85 GHz, modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 1 G, 1 akumulacija.

### **3.8.3. Određivanje anti-superoksidne aktivnosti avarolskih lipozoma spin-trap EPR tehnikom**

U svrhu kvantifikacije  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , kao i proučavanja kinetike redukcije signala DEPMPO/OOH spin-adukta, upotrebljen je sistem koji se sastojao iz avarolskih, odnosno 100 % DPPC lipozoma u prisustvu hipoksantina/ksantin-oksidaze i spin-trapa DEPMPO.<sup>283</sup> Ovaj spin-trap odabran je zbog pouzdane interakcije sa  $\text{O}_2^{\bullet-}$  radikalima, pri čemu nastaje spinski adukt DEPMPO/OOH prihvatljivo dugog vremena polu-života (barem 17 minuta).<sup>284</sup>

Hipoksantin/ksantin-oksidazni generatorski sistem upotrebljen je umesto riboflavin/svetlost generatorskog sistema (jednog od najčešće korišćenih) za dobijanje  $\text{O}_2^{\bullet-}$  radikala jer je poznato da flavinska grupa iz molekula riboflavina pri fiziološkim uslovima može postojati i u semihinonskom obliku.<sup>285</sup> Postoje eksperimentalni dokazi o tome da riboflavin, upravo kroz svoj flavinski segment, može formirati kompleks sa molekulima hidrohina (prisutnih kao segment molekula avarola).<sup>286</sup> Imajući u vidu ove činjenice, moglo se očekivati da bi došlo do reakcije između hidrohinske grupe avarola i flavinske grupe riboflavina, pri čemu bi došlo do povećane proizvodnje  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , što je bilo poželjno izbeći.

U mikrocentrifuškoj tubici pripremljen je uzorak koji je sadržao 40  $\mu\text{l}$  suspenzije lipozoma (bilo avarolskih ili 100 % DPPC), 8,7  $\mu\text{l}$  0,1 M fosfatnog pufera (pH 7,4), 3,5  $\mu\text{l}$  hipoksantina (finalna koncentracija iznosila je 0,4 mM), 5  $\mu\text{l}$  DTPA (finalna koncentracija iznosila je 1 mM) i 2  $\mu\text{l}$  spin-trapa DEPMPO (finalna koncentracija iznosila je 3,5 mM). Uzeto je 29,2  $\mu\text{l}$  ovakve smeše, i u nju je dodato 0,8  $\mu\text{l}$  ksantin-oksidaze (finalna koncentracija bila je 0,4 internacionalne jedinice po ml). Nakon toga, smeša je prenetu u teflonsko crevo prečnika 1 mm. Dva minuta po dodatku ksantin-

oksidaze snimljen je EPR spektar, pri sledećim uslovima: centar polja 3500 G, snaga mikrotalasa 10 mW, frekvencija mikrotalasa 9,85 GHz, modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 1 G, 5 akumulacija.

Za potrebe kinetičkih studija, upotrebljen je i riboflavin/svetlost generatorski sistem.<sup>216</sup> U mikrocentrifuškoj tubici je pomešano 18,5  $\mu$ l suspenzije lipozoma (avarolskih ili 100 % DPPC) sa 5  $\mu$ l 24 mM vodenog rastvora DTPA (finalna koncentracija bila je 4 mM) i 1  $\mu$ l 100 mM DEPMPO. Po dodatku 7,5  $\mu$ l 3 mM vodenog rastvora riboflavina (finalna koncentracija iznosila je 0,75 mM), smeša je ozračena ultraljubičastim svetlom snage 30 W u trajanju od 30 sekundi. Smeša je potom prenetu u teflonsko crevo prečnika 1 mm, i snimljen je EPR spektar pri sledećim uslovima: centar polja 3500 G, snaga mikrotalasa 10 mW, frekvencija mikrotalasa 9,85 GHz, modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 1 G, 5 akumulacija.

#### **3.8.4. Određivanje anti-azot-monoksidne aktivnosti avarolskih lipozoma spin-trap EPR tehnikom**

U cilju proučavanja uticaja avarola na redukciju NO<sup>•</sup> radikala, u suspenziju avarolskih, odnosno 100 % DPPC lipozoma, dodat je natrijum-nitroprusid, kao generator NO<sup>•</sup> radikala, dok je kao EPR spin-trap upotrebljen kompleks Fe(DTCS)<sub>2</sub>.

U mikrocentrifuškoj tubici pomešano je 19  $\mu$ l suspenzije avarolskih, odnosno 100 % DPPC lipozoma i 6  $\mu$ l unapred pripremljenog Fe(DTCS)<sub>2</sub> kompleksa (finalna koncentracija iznosila je 0,1 M). Nakon što je dodato 5  $\mu$ l vodenog rastvora natrijum-nitroprusida (finalna koncentracija iznosila je 9 mM), uzorak je prebačen u teflonsko crevo prečnika 1 mm. Dva minuta po dodatku rastvora natrijum-nitroprusida, snimljen je EPR spektar pri sledećim uslovima: centar polja 3500 G, snaga mikrotalasa 10 mW, frekvencija mikrotalasa 9.85 GHz, modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 1 G.

#### **3.8.5. Određivanje anti-askorbil radikalske aktivnosti avarola**

Pošto je askorbil radikal, kako u fiziološkim uslovima tako i u rastvoru DMSO, dovoljno stabilan, moguće ga je detektovati EPR metodom bez upotrebe spin-trapa. Pošto je avarol dobro rastvoran u DMSO, za ispitivanje anti-askorbil radikalske aktivnosti upotrebljen je DMSO rastvor askorbil radikala, u skladu sa prethodno

opisanom procedurom.<sup>287</sup> U mikrocentrifuškoj tubici je u 5  $\mu$ l vodenog rastvora EDTA (finalna koncentracija iznosila je 0,2 mM) dodato 0,5  $\mu$ l vodenog rastvora FeCl<sub>3</sub> (finalna koncentracija iznosila je 7  $\mu$ M), pri čemu je formiran Fe(III)-EDTA kompleks. Zatim je u ovu smešu dodato 49,5  $\mu$ l rastvora avarola u DMSO (finalna koncentracija iznosila je 1,5 mM). Odatle je uzeto 27,5  $\mu$ l smeše i preneto u novu mikrocentrifušku tubicu, nakon čega je u nju dodato 2,5  $\mu$ l rastvora askorbinske kiseline u DMSO (finalna koncentracija iznosila je 0,2 mM). EPR spektar snimljen je 2 minuta po dodatku askorbinske kiseline, pri sledećim uslovima: centar polja 3500 G, snaga mikrotalasa 10 mW, frekvencija mikrotalasa 9.85 GHz, modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 1 G.

Kontrolni spektri dobijeni su snimanjem uzorka koji je umesto rastvora avarola sadržao istu zapreminu DMSO.

### 3.8.6. Simulacije EPR spektara

Kako bi se dobio što precizniji uvid u količinu slobodnoradikalnih vrsta u ispitivanim sistemima, snimljeni EPR spektri su kompjuterski simulirani upotrebom softvera Bruker SpinFit. Rezultati dobijeni dvostrukom integracijom simuliranih EPR spektara upotrebljeni su potom za izračunavanje antiradikalne aktivnosti avarola. Kompjuterske simulacije izvršene su upotrebom sledećih parametara:

*DEPMPO/OH adukt*:  $a_P=46.7\text{G}$ ,  $a_N=13.64\text{G}$ ,  $a_{H\beta}(1)=12.78\text{G}$ ;

*DEPMPO/OOH adukt*:

izomer I (55 %):  $a_P=50.15\text{ G}$ ,  $a_N=13\text{ G}$ ,  $a_{H\beta}(1)=11.3\text{ G}$ ,  $a_{H\gamma}(1)=0.85\text{ G}$ ,  $a_{H\gamma}(1)=0.35\text{ G}$ ,  $a_{H\gamma}(3)=0.53\text{ G}$ ;

izomer II (37 %):  $a_P=48.68\text{ G}$ ,  $a_N=13.8\text{ G}$ ,  $a_{H\beta}(1)=0.88\text{ G}$ ,  $a_{H\gamma}(1)=10.2\text{ G}$ ,  $a_{H\gamma}(1)=0.41\text{ G}$ ,  $a_{H\gamma}(1)=0.34\text{ G}$ ;

izomer III (8 %):  $a_P=40.8\text{ G}$ ,  $a_N=13.3\text{ G}$ ,  $a_{H\beta}(1)=1.5\text{ G}$ ,  $a_{H\gamma}(1)=10\text{ G}$ ;

*NO-Fe(DTCS)<sub>2</sub> adukt*:  $a_N=12.51\text{ G}$ ;

*Askorbil radikal*:  $a_H(1)=1.84\text{ G}$ .

### 3.8.7. Provera integriteta lipozoma

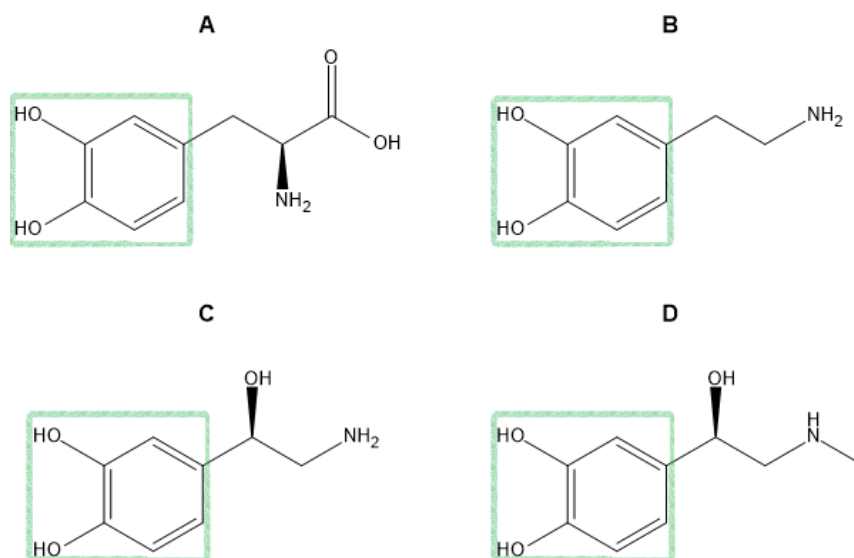
Pošto rezultati molekularnih simulacija ukazuju na to da lipozomi mogu biti skloni interakciji sa slobodnoradikalnim vrstama, pri čemu dolazi do promene karakteristika njihove membrane, posebno fluidnosti, izvršena je provera integriteta lipozoma pri oksidativnoj degradaciji izazvanoj  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{NO}\cdot$  i askorbil radikalima.<sup>288–290</sup> 100 % DPPC i avarolski lipozomi obeleženi su pomoću 5-DS spinske probe, nakon čega je izračunat parametar uredenosti ( $S$ ), pre i posle generisanja pomenutih radikala, prema prethodno opisanim procedurama.

## 3.9. Ciklovoltametrijski eksperimenti

Pošto avarol može potencijalno da se koristi u terapiji neurodegenerativnih oboljenja, pogodno je ustanoviti da li i na koji način on može interagovati sa neurotransmiterima prisutnim u moždanom tkivu. U tu svrhu odabrana je  $L$ -dopa (to jest levodopa), poznata kao prekursor kateholaminskih neurotransmitera (dopamina, norepinefrina i epinefrina).<sup>25</sup> To je endogeni neurotransmiter i neuromodulator, rastvoran u vodi, koji se koristi za lečenje simptoma Parkinsonove bolesti.<sup>291–293</sup> Po unošenju u organizam,  $L$ -dopa biva apsorbovana iz gastrointestinalnog trakta u krvotok, a po pristizanju do moždanog tkiva, prolazi krvno-moždanu barijeru transportom odgovarajućim nosačima.<sup>294</sup> U moždanom tkivu biva transformisana u dopamin.<sup>295</sup>

Svi kateholaminski neurotransmiteri imaju zajedničku funkcionalnu grupu – kateholnu grupu (slika 25). Zbog biološkog značaja kateholnih jedinjenja, njihova elektrohemija je detaljno proučavana.<sup>26</sup> Njihovo elektrohemijsko ponašanje zavisi od polarnosti rastvarača, prirode pomoćnog elektrolita, prisustva aditiva kiselog ili baznog tipa, vodoničnog vezivanja i formiranja jonskih veza.<sup>296</sup> Najveći deo dosadašnjih istraživanja odnosio se na elektrohemijsku detekciju jednog ili više neurotransmitera u vodenoj sredini.<sup>297,298</sup> Najveći izazovi koji su tom prilikom uočeni odnose se na malu brzinu transfera elektrona, adsorpciju na površini elektrode čime ona biva pasivizirana, i prisustvo interferenata u rastvoru elektrolita.





**Slika 25.** L-dopa (A), prekursor kateholaminskih neurotransmitera dopamina (B), norepinefrina (C) i epinefrina (D). Kateholna grupa kod ovih jedinjenja obeležena je zelenom bojom.

Prema literaturnim podacima, detekcija kateholnih jedinjenja u vodenoj sredini može biti poboljšana upotrebom elektroda čija je površina modifikovana jedinjenjima sa hinonskom funkcionalnom grupom. Pretpostavljeni mehanizam kojim se ove modifikacije vrše jeste autokataliza od strane adsorbovane vrste (katalizatora), koja može biti fizisorbovani hinon, sam katehol ili hemisorbovani hinon.<sup>299</sup> Ipak, potrebno je voditi računa o količini upotrebljenog modifikatora. Ukoliko je hinon prisutan u desetostruko većoj količini u odnosu na dopamin, detekcija dopamina može biti otežana.<sup>300</sup>

Avarol i avaron su elektrohemijski već proučavani, kako u protičnim<sup>301</sup>, tako i u aprotičnim rastvaračima<sup>302,303</sup>. Pošto se smatra da je nosilac biološke aktivnosti avarola zapravo njegov hidrohinski segment (dok seskviterpenoidni igra marginalnu ulogu)<sup>2</sup>, dobijene rezultate za sistem avarol/L-dopa potrebno je uporediti sa rezultatima za sistem hidrohinon/L-dopa. Primenom ciklične voltametrije je izvršena kvantifikacija interakcije avarola, odnosno hidrohina sa L-dopom u zavisnosti od njihove koncentracije u rastvoru.

Elektrohemijski eksperimenti izvedeni su u troelektrodnoj elektrohemijskoj ćeliji. Elektroda od staklastog ugljenika upotrebljena je kao radna elektroda, dok je

referentna elektroda bila Ag/AgCl (3M KCl), a platinska folija je upotrebljena kao pomoćna elektroda. Merenja su izvršena pomoću Autolab mernog uređaja (Autolab PGSTAT302 N, Metrohm-Autolab BV, Holandija). Elektrohemijsko ponašanje L-dope u prisustvu hidrohinona ispitivano je u 0,1 M fosfatnom puferu. Usled slabe rastvorljivosti avarola u vodi, ispitivanje njegovih interakcija sa L-dopom vršeno je u smeši fosfatnog pufera i etanola (u zapreminskom odnosu 1:1), u skladu sa prethodno opisanom procedurom.<sup>301</sup>

### **3.10. UV-Vis eksperimenti**

UV-Vis spektri L-dope u prisustvu avarola, odnosno hidrohinona snimljeni su u 0,1 M fosfatnom puferu (za sistem sa hidrohinonom) i smeši ovog pufera i etanola u zapreminskom odnosu 1:1 (za sistem koji je sadržao avarol). Koncentracija L-dope uvek je iznosila 0.5 mM, dok su koncentracije avarola i hidrohinona bile u opsegu od 0,05 do 0,5 mM. Snimljeni su i spektri svake supstance pojedinačno, u koncentraciji od 0,5 mM. Sva snimanja izvršena su na UV-Vis spektrofotometru Thermo Scientific: Evolution 220, u opsegu talasnih dužina od 200 do 320 nm.

## 4. Rezultati i diskusija

### 4.1. Teorijski rezultati

Svi proračuni koji se odnose na interakciju hidrohina sa hidroksilnim i hidroperoksilnim radikalom izvršeni su u Gaussian 09 programskom paketu<sup>304</sup>, na uωB97XD/6-311++G(2d,2p) nivou. U svim proračunima je korišćena ultrafina mreža za integraciju. Oba optimizovana prelazna stanja poseduju po jednu imaginarnu frekvenciju.

Proračuni koji se odnose na interakciju hidrohina sa metoksi radikalom izvršeni su na uM06-2X/6-311++G(d,p) nivou teorije.<sup>264,305–308</sup> Ovo je učinjeno zbog toga što je od ranije poznato da M06-2X funkcional elektronske gustine veoma dobro opisuje energijske promene pri onim reakcijama u kojima učestvuju organski radikali.<sup>265</sup>

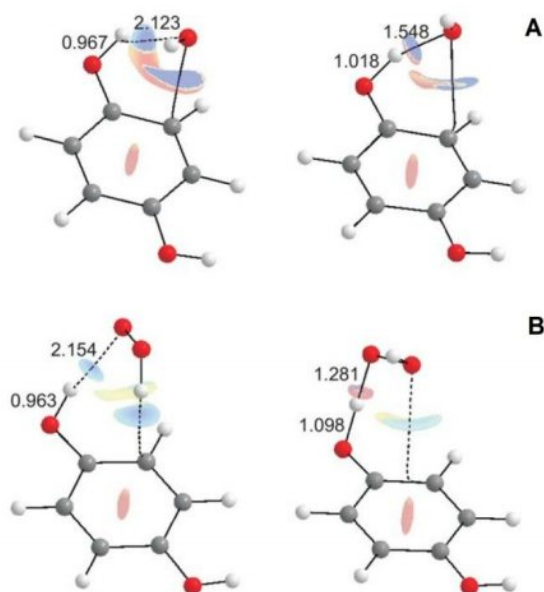
Proračuni duž puta minimalne energije potvrđuju da optimizovana prelazna stanja povezuju reaktante i proizvode željenih reakcija. Kako bi se obezbedilo što manje odstupanje od puta minimalne energije, Hesijan je izračunat u svakoj tački na putu od prelaznog stanja ka reaktantima i proizvodima.

Prilikom uzajamnog približavanja hidrohina i hidroksilnog/hidroperoksilnog radikala, dolazi do formiranja vodonične veze, pri čemu nastaje predreakcioni kompleks  $HQ \cdots O(O)H$  (slika 26). Nakon dostizanja prelaznog stanja, nastali proizvodi formiraju postreakcioni kompleks kod koga su oni takođe povezani vodoničnom vezom,  $HQ(-H) \cdots HO(O)H$ . Optimizovane strukture stacionarnih tačaka prikazane su na slici 26. Redukovani gradijent elektronske gustine ( $s$ ) izračunava se na osnovu gustine i njenog prvog izvoda. To je bezdimenziona funkcija, koja se koristi da opiše odstupanje od homogene raspodele elektrona. U oblastima daleko od atoma, u kojima funkcija eksponencijalno opada ka nuli,  $s$  će imati visoke pozitivne vrednosti. U oblastima kovalentne veze i nekovalentnih interakcija, vrednosti  $s$  će biti male, bliske nuli. Da bi se ustanovilo o kojoj se vrsti interakcija radi, koristi se znak Hesijana elektronske gustine. On se može upotrebiti za razlikovanje vezivnih ( $\lambda_2 < 0$ ) i nevezivnih ( $\lambda_2 > 0$ ) interakcija. Jačina interakcije određena je gustinom. Veća vrednost gustine na mestu nekovalentne interakcije ukazuje na njenu veću jačinu. Iz tog razloga, korisno je ispitivati vrednost  $s$  u funkciji  $\rho \cdot \text{znak}(\lambda_2)$ . Na slici 26 su prikazane i izopovršni

redukovanog gradijenta elektronske gustine, kako bi prisustvo vodoničnih veza bilo dodatno naglašeno:

$$s = \frac{1}{2(3\pi^2)^{1/3}} \frac{|\nabla\rho|}{\rho^{4/3}} \quad (35)$$

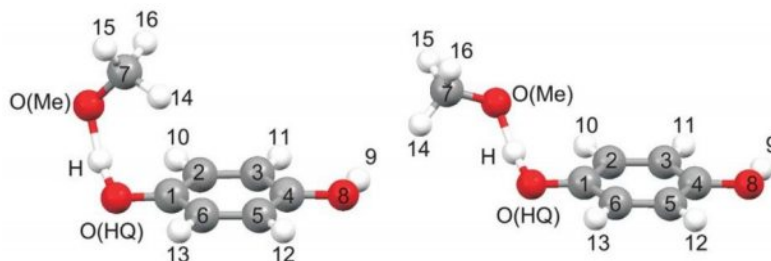
za  $s = 0,5$ , i prikazana je funkcija  $\rho \cdot \text{znak}(\lambda_2)$ , pri čemu se  $\rho$  odnosi na elektronsku gustinu, a  $\lambda_2$  je srednja svojstvena vrednost Hesijana. U literaturi<sup>309</sup> je već ranije pokazano da ovakav prikaz verno odslikava vodonične veze i nekovalentne interakcije (one koje se smatraju slabim u odnosu na kovalentne veze). Za prikaz ovih veza namerno je odabrana vrednost  $s = 0,5$ , pošto vodonične veze srednje jačine prisutne u  $\text{HQ} \cdots \text{O}(\text{O})\text{H}$  predstavljaju relativno slabe interakcije u poređenju sa kovalentnim O-H vezama, i karakteriše ih niska vrednost  $s$ , dok je negativna vrednost  $\lambda_2$  karakteristična za vezivne interakcije.



**Slika 26.** Vodonično vezani predreakcioni kompleksi (levo) i prelazna stanja (desno) za reakciju apstrakcije atoma vodonika sa hidrohinona od strane hidroksilnog (A), odnosno hidroperoksilnog radikala (B). Prikazane su i izopovršice redukovane gustine (redukovani gradijent vrednosti 0,5, i elektronska gustina niža od 0,1 a.u.) sa prikazanom funkcijom  $\rho \cdot \text{znak}(\lambda_2)$  u opsegu [-0,02 (plavo), 0,02 (crveno)].  $\text{O}^{\text{HQ}}/\text{O}^{\text{rad-}}$  H rastojanja data su u angstromima. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>310</sup>

Regioni u kojima dolazi do privlačnih interakcija između vodonikovog atoma i akceptora vodonične veze u O–H ··· O fragmentima (slika 26) prikazani su plavom bojom. Vodonične veze kod predreakcionog kompleksa i prelaznog stanja formirane sa hidroksilnim radikalom označene su tamnom nijansom plave boje, pošto su jače od onih koje se formiraju kod hidroperoksil radikala u istom slučaju. Druge stacionarne tačke, izuzev predreakcionog kompleksa, prelaznog stanja i postreakcionog kompleksa, nisu uočene. Već na osnovu toga može se zaključiti da apstrakcija atoma vodonika iz hidrohina od strane hidroksilnog/hidroperoksilnog radikala predstavlja elementarnu reakciju.

Kod interakcije hidrohina sa metoksi radikalom, optimizovana su prelazna stanja kod kojih reaktanti mogu da zauzmu dve različite orijentacije, označene sa *cis*, odnosno *trans* (slika 27). Kod *cis* konformera, blizina hidrohinskog prstena metil grupi omogućuje njihovu interakciju, dok kod *trans* konformera ona izostaje. Obe strukture su identifikovane kao prelazna stanja, usled postojanja jedne imaginarne frekvencije koja odgovara prenosu atoma vodonika između hidrohina i metoksi radikala. Za potrebe QTAIM analize najpre su izračunati drugi izvodi energije po prostornim koordinatama za 61/74 i 81/98 tačaka u povratnom i direktnom smeru reakcije duž puta minimalne energije za *cis/trans* sistem. Svaka peta tačka upotrebljena je za topološku analizu. Krajnje tačke u svakom smeru takođe su uzete u obzir. Pošto se najznačajnije promene elektronske strukture dešavaju u blizini prelaznog stanja, posmatrana je i svaka tačka do desete u pravcu ka reaktantima, odnosno do petnaeste tačke u smeru ka proizvodima. Dodatnih pet tačaka posmatrano je u smeru ka proizvodima zbog nešto izraženijih energijskih promena u ovoj oblasti.



**Slika 27.** Optimizovane strukture prelaznih stanja za reakciju prenosa atoma vodonika sa molekula hidrohina na metoksi radikal: *cis* (levo) i *trans* (desno) oblik.

Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>311</sup>

#### 4.1.1. Reakcija hidrohina sa hidroksilnim radikalom

Energijska barijera za reakciju hidrohina sa hidroksilnim radikalom je veoma niska, i iznosi svega 1 kJ/mol. Ovako male vrednosti energijske barijere ukazuju na strukturnu sličnost prelaznog stanja i predreakcionog kompleksa, što je moguće uočiti na slici 26. Za povratnu reakciju, ova vrednost iznosi 157 kJ/mol. Razlika u energiji između prelaznog stanja i predreakcionog kompleksa izlazi iz opsega tačnosti DFT metoda, ali je očigledno niska, posebno u poređenju sa energijom potrebnom da se dogodi povratna reakcija.

Odabrana svojstva predreakcionog kompleksa i prelaznog stanja prikazana su u tabeli 1. Sa dostizanjem vrha barijere na hiperpovršni potencijalne energije, rastojanje  $r(\text{O}^{\text{HQ}}-\text{O}^{\text{rad}})$  biva kraće za 0,248 Å. Uz to,  $\text{H}-\text{O}^{\text{HQ}}$  veza postaje nešto slabija, dok  $\text{H}-\text{O}^{\text{rad}}$  veza biva nešto jača. Ova pojava odražava se u promenama dužina ovih veza, elektronskim gustinama i njihovim Laplasijanima u BCP, kao i u promeni njihove eliptičnosti i delokalizacionih indeksa. Delokalizacioni indeks u slučaju predreakcionog kompleksa ima vrednost nižu od 1,00, što ukazuje na izraženu polarnost  $\text{O}^{\text{HQ}}-\text{H}$  veze. Pri dostizanju prelaznog stanja, vrednosti spinske i elektronske gustine, zapremine i dipolnog momenta atoma vodonika se smanjuju. Do toga dolazi jer se prelaz iz predreakcionog kompleksa do prelaznog stanja ne dešava premeštanjem čitavog atoma vodonika, pošto sa protonom ka atomu radikalskog kiseonika prelazi samo deo negativnog naelektrisanja. Odvojeno kretanje pozitivnog i negativnog naelektrisanja ukazuje na to da se apstrakcija vodonikovog atoma iz molekula hidrohina posredstvom hidroksilnog radikala, što je primer elementarne reakcije, dešava putem PCET mehanizma.<sup>180</sup> Međutim, raspoloživi podaci su nedovoljni da bi se ustanovilo da li kretanje protona prouzrokuje prelazak elektrona, ili je proces obrnut.

**Tabela 1.** Reakcija hidrohinona sa hidroksilnim radikalom. Odabrana svojstva kompleksa reaktanata, odnosno prelaznog stanja: međuatomsko rastojanje ( $r$ ), elektronska gustina ( $\rho$ ) u kritičnoj tački veze O–H, Laplasijan elektronske gustine ( $\nabla^2\rho$ ) u kritičnoj tački O–H veze, eliptičnost elektronske gustine ( $\varepsilon$ ) u kritičnoj tački O–H veze, Delokalizacioni indeks ( $DI$ ) O–H veza, naelektrisanje ( $q$ ), zapremina ( $V$ ) i dipolni moment ( $d$ ) atoma vodonika koji podleže transferu. Zapremina je izračunata uzimajući u obzir prostor ograničen interatomskim površima i izopovršima  $\rho = 0,002$  a.u. Sve vrednosti date su u atomskim jedinicama izuzev dužina veza, izraženih u Å. Svojstva atoma kiseonika predstavljena su prema redosledu O<sup>HQ</sup>/O<sup>rad</sup>. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>310</sup>

Parametar	Kompleks reaktanata	Prelazno stanje
$r(\text{O}^{\text{HQ}}-\text{O}^{\text{rad}})$	2,767	2,483
$r(\text{O}-\text{H})$	0,967/2,123	1,018/1,548
$\rho_{\text{BCP}}(\text{O}-\text{H})$	0,366/0,020	0,307/0,069
$\nabla^2\rho_{\text{BCP}}(\text{O}-\text{H})$	-2,791/0,076	-2,215/0,145
$\varepsilon(\text{O}-\text{H})$	0,020/0,474	0,012/0,025
$DI(\text{O}-\text{H})$	0,56/0,04	0,41/0,15
spinska gustina (H)	0,0004	-0,0025
$q(\text{H})$	0,626	0,660
$V(\text{H})$	13,79	9,42
$d(\text{H})$	0,140	0,095

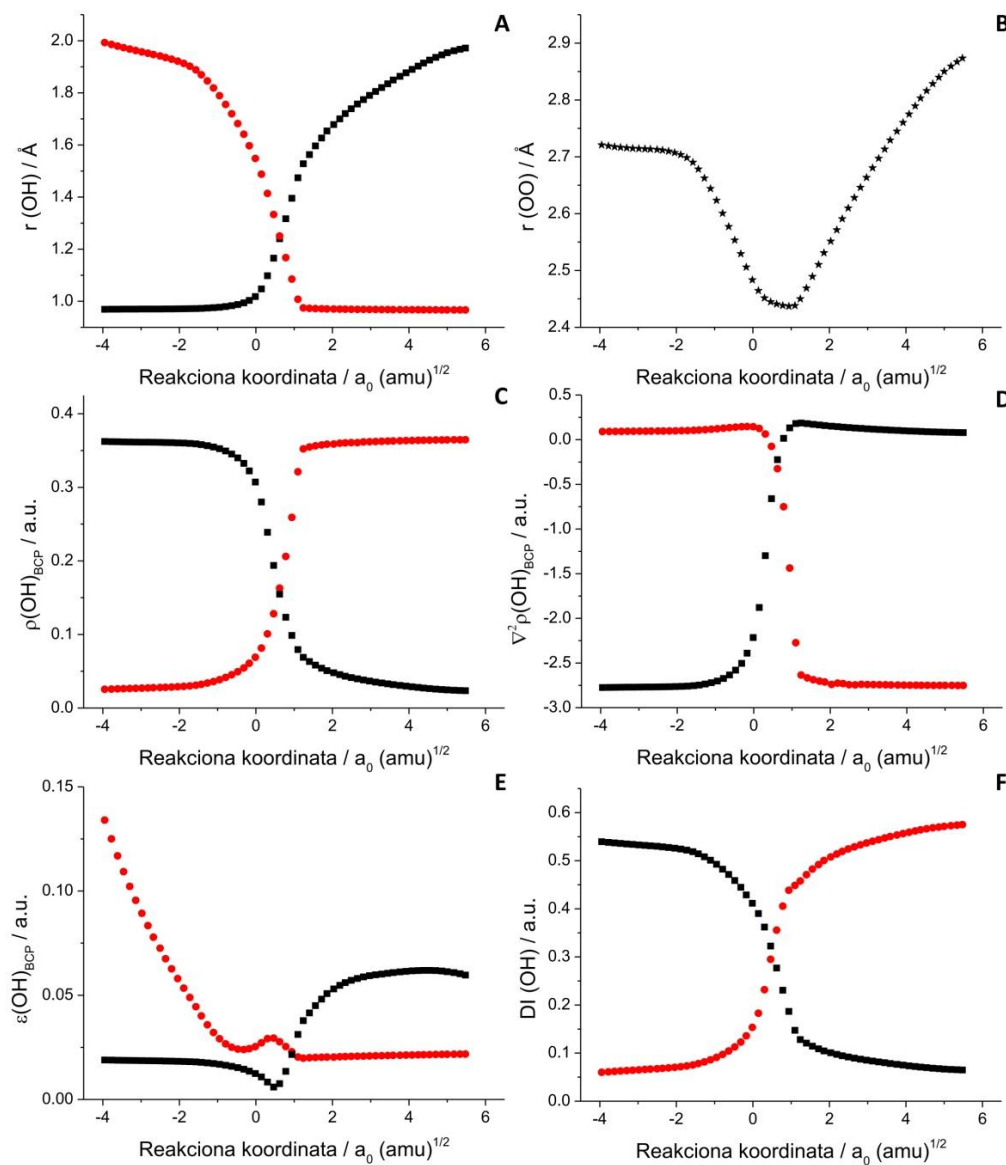
Dosadašnji rezultati potvrđuju da je moguće razlikovati PCET i HAT mehanizam analizirajući svojstva sistema u stacionarnim tačkama.<sup>179</sup> Odabrana svojstva sistema duž puta minimalne energije prikazana su na slici 27. O–H rastojanja (slika 28 A) se monotono menjaju. Ovakav trend ukazuje na nepostojanje intermedijera, to jest, reakcija se ne odvija putem više elementarnih koraka. Moglo bi se očekivati da su u prelaznom stanju obe O–H veze jednake dužine. Međutim, H–O<sup>HQ</sup> veza je nešto izduženija na vrhu barijere. Zanimljivo je i to da rastojanje između atoma kiseonika (slika 28 B) nastavlja da se smanjuje i nakon prelaznog stanja, iako bi se moglo

očekivati da je rastojanje između donora i akceptora upravo u toj tački najmanje. Nakon što sistem počne da se spušta od prelaznog stanja ka dolini u kojoj su proizvodi, za očekivati je da dođe do razdvajanja donora i akceptora (povećanja O–O rastojanja). Pomenuto neočekivano skraćivanje ove veze navodi na zaključak da jednostavni jednodimenzioni model (kod koga je za reakcionu koordinatu uzeto rastojanje između donora i akceptora) nije u stanju da adekvatno opiše ovu pojavu. Umesto toga, potrebno je koristiti višedimenzionalne modele<sup>312–318</sup>, ali bi to ujedno „poskupelo” proračune.

Elektronska gustina u BCP i njen Laplasijan (slika 28, C i D) pokazuju slične trendove kao i O–H rastojanja: njihove vrednosti u prelaznom stanju vrlo malo se razlikuju u odnosu na predreakcioni kompleks, a ove razlike postaju vrlo izražene kada reakcija krene u pravcu postreakcionog kompleksa. Pomenute vrednosti nisu uporedive kod obe veze u prelaznom stanju, već u tački koja na putu minimalne energije ima vrednost  $+ 0,6 a_0(\text{amu})^{1/2}$ . Eliptičnost veze (slika 28 E) značajno se menja sa promenom prirode veze. Eliptičnost raskidajuće i formirajuće kovalentne veze slična je u početnoj i krajnoj tački na putu minimalne energije. Velike vrednosti eliptičnosti vodonične veze u blizini predreakcionog kompleksa upućuju na to da je ova veza osetno slabija od kovalentne H–O veze. Nasuprot tome, niske vrednosti eliptičnosti vodonične veze u blizini postreakcionog kompleksa upućuju na to da je ova veza jača nego u predreakcionom kompleksu. Na osnovu vrednosti energijske barijere povratne reakcije, kao i upoređivanjem geometrijskih parametara sistema, očekuje se postojanje jake vodonične veze između semihinonskog radikala i vode. Dužine kovalentnih i vodoničnih veza u pre/postreakcionom kompleksu iznose 0,967/0,970 Å odnosno 2,123/1,874 Å, respektivno, a ugao koji formiraju iznosi 122,7/163,6°. Značajno veća dužina H···O veze i veće odstupanje od linearnosti potvrđuju da je vodonična veza u predreakcionom kompleksu osetno slabija, što se odražava i na difuzniju raspodelu elektrona u međumolekulskom prostoru, to jest većoj vrednosti  $\epsilon$ . Delokalizacioni indeks (slika 29 F) takođe se kontinualno menja u toku reakcije, a obe veze imaju uporedive vrednosti ovog parametra na oko  $0,5 a_0(\text{amu})^{1/2}$  u dolini reaktanata. Do podudaranja vrednosti  $DI$  obe veze ne dolazi u prelaznom stanju, što je u skladu sa pretpostavkom da do promene reda veze (razlike u broju elektrona u vezivnim i antivezivnim orbitalama) dolazi u dolini koja odgovara stabilnijem sistemu (u posmatranom slučaju je to  $\text{HQ}(-\text{H}) \cdots \text{HOH}$ ).



Od posebnog značaja za proučavanje sistema su tri ključna atoma koji direktno učestvuju u reakciji: H, O<sup>HQ</sup> i O<sup>rad</sup> (slika 29). Za razliku od svojstava O–H veze, koja se monotonno menjaju u oblasti proizvoda/reaktanata, sa atomom vodonika to nije slučaj. Njegova spinska gustina (slika 29 A) dostiže maksimum neposredno nakon prelaznog stanja, dok se ovaj parametar kod oba atoma kiseonika (slika 29 B) menja u skladu sa očekivanjima. Naelektrisanje atoma vodonika prikazano u funkciji reakcione koordinate daje krivu M oblika (slika 29 C). Njegova vrednost raste do maksimuma koji postiže u prelaznom stanju, nakon čega naglo opada. Nakon postizanja minimalne vrednosti, naelektrisanje atoma vodonika ponovo raste do lokalnog maksimuma. Pri približavanju postreakcionom kompleksu, vrednost ovog parametra ponovo opada. Treba naglasiti da su promene u naelektrisanju atoma vodonika duž puta minimalne energije male, što bi moglo da ukaže na numeričke probleme. S druge strane, zbir naelektrisanja atoma izračunatih za strukture koje se duž puta minimalne energije nalaze u opsegu 0,0-1,0 a<sub>0</sub>(amu)<sup>1/2</sup> odstupa od ukupnog naelektrisanja manje od 0,0006 a.u., što potvrđuje prihvatljiv kvalitet numeričke integracije. Naelektrisanje O<sup>HQ</sup> i O<sup>rad</sup>, (slika 29 D), raste, odnosno opada, respektivno, tokom reakcije, iako dostiže lokalni maksimum/minimum blizu tačke u kojoj  $q_H$  ima minimalnu vrednost.

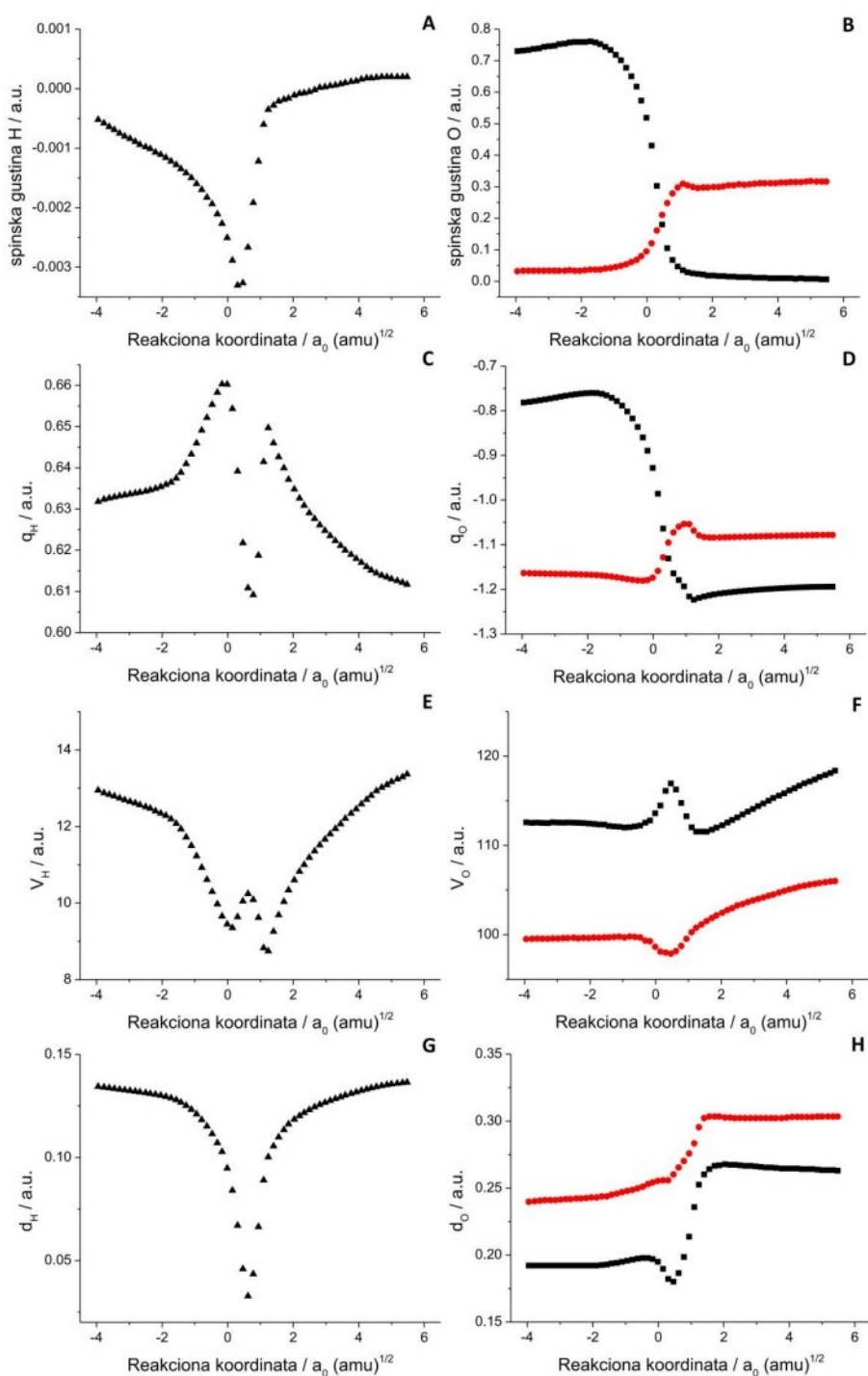


**Slika 28.** Odabrana QTAIM svojstva duž reakcione koordinate za reakciju hidrohinona sa hidroksilnim radikalom: dužina O–H veze (A), rastojanje između atoma kiseonika (B), elektronska gustina u kritičnoj tački O–H veze (C), Laplasijan elektronske gustine u kritičnoj tački O–H veze (D), eliptičnost elektronske gustine u kritičnoj tački O–H veze (E), delokalizacioni indeks O–H veze (F). Dužine veza izražene su u Å, a svojstva elektronske gustine u atomskim jedinicama (a.u.). Kružićima/kvadratićima označene su veze koje se formiraju/raskidaju. Zvezdicama su predstavljena O–O rastojanja.

Atomske zapremine (slika 29 E i F) izračunate su uzimajući u obzir deo prostora ograničen interatomske izopovršima za  $\rho = 0,0002$  a.u. One odlikavaju promene u

naelektrisanju, na način da sa nagomilavanjem/opadanjem elektronske gustine dolazi do povećanja/smanjenja zapremine atoma. Još jedno značajno svojstvo atoma jeste njegov dipolni moment, (slika 29 G i H). Dipolni momenti  $O^{HQ}$  i  $O^{rad}$  se povećavaju u toku reakcije. Do toga kod  $O^{HQ}$  dolazi zbog delokalizacije elektrona, a kod  $O^{rad}$  zbog prenosa elektrona. Za očekivati bi bilo da oblik krive koja predstavlja  $d_H$  prati promene zapremine ovog atoma. Međutim, kriva ima jednostavniji izgled, sa minimumom na mestu gde zapremina pokazuje lokalni maksimum. Do toga verovatno dolazi zbog blizine protona slobodnim elektronskim parovima atoma kiseonika.

Rezultati prikazani na slici 29 upućuju na zaključak da se prenos atoma vodonika pri reakciji hidrohina sa hidroksilnim radikalom dešava u skladu sa PCET mehanizmom. Naime, kod PCET reakcija, proton i elektron kreću se zasebno.<sup>175</sup> Proton se kreće između slobodnih elektronskih parova atoma kiseonika, tako da interaguje sa elektronima iz slobodnog elektronskog para donora u predreakcionom i akceptora u postreakcionom kompleksu. S druge strane, elektron se prenosi sa p orbitale donora na p orbitalu akceptora. Ovakvo kretanje ukazuje na to da bi trebalo doći do smanjenja elektronske i spinske gustine atoma vodonika, a time i njegove zapremine i dipolnog momenta. I zaista, spinska gustina atoma vodonika opada, dostižući minimum u tački oko  $0,4 a_0(\text{amu})^{1/2}$ , dok se spinska gustina  $O^{HQ}/O^{rad}$  povećava/smanjuje. Gubitak elektrona kod  $O^{HQ}$  i njegov prenos na  $O^{rad}$  dovode do pomenutog ponašanja. Ovo nije slučaj kod naelektrisanja atoma vodonika. Moglo bi se očekivati da vrednosti ovog parametra rastu, dostižu maksimum u prelaznom stanju, i opadaju kako reakcija napreduje ka postreakcionom kompleksu. Kako reakcija teče ka prelaznom stanju, vodonik se pomera ka  $O^{rad}$ . Međutim, nakon što aktivirani kompleks krene niz hiperpovrš potencijalne energije u pravcu postreakcionog kompleksa, atomi kiseonika nastavljaju da se približavaju jedan drugom. Proton koji je na početku bio vezan za  $O^{HQ}$  biva privučen od strane slobodnog elektronskog para  $O^{rad}$ , što dovodi do opadanja vrednosti  $q_H$ . Minimum na krivoj promene naelektrisanja duž puta minimalne energije odgovara minimalnom O–O rastojanju. Stoga, do malog opadanja vrednosti  $q_H$  neposredno nakon prelaznog stanja najverovatnije potiče od blizine slobodnog elektronskog para akceptora u oblasti gde malo O–O rastojanje omogućuje transfer elektrona između p orbitala.



**Slika 29.** Promena odabranih QTAIM svojstava atoma vodonika (A, C, E, G) i kiseonika (B, D, F, H) duž reakcione koordinate za reakciju hidrohinona sa hidroksilnim radikalom: spinske gustine (A/B), naelektrisanja (C/D), zapremine obuhvaćene 0,002 izopovrši (E/F), dipolni momenat (G/H). Sve vrednosti date su u atomskim jedinicama.

Trouglovima su predstavljene vrednosti koje se odnose na atom vodonika, a kružićima/kvadratićima one koje se odnose na atom kiseonika sa hidrohinona/radikala.

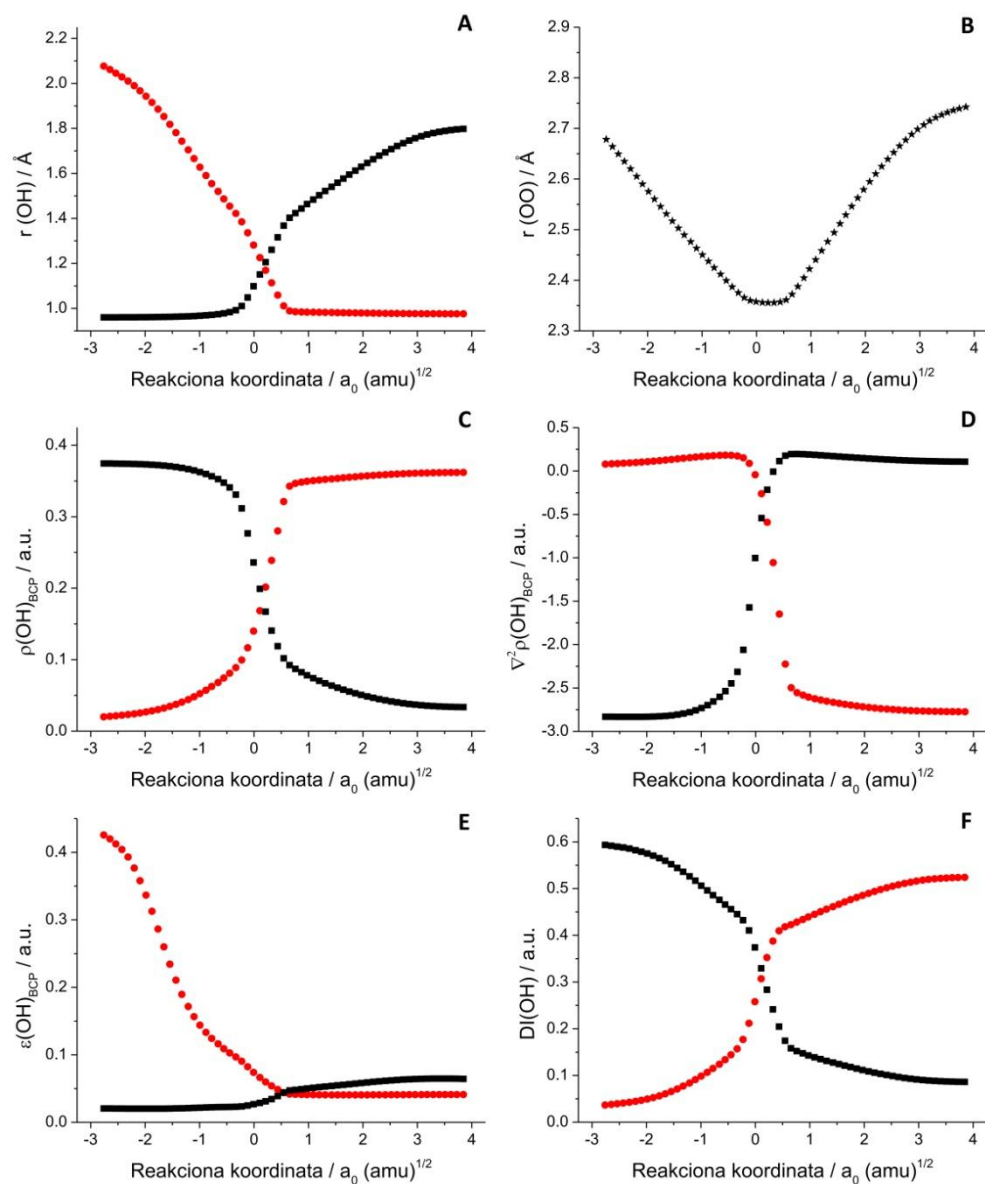
#### 4.1.2. Reakcija hidrohina sa hidroperoksil radikalom

Kod reakcije hidrohina sa hidroperoksil radikalom, vrednost energije aktivacije za direktnu i povratnu reakciju iznosi 47 kJ/mol, odnosno 68 kJ/mol, respektivno. Barijera za direktnu reakciju je značajno viša u poređenju sa prethodno proučavanim sistemom, a niža u slučaju povratne reakcije. Odabrana svojstva predreakcionog kompleksa i prelaznog stanja prikazana su u tabeli 2. Ovi podaci ukazuju na postojanje slabije vodonične veze u slučaju  $\text{HQ} \cdots \text{OOH}$  u odnosu na  $\text{HQ} \cdots \text{OH}$ , što se može primetiti i po numeričkim vrednostima svojstava O-H i H  $\cdots$  O veze. Takođe, rastojanje između atoma kiseonika u predreakcionom kompleksu je veće za 0,186 Å. U prelaznom stanju, atomi bivaju bliži za 0,126 Å, a  $\text{O}^{\text{rad}} \cdots \text{H}$  veza je nešto jača u slučaju hidroperoksil radikala, pri čemu su atomi koji učestvuju u formiranju veze bliži za 0,267 Å, a gustina elektrona u BCP je dvostruko veća.

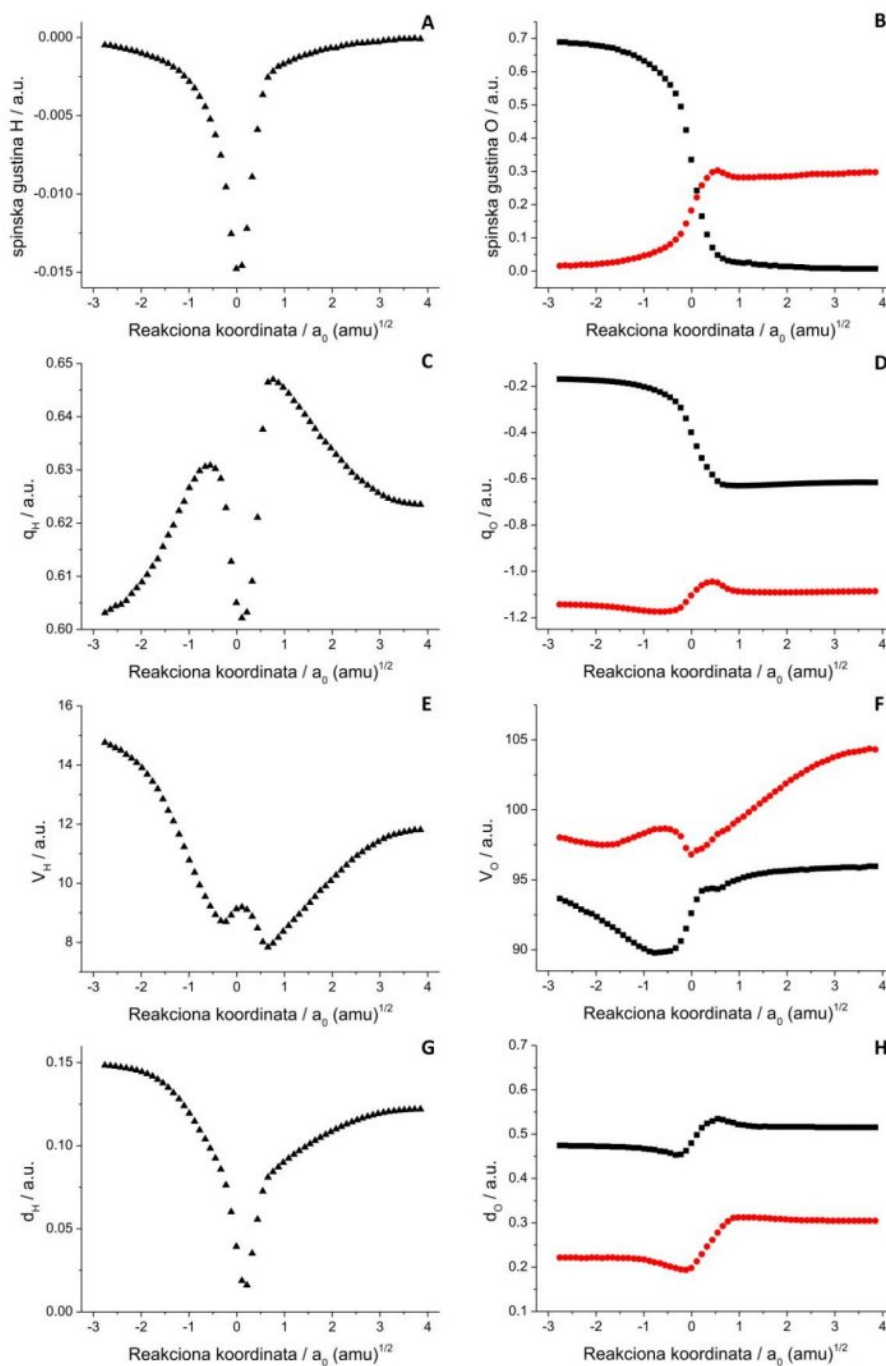
Promene svojstava O-H veze do kojih dolazi tokom reakcije prikazane su na slici 30. U kvalitativnom smislu, ove promene slične su onima do kojih dolazi u slučaju hidroksilnog radikala, osim što je tačka u kojoj se ukrštaju vrednosti delokalizacionih indeksa raskidajuće i formirajuće veze nešto bliža prelaznom stanju, na + 0,2  $a_0(\text{amu})^{1/2}$ . Do toga dolazi usled male razlike u stabilnosti pred- i postreakcionog kompleksa.<sup>319</sup> Odabrana svojstva atoma prikazana su na slici 31. Prisustvo peroksidne veze najviše se odražava na svojstva  $\text{O}^{\text{rad}}$ , te se kod njega mogu uočiti niža spinska i elektronska gustina, a time i manja atomska zapremina nego u slučaju istog atoma u reakciji sa hidroksilnim radikalom, dok dipolni moment ima veću vrednost.

**Tabela 2.** Reakcija hidrohinona sa hidroperoksil radikalom. Odabrana svojstva kompleksa reaktanata, odnosno prelaznog stanja: međuatomsko rastojanje ( $r$ ), elektronska gustina ( $\rho$ ) u kritičnoj tački veze O-H  $\rho$ , Laplasijan elektronske gustine ( $\nabla^2\rho$ ) u kritičnoj tački O-H veze, eliptičnost elektronske gustine ( $\varepsilon$ ) u kritičnoj tački O-H veze, Delokalizacioni indeks ( $DI$ ) O-H veza, naelektrisanje ( $q$ ), zapremina ( $V$ ) i dipolni moment ( $d$ ) atoma vodonika koji podleže transferu. Zapremina je izračunata uzimajući u obzir prostor oivičen interatomskim površima i izopovršima  $\rho = 0,002$  a.u. Sve vrednosti date su u atomskim jedinicama izuzev dužine veza, izraženih u Å. Svojstva atoma kiseonika predstavljena su prema redosledu O<sup>HQ</sup>/O<sup>rad</sup>. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>310</sup>

Parametar	Kompleks reaktanata	Prelazno stanje
$r(\text{O}^{\text{HQ}}-\text{O}^{\text{rad}})$	2,953	2,357
$r(\text{O}-\text{H})$	0,963/2,154	1,098/1,281
$\rho_{\text{BCP}}(\text{O}-\text{H})$	0,371/0,017	0,236/0,140
$\nabla^2\rho_{\text{BCP}}(\text{O}-\text{H})$	-2,818/0,057	-1,003/-0,043
$\varepsilon(\text{O}-\text{H})$	0,021/0,055	0,027/0,074
$DI(\text{O}-\text{H})$	0,58/0,04	0,37/0,26
spinska gustina (H)	-0,0003	-0,0148
$q(\text{H})$	0,611	0,605
$V(\text{H})$	14,27	9,13
$d(\text{H})$	0,142	0,039



**Slika 30.** Odabrana QTAIM svojstva duž reakcione koordinate za reakciju hidrohinona sa hidroperoksil radikalom: dužina O–H veze (A), rastojanje između atoma kiseonika (B), elektronska gustina u kritičnoj tački O–H veze (C), Laplasijan elektronske gustine u kritičnoj tački O–H veze (D), eliptičnost elektronske gustine u kritičnoj tački O–H veze (E), delokalizacioni indeks O–H veze (F). Dužine veza izražene su u Å, a svojstva elektronske gustine u atomskim jedinicama (a.u.). Kružićima i kvadratićima označene su veze koje se formiraju, odnosno raskidaju, respektivno. Zvezdicama su predstavljena O–O rastojanja.



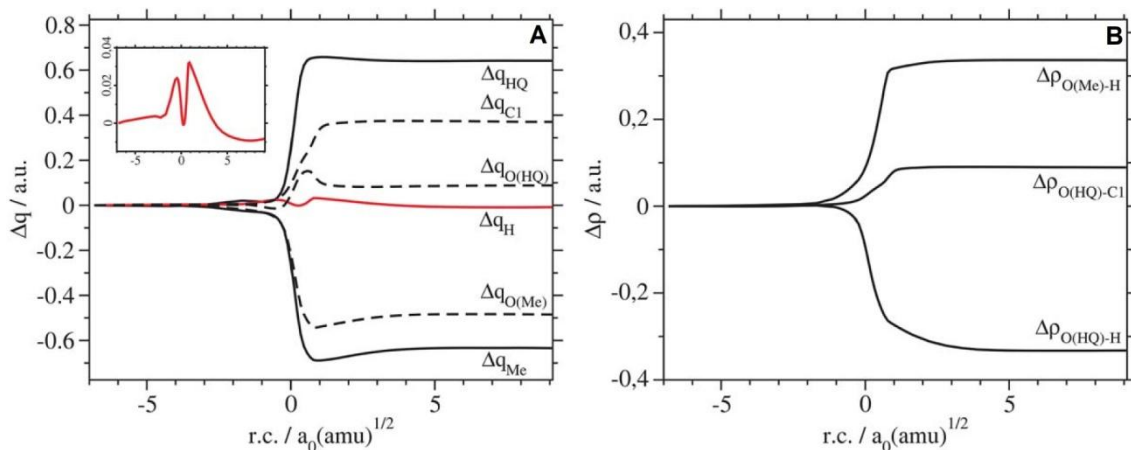
**Slika 31.** Promena odabranih QTAIM svojstava atoma vodonika (A, C, E, G) i kiseonika (B, D, F, H) duž reakcione koordinate za reakciju hidrohina sa hidroperoksil radikalom: spinske gustine (A/B), naelektrisanja (C/D), zapremine obuhvaćene 0,002 izopovrši (E/F), dipolni momenat (G/H). Sve vrednosti date su u atomskim jedinicama. Trouglovima su predstavljene vrednosti koje se odnose na atom vodonika, a kružićima/kvadratićima one koje se odnose na atom kiseonika sa hidrohina/radikala.



### 4.1.3. Reakcija hidrohina sa metoksi radikalom

Na osnovu optimizovanih prelaznih stanja za reakciju hidrohina sa metoksi radikalom, može se zaključiti da je *cis* konformer stabilniji od *trans* konformera, za svega 1 kJ/mol, što je izvan granice preciznosti DFT metode. Energija aktivacije korigovana za vrednost nulte vibracione energije iznosila je 23 kJ/mol za *cis*, odnosno 25 kJ/mol za *trans* konformer. Na osnovu tako malih razlika u visini energijske barijere, može se zaključiti da kod oba konformera dolazi do sličnih energijskih promena tokom reakcije. Zbog stabilnosti, male razlike u vrednosti aktivacione energije, kao i blizine hidrohinskog prstena metoksi grupi (mogućnost njihove uzajamne interakcije), za potrebe ove disertacije ispitan je samo *cis* konformer, sa akcentom na ona elektronska svojstva koja su se pokazala značajnim kod prethodna dva sistema.

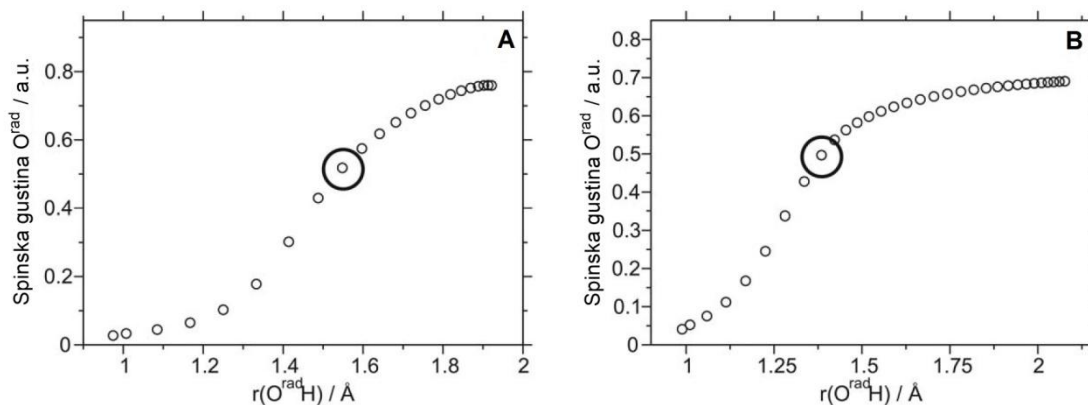
Promene naelektrisanja posmatranih atoma i fragmenata kod *cis* konformera u odnosu na prvu tačku na putu minimalne energije prikazane su na slici 32. Iako semihinonski, odnosno metoksi radikal postoje samo pre, odnosno nakon prelaznog stanja, kako bi bilo moguće predstaviti svojstva sistema duž čitavog reakcionog puta od reakcionog kompleksa  $\text{HQ} \cdots \text{Me}^\cdot$  u kome postoji vodonična veza, pa do odgovarajućeg kompleksa proizvoda  $\text{HQ}^\cdot \cdots \text{Me}$ , ceo sistem je veštački podeljen na tri segmenta: semihinonski radikal ( $\text{HQ}^\cdot$ ), metoksi radikal ( $\text{Me}^\cdot$ ) i atom vodonika (H). Prenos atoma vodonika prati porast ukupnog naelektrisanja  $\text{HQ}^\cdot$  i opadanje ukupnog naelektrisanja  $\text{Me}^\cdot$ . Naelektrisanja atoma kiseonika O(HQ) i O(Me) između kojih se transfer atoma vodonika vrši prate isti trend koji se uočava kod radikala sa kojih oni potiču (slika 32 A). Uočeno je i to da kod atoma ugljenika C1, koji je direktno kovalentno vezan za O(HQ), dolazi do najvećeg porasta vrednosti naelektrisanja, usled privlačenja elektrona od strane susednog atoma kiseonika. Ova promena raspodele naelektrisanja odražava se na jačanje C1–O(HQ) veze, što se može uočiti u promeni elektronske gustine u odgovarajućoj kritičnoj tački veze (slika 32 B). Slabljenje O(HQ)–H i jačanje (Me)O–H veze takođe se odražava u promeni elektronske gustine u odgovarajućim kritičnim tačkama veze.



**Slika 32.** Promene odabranih QTAIM svojstava *cis* oblika prelaznog stanja hidrohina i metoksi radikala. (A) akumuliranje i opadanje nivoa naelektrisanja (u atomskim jedinicama) atoma vodonika čiji se prenos vrši, hidrohina/metoksi radikala (HQ<sup>•</sup>/Me<sup>•</sup>), atoma kiseonika O(HQ) i O(Me) i ugljenika C1 na molekulu hidrohina. (B) promena elektronske gustine ( $\rho$ , u atomskim jedinicama) u kritičnim tačkama dve O-H veze i O(HQ)–C1 veze. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>311</sup>

#### 4.1.4. Redosled prenosa protona i elektrona

PCET mehanizam karakteriše odvojeno kretanje protona i elektrona. Analiza spinske gustine na radikalskom atomu kiseonika u funkciji rastojanja između protona i radikalskog kiseonika izvršena je da bi se identifikovalo da li kretanje protona prouzrokuje prenos elektrona ili je situacija obrnuta (slika 33). Reakcija se odvija udesno, odnosno sa njenim napretkom smanjuje se O<sup>rad</sup>–H rastojanje. Kod obe reakcije, spinska gustina na O<sup>rad</sup> počinje se smanjivati kada su oba atoma na rastojanju barem dvostruko većem od prosečne dužine O–H veze, odnosno oko 1,9 Å. Ukoliko bi u nekom procesu kretanje protona prethodilo prelasku elektrona, za očekivati bi bilo da spinska gustina O<sup>rad</sup> naglo opadne u dolini proizvoda. U obrnutom slučaju, spinska gustina na O<sup>rad</sup> drastično bi opala u dolini reaktanata. Pošto ona monotono opada sa skraćivanjem O<sup>rad</sup>–H veze sa 1,9 na 1,0 Å, dostižući vrednost od 0,5 a.u. u prelaznom stanju, obe čestice najverovatnije simultano vrše prelaz, tako da jedna ne utiče na drugu.



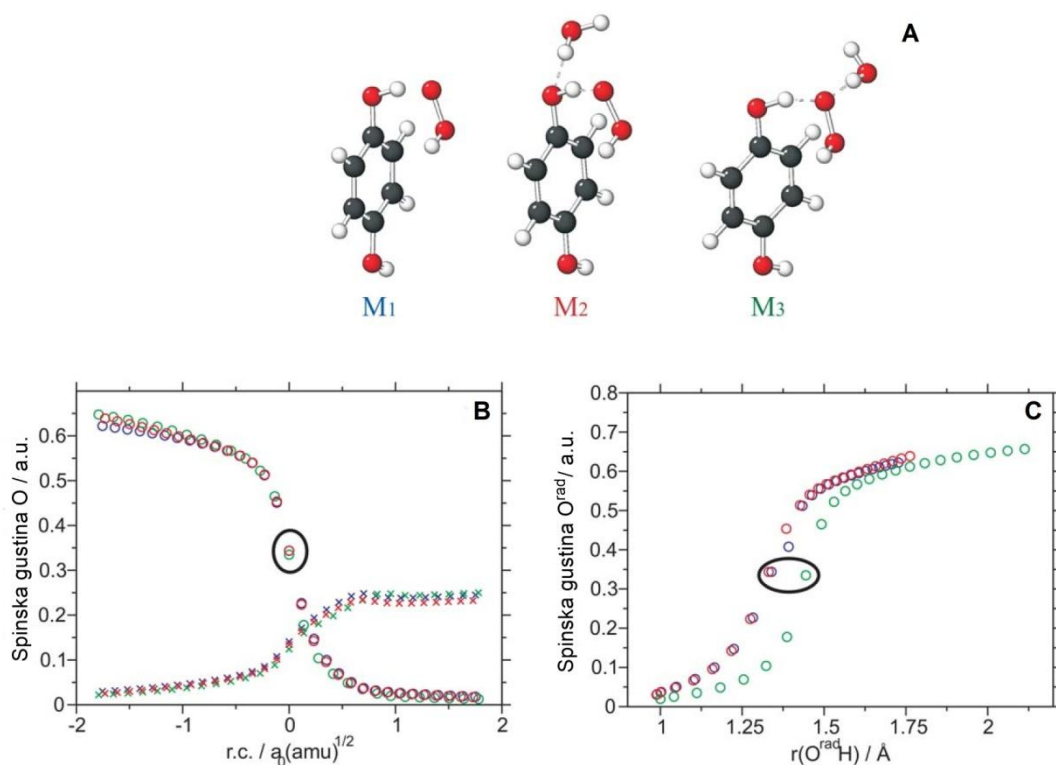
**Slika 33.** Spinska gustina  $O^{\text{rad}}$  atoma u funkciji  $O^{\text{rad}}\text{-H}$  rastojanja za reakciju hidrohinona sa hidroksilnim (A) i hidroperoksilnim (B) radikalom. Vrednosti koje odgovaraju prelaznom stanju prikazane su u okviru većeg kruga. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>310</sup>

Kod interakcije hidrohinona sa metoksi radikalom, porast vrednosti naelektrisanja atoma vodonika pri približavanju prelaznom stanju, te opadanje nakon prevojne tačke u dolini proizvoda ukazuju na postojanje PCET mehanizma prenosa atoma vodonika.<sup>180</sup> Ovakav M oblik krive (dat kao umetak na slici 32 A) već je opisan za slučaj hidroksilnog i hidroperoksilnog radikala. Odsustvo intermedijera duž reakcionog puta kojim su povezani  $HQ \cdot \cdot \cdot Me^{\cdot}$  i  $HQ^{\cdot} \cdot \cdot \cdot Me$  ukazuje na to da mehanizam reakcije ne odgovara ni EPST ni PEST mehanizmu prenosa atoma vodonika.<sup>172,173</sup>

#### 4.1.5. Prisustvo rastvarača

Zbog odnosa kvaliteta dobijenih rezultata i utroška računarskih resursa, prethodne reakcije analizirane su u gasovitoj fazi. Međutim, kod modelovanja procesa koji se dešavaju u živim organizmima (a avarol poseduje perspektivu upotrebe u terapijske svrhe), gotovo je sigurno da će rastvarač imati značajan uticaj, posebno na formiranje vodoničnih veza sa reaktantima. U tu svrhu, proučavana su tri modela za reakciju  $HQ + \cdot OOH$  u vodi. Ova reakcija odabrana je zbog veće energijske barijere u gasovitoj fazi. Model  $M_1$  počiva na predstavljanju molekula rastvarača kao polarizabilnog kontinuuma posredstvom modela polarizabilnog kontinuuma implementiranog u Gaussian programskom paketu.<sup>152,320,321</sup> Kod modela  $M_2$  i  $M_3$ , uz

polarizabilni kontinuum, molekul vode eksplicitno je dodat tako da je vodoničnom vezom vezan za donor ( $M_2$ ) ili akceptor ( $M_3$ ). Optimizovane strukture svakog od modela prikazane su na slici 34. Energije aktivacije izračunate na osnovu modela  $M_1/M_2/M_3$  značajno su niže od vrednosti dobijene za gasovitu fazu, ali međusobno su slične, i iznose 10/9/10 kcal/mol. Upotreba polarizabilnog kontinuuma dovodi do zaključka da, zbog visoke vrednosti relativne dielektrične konstante vode, molekuli rastvarača značajno utiču na tok reakcije. Slabljenje  $O^{HQ}-H$  veze u  $M_2$  modelu dovodi do nešto niže vrednosti energijske barijere.



**Slika 34.** Reakcija hidrohina sa hidroperoksil radikalom u rastvoru. Tri modela rastvarača (A):  $M_1$  (plavo) – rastvarač modelovan upotrebom modela polarizabilnog kontinuuma (PCM),  $M_2$  (crveno) – uz PCM, molekul vode vezan je za donor,  $M_3$  (zeleno) – uz PCM, molekul vode vezan je za akceptor. Spinske gustine atoma kiseonika (krstićima/kružićima označeni su atomi kiseonika sa hidrohina/radikala) (B). Spinska gustina  $O^{HQ}$  atoma u funkciji rastojanja  $O^{HQ}-H$  (C). Crnim krugovima označene su vrednosti u prelaznom stanju. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>310</sup>

U skladu sa svojstvima koja atom vodonika koji se prenosi (tabela 3) ima u predreakcionom kompleksu, reakcija u vodenoj sredini takođe predstavlja PCET mehanizam. Vrednosti spinske gustine, naelektrisanja, zapremine i dipolnog momenta razlikuju se od vrednosti dobijenih za vakuum, ali ne drastično. Spinske gustine za atome kiseonika duž puta minimalne energije u blizini prelaznog stanja i zavisnost spinske gustine  $O^{\text{rad}}$  od  $O^{\text{rad}}\text{-H}$  rastojanja prikazani su na slikama 34 B i C. Spinska gustina  $O^{\text{rad}}$  u modelu  $M_1$  monotono se smanjuje tokom transformacije reaktanata u proizvode, a njen nagli pad se ne može opaziti ni u dolini reaktanata niti proizvoda. Ovo ponašanje ukazuje da se i u vodenoj sredini proton i elektron istovremeno kreću ka akceptoru. Modeli  $M_2$  i  $M_3$  pokazuju isto ponašanje, čime se zaključuje da prisustvo molekula vode ne menja način prenosa protona i elektrona u reakciji između hidrohina i hidroperoksilnog radikala.

**Tabela 3.** Reakcija hidrohina sa hidroperoksil radikalom. Odabrana svojstva atoma vodonika koji podleže transferu u kompleksu reaktanata i prelaznom stanju u skladu sa

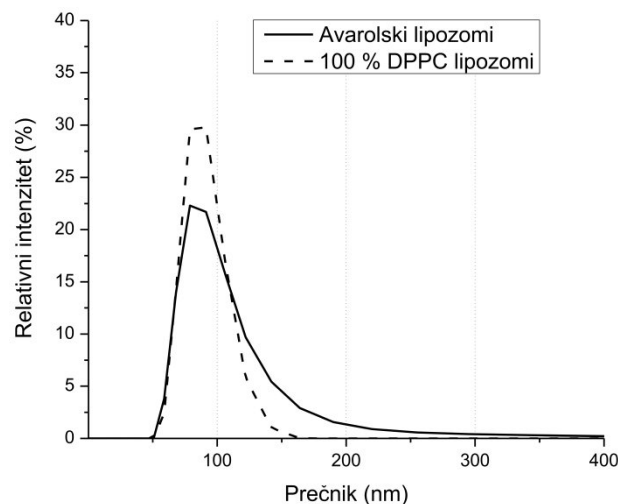
$M_1(M_2/M_3)$  modelima: naelektrisanje ( $q$ ), zapremina ( $V$ ) i dipolni moment ( $d$ ).

Zapremina je izračunata uzimajući u obzir prostor oivičen interatomskim površima i izopovršima  $\rho = 0,002$  a.u. Sve vrednosti date su u atomskim jedinicama. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>310</sup>

Parametar	Kompleks reaktanata	Prelazno stanje
spinska gustina (H)	0,0000 (-0,0004/0,0000)	-0,0160 (0,0154/-0,0119)
$q(\text{H})$	0,611 (0,625/0,644)	0,596 (0,598/0,613)
$V(\text{H})$	15,08 (13,94/10,82)	9,60 (9,54/9,75)
$d(\text{H})$	0,146 (0,137/0,114)	0,058 (0,055/0,081)

## 4.2. DLS merenja

Na osnovu rezultata DLS merenja (slika 35), može se zaključiti da najveći broj, kako avarolskih, tako i 100 % DPPC lipozoma, ima dimenzije između 80 i 100 nm.<sup>322</sup> Takođe, može se primetiti i da su 100 % DPPC lipozomi distribuirani nešto uniformnije u odnosu na avarolske lipozome.



**Slika 35.** DLS profil avarolskih i 100 % DPPC lipozoma. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>322</sup>

## 4.3. Rezultati EPR eksperimenata

### 4.3.1. Provera integriteta lipozoma

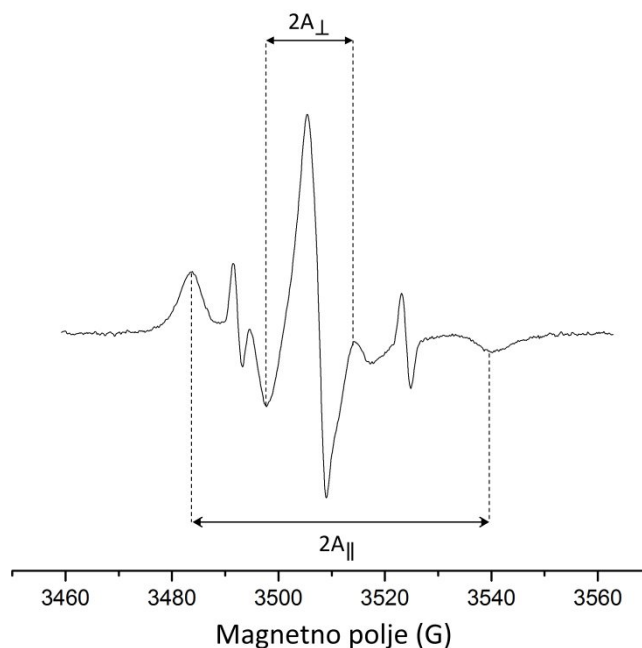
EPR spektri snimljeni tokom eksperimenata spinskog obeležavanja pomoću 5-DS karakterisani su izračunavanjem parametra reda membrane ( $S$ ). Karakterističan spektar 100 % DPPC lipozoma obeleženih pomoću 5-DS prikazan je na slici 36. Parametri  $A_{\parallel}$  i  $A_{\perp}$  odnose se na spoljašnje i unutrašnje hiperfino cepanje, respektivno. Vrednosti  $S$  izračunate su kao odnos hiperfine anizotropije, na osnovu formule<sup>323</sup>:

$$S = 1,723 \cdot \frac{A_{\parallel} - (A_{\perp} + C)}{A_{\parallel} + 2(A_{\perp} + C)} \quad (36)$$

gde  $A_{\parallel}$  i  $A_{\perp}$  predstavljaju vrednosti paralelnog i normalnog hiperfinog cepanja, respektivno, a  $C$ , korekcionni faktor za  $A_{\perp}$  definisan je sledećim izrazom:

$$C = 1,4 - 0,053 \cdot (A_{\parallel} - A_{\perp}) \quad (37)$$

Vrednost  $S = 1$  predstavlja potpuno rigidnu uređenost ( $A_{\parallel}$  ima maksimalnu, a  $A_{\perp}$  minimalnu vrednost), dok se  $S = 0$  odnosi na potpuno izotropno kretanje ( $A_{\parallel}$  i  $A_{\perp}$  imaju jednaku vrednost). Sa povećanjem fluidnosti membrane, raste i vrednost  $A_{\perp}$ , tako da vrednost  $S$  opada<sup>279</sup>.



**Slika 36.** EPR spektar 5-DS u prisustvu 100 % DPPC lipozoma.  $2A_{||}$  i  $2A_{\perp}$  predstavljaju spoljašnje i unutrašnje hiperfino cepanje, respektivno. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>322</sup>

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da, u poređenju sa 100 % DPPC lipozomima koji su uzeti kao kontrolni, avarolski lipozomi ne pokazuju promene u fluidnosti membrane (tabela 4).<sup>322</sup> Integritet i funkcionalnost obe vrste lipozoma ostaju nepromenjeni čak i mesec dana nakon što su formirani. To znači da je odabrani sastav lipozoma pogodan, odnosno da ne dolazi do eventualnih interakcija između avarola i lipida.

**Tabela 4.** Vrednosti parametra uređenosti  $S$  za 100 % DPPC i avarolske lipozome u prisustvu  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{NO}\cdot$  radikala generisanih u suspenziji lipozoma, odnosno u njihovom odsustvu. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>322</sup>

	100% DPPC lipozomi	Avarolski lipozomi
Kontrola	$0,96 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,02$
$\cdot\text{OH}$	$0,82 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,02$
$\text{O}_2^{\cdot-}$	$0,88 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,02$
$\text{NO}\cdot$	$0,92 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,02$

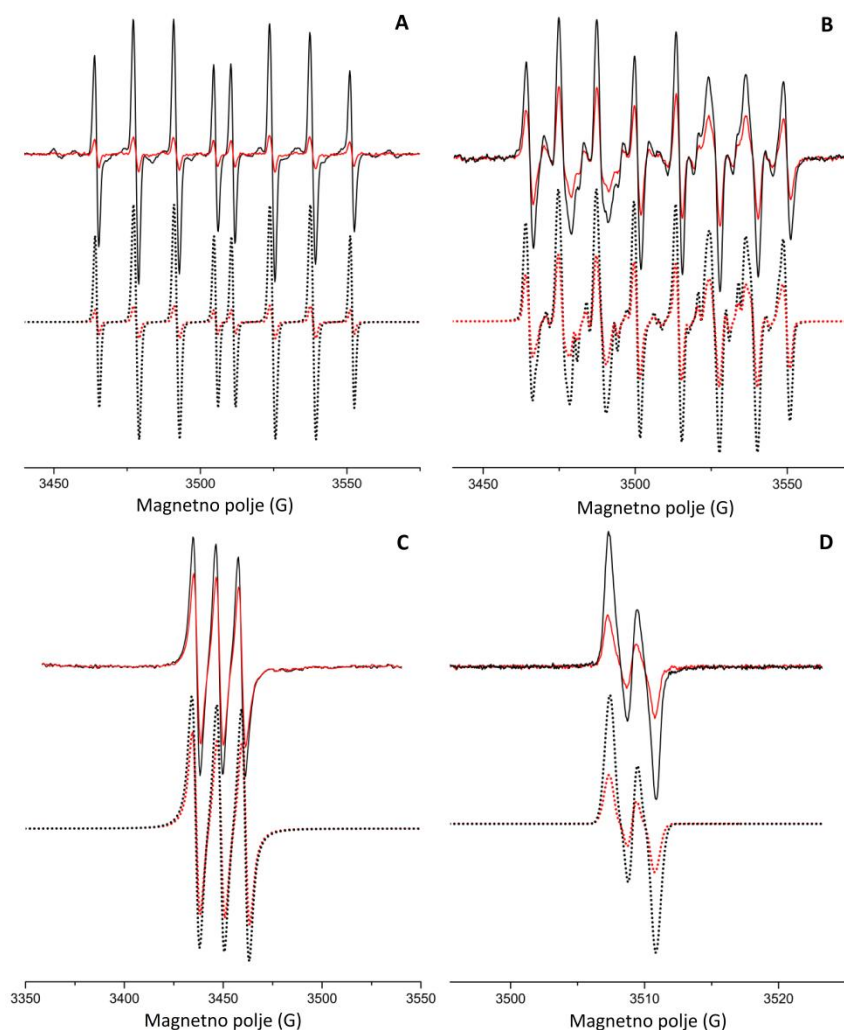
Nakon interakcije lipozoma sa  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{NO}\cdot$  radikalima generisanim u njihovoj suspenziji, uočeno je blago opadanje vrednosti parametra uređenosti  $S$  (tabela 4). Na osnovu ovoga se može zaključiti da je region lipidnog dvosloja u blizini granice vodene i lipidne faze koji je imao relativno visoku rigidnost postao malo fluidniji nakon interakcije sa odabranim radikalima. Smanjenje vrednosti parametra  $S$  bilo je izraženije u slučaju 100 % DPPC lipozoma. Ovakav rezultat ukazuje na to da avarol zapravo ima protektivno dejstvo na integritet lipozoma, odnosno da ih štiti od lipidne peroksidacije, što je u skladu sa podacima dostupnim u literaturi, koji se odnose na mikrozome.<sup>324</sup>

#### 4.3.2. Antiradikalska aktivnost avarola

EPR tehnika spinskog trapovanja upotrebljena je kako bi bilo moguće detektovati kratkoživeće slobodnoradikalske vrste i proučavati njihovu interakciju sa avarolskim, odnosno 100 % DPPC lipozomima, u čijoj su suspenziji direktno generisane (sa izuzetkom askorbil radikala). Karakterističan izgled EPR spektra spinskih trapova snimljenih nakon njihove reakcije sa slobodnim radikalima (takozvanih spin-adukata) omogućava procenu inicijalne koncentracije slobodnoradikalskih vrsta, kao i njihovo međusobno razlikovanje.<sup>213,214,325</sup> Za detekciju  $\cdot\text{OH}$  i  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikala, upotrebljen je spin-trap DEPMPO, pošto je dobro poznat po svojoj selektivnosti i dugom vremenu polu-života njegovih spinskih adukata (132 minuta u slučaju  $\cdot\text{OH}$ , odnosno 17 minuta u slučaju  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikala).<sup>282,284</sup> Za detekciju  $\text{NO}\cdot$  radikala upotrebljen je kompleks  $\text{Fe}(\text{DTCS})_2$ , pošto je spin-adukt  $\text{NO-Fe}(\text{DTCS})_2$  izuzetno stabilan.<sup>326</sup> EPR spektri su snimljeni 2 minuta nakon generisanja radikalskih vrsta u suspenziji lipozoma. Ovo je bilo neophodno kako bi bio izbegnut uticaj procesa prirodnog razlaganja spin-adukata, kao i interakcija avarola i spin-adukata na dobijene rezultate. Kontrolni eksperimenti rađeni su upotrebom 100 % DPPC lipozoma (odnosno DMSO u slučaju askorbil radikala), kako bi se potvrdilo da uočena redukcija EPR signala potiče isključivo od avarola.

EPR spektri odgovarajućih spin-adukata i askorbil radikala snimljeni 2 minuta nakon njihovog generisanja u suspenziji avarolskih, odnosno 100 % DPPC lipozoma, prikazani su na slici 37.<sup>322</sup> EPR spektri dobijeni kompjuterskim simulacijama prikazani su tačkastim linijama.





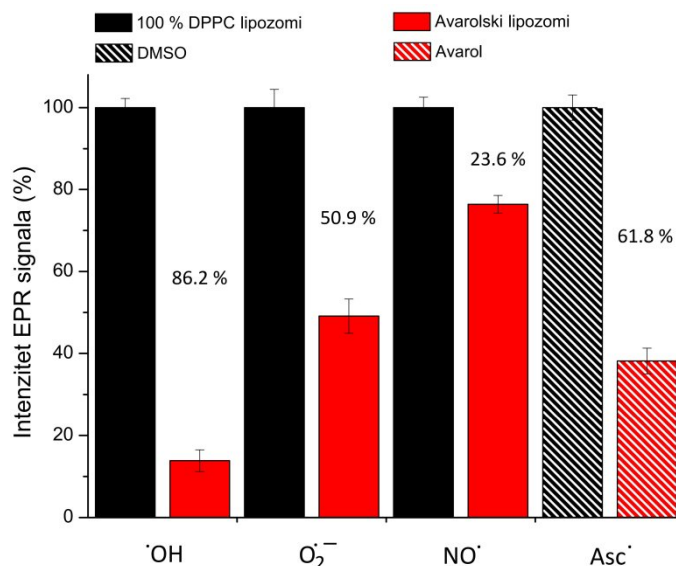
**Slika 37.** Reprezentativni EPR spektri DEPMPO/OH adukta (A), DEPMPO/OOH adukta (B), NO-Fe(DTCS)<sub>2</sub> adukta (C) i askorbil radikala (D) snimljeni 2 minuta nakon generisanja radikalskih vrsta u suspenziji 100 % DPPC (crno), odnosno avarolskih lipozoma (crveno). Tačkastim linijama prikazane su računarske simulacije eksperimentalno dobijenih spektara. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>322</sup>

Još jednom je važno istaći da su snimanja EPR signala morala biti izvršena što pre, kako bi se smelo tvrditi da smanjenje intenziteta EPR signala spin-adukata posledica isključivo interakcije avarola sa datim radikalskim vrstama. Inače, ono što je izmereno odlikavalo bi mahom spontano razlaganje spin-adukata, ili njihovu interakciju sa avarolom, i ne bi bilo moguće izvesti dovoljno dobar zaključak o aktivnosti avarola sa samim slobodnoradikalskim vrstama koje su ispitivane. Na osnovu rezultata prikazanih na slici 37, može se uočiti jasno smanjenje intenziteta EPR signala

nakon 2 minuta onda kada je avarol prisutan u sistemu. Opadanje intenziteta EPR signala usled očekivane nestabilnosti spin-adukata je zanemarljivo, i može se pripisati isključivo količini slobodnoradikalskih vrsta prisutnih u sistemu.<sup>282,284</sup> Normalizovane vrednosti dobijene dvostrukom integracijom simuliranih EPR spektara prikazane su na slici 38. Antiradikalaska aktivnost avarola izračunata je prema formuli:

$$A = \frac{I_k - I_a}{I_k} 100 (\%) \quad (38)$$

gde se  $I_a$  i  $I_k$  odnose na vrednosti dvostrukog integrala računarski simuliranih EPR spektara uzoraka koji su sadržali avarolske lipozome (ili rastvor avarola u DMSO u slučaju askorbil radikala), ili 100 % DPPC lipozome (odnosno DMSO u slučaju askorbil radikala).



**Slika 38.** Normalizovane vrednosti dvostrukog integrala za EPR spektre simulirane na osnovu eksperimentalnih spektara snimljenih 2 minuta nakon generisanja radikalskih vrsta. Svaki signal avarolskih lipozoma normalizovan je u odnosu na odgovarajući signal 100% DPPC lipozoma (odnosno DMSO kao kontrole u slučaju askorbil radikala). Antioksidativna aktivnost avarola sa svakom radikalskom vrstom navedena je iznad odgovarajućeg stubića. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>322</sup>

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 38, može se zaključiti da avarol naj snažniju antiradikalasku aktivnost ispoljava prema  $\cdot\text{OH}$  radikalima (86,2 %), zatim

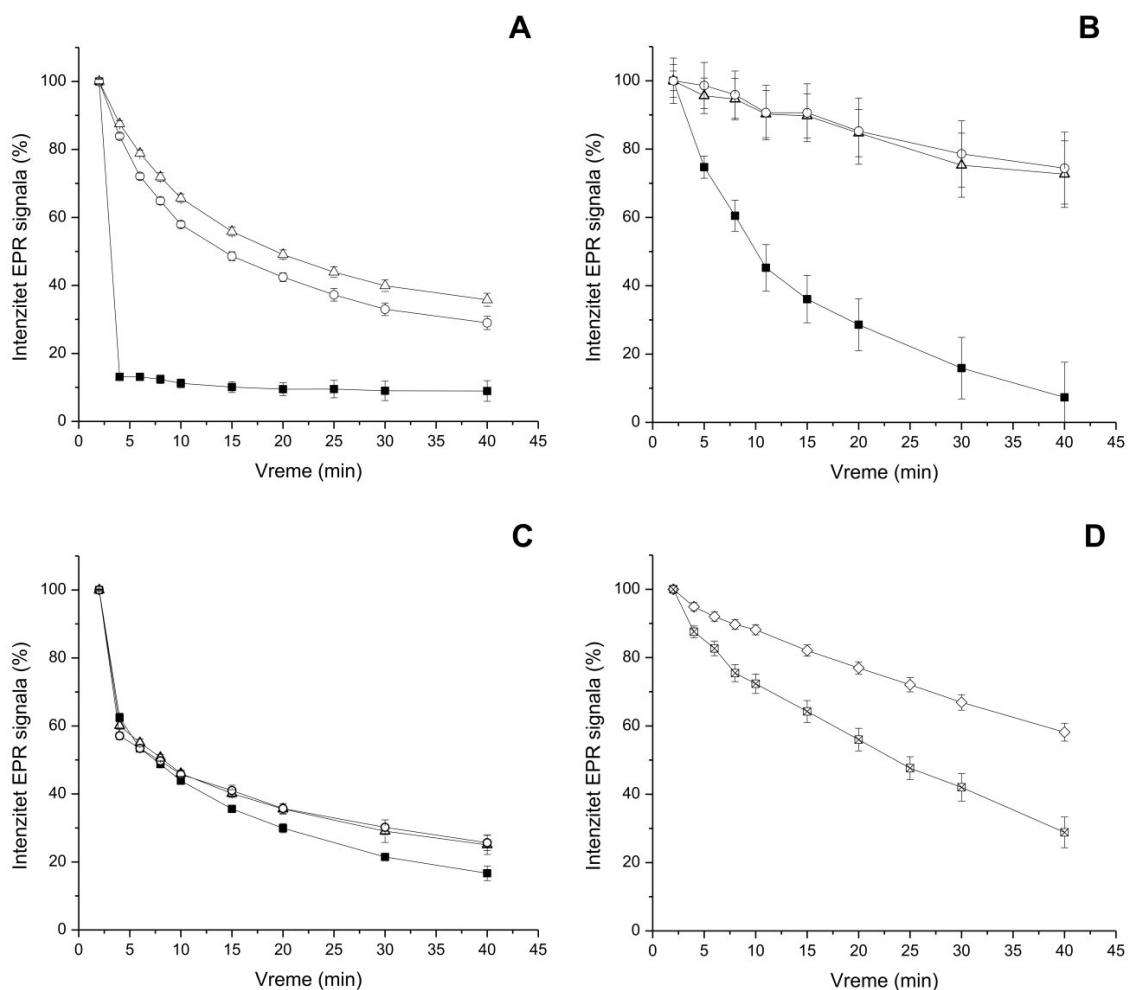
askorbil radikalima (61,8 %),  $O_2^{\bullet-}$  radikalima (50,9 %) i  $NO^{\bullet}$  radikalima (23,6 %). Može se zaključiti da je reakcija avarola sa  $^{\bullet}OH$  radikalima intenzivnija od njegove reakcije sa  $O_2^{\bullet-}$  radikalima. Ovo zapažanje u skladu je sa rezultatima predviđanja reaktivnosti hidrohina (pretpostavljenog aktivnog segmenta molekula avarola<sup>2</sup>) izvršenih računarskim putem. DFT proračunima ustanovljeno je da je energijska barijera znatno viša za reakciju  $O_2^{\bullet-}$  radikala sa hidrohonom, nego što je to slučaj za  $^{\bullet}OH$  radikal (47 kJ/mol i 1 kJ/mol, respektivno).<sup>310</sup>

Manji stepen interakcije avarola sa  $NO^{\bullet}$  radikalom ne mora nužno biti nepoželjan. Poznato je da je, pri fiziološkim uslovima,  $NO^{\bullet}$  radikal prisutan u ljudskom telu, gde ima signalnu ulogu.<sup>327,328</sup> Intenzivno uklanjanje ove radikalske vrste potencijalno bi dovelo do zdravstvenih problema, ukoliko je prethodno bila prisutna u uobičajenoj količini.

Askorbil radikal važan je prirodni, neinvazivni indikator oksidativnog stresa. Moguće ga je u slobodnom obliku detektovati u tkivima, pošto do povećanja njegove koncentracije dolazi kod pojedinih patoloških stanja.<sup>329</sup> Pošto je dovoljno stabilan, moguće ga je detektovati i bez upotrebe spin-trapova.<sup>24</sup> Međutim, njegova stabilnost u vodenim rastvorima tokom dužeg vremenskog perioda problematična je za potrebe kvantitativne analize. Iz tog razloga, EPR snimanja bila su izvršena u DMSO. Međutim, rezultati ovih eksperimenata, upravo zbog razlike u upotrebljenom rastvaraču, ne mogu biti direktno upoređeni sa onima gde su korišćeni lipozomi. Ipak, ovi rezultati pokazuju da avarol ima značajan antiradikalski potencijal i sa askorbil radikalom. Ovaj zaključak je zanimljiv, pošto je askorbil radikal uključen u mnoge biološke procese. Između ostalog, on može reagovati i sa kiseonikom, dajući kiseonične radikale.<sup>330</sup>

Uprkos činjenici da nakon kratkog vremenskog perioda od početka reakcije nije moguće potpuno pouzdano tvrditi da do smanjenja signala spin-adukata dolazi isključivo usled interakcije avarola sa datim radikalskim vrstama, svejedno je praćena kinetika ovog procesa tokom 40 minuta. Svi radikali generisani su u skladu sa već opisanim procedurama, s tim što je kao dodatna kontrola, kako bi se utvrdilo da ni DPPC nema uticaja na kinetike, umesto lipozoma korišćena voda (izuzev u slučaju askorbil radikala). Rezultati ovih eksperimenata prikazani su na slici 39. Za potrebe ovih eksperimenata, isproban je i drugačiji generatorski sistem za proizvodnju  $O_2^{\bullet-}$

radikala. Ovom prilikom upotrebljen je sistem riboflavin/svetlost, kao jedan od najčešće korišćenih u EPR studijama.<sup>216</sup>



**Slika 39.** Kinetika redukcije EPR signala DEPMPO/OH (A), DEPMPO/OOH (B), NO-Fe(DTCS)<sub>2</sub> (C) i Asc<sup>•</sup> (D). Tačke na graficima predstavljene su sledećim simbolima: avarolski lipozomi ■; 100 % DPPC lipozomi ○; voda (kontrola) Δ; DMSO ◇.

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 39, može se zaključiti da avarolski lipozomi postepeno dovode do smanjenja intenziteta signala DEPMPO/OH (slika 39 A), DEPMPO/OOH (slika 39 B) i NO-Fe(DTCS)<sub>2</sub> adukata (slika 39 C), kao i askorbil radikala (slika 39 D). Uprkos tome što je kinetika ovog procesa složena (jer nije poznato do kakvih sve dodatnih reakcija tokom vremena dolazi), na svim graficima uočljiv je isti trend – krive koje potiču od sistema sa 100 % DPPC lipozomima imaju isti profil, sa manje izraženim nagibom u odnosu na one koje potiču od sistema sa avarolskim

lipozomima. Zanimljivo je primetiti i to da se reakcija između avarola i  $\cdot\text{OH}$  radikala odvija brže od njegove reakcije sa  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikalom, i da je najintenzivnija tokom prvih par minuta. Ukupna aktivnost avarola u smanjivanju količine prisutnih radikalskih vrsta nakon 40 minuta bila je 91,1 % za DEPMPO/OH, 92,7 % za DEPOMPO/OOH i 83,3 % za NO-Fe(DTCS)<sub>2</sub> spin-adukt. Takođe, avarol je umanjio količinu askorbil radikala za 71,2 %. Ipak, iako su ovi rezultati korisni, još jednom je potrebno napomenuti da ih treba uzeti sa izvesnom rezervom, zbog složenih procesa koji se mogu uporedo odvijati (poput interakcije avarola sa spin-aduktima, ili interakcije spin-adukata sa lipidnim dvoslojem, kao i njihovog spontanog razlaganja).

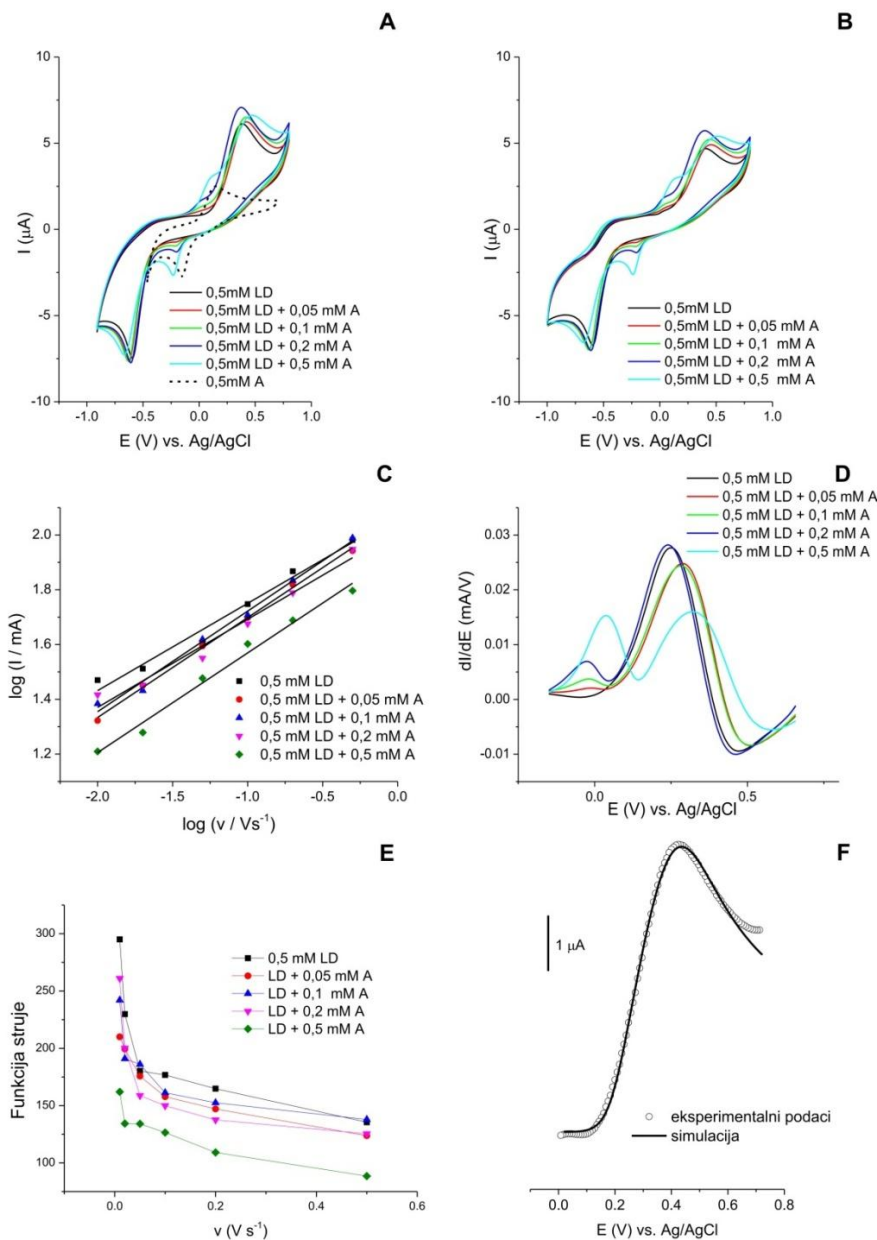
Jedno neočekivano opažanje koje je potrebno istaći odnosi se na reakciju avarola sa  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikalom (slika 39 B). Pri upotrebi riboflavin/svetlost generatorskog sistema, inicijalni signal DEPMPO/OOH spin-adukta bio je veći u sistemu u kom su se nalazili avarolski lipozomi u odnosu na sistem sa 100 % DPPC lipozomima. Međutim, od ranije je poznato da flavinska grupa molekula riboflavina pri fiziološkim uslovima može postojati u semihinonskom obliku.<sup>285</sup> Takođe, postoje i dokazi da riboflavin formira kompleks sa molekulima hidrohina, upravo posredstvom flavinske grupe.<sup>286</sup> Na osnovu ove dve činjenice, može se pretpostaviti da do porasta inicijalnog EPR signala kod sistema sa avarolskim lipozomima dolazi zbog toga što hidrohinska grupa avarola reaguje sa flavinskom grupom riboflavina, pospešujući proizvodnju  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Iz tog razloga, u ovom konkretnom slučaju, povoljnije je umesto riboflavin/svetlost koristiti hipoksantin/ksantin-oksidaza sistem za proizvodnju  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , kako bi se izbegle pomenute neželjene reakcije.

#### 4.4. Rezultati elektrohemijskih eksperimenata

Elektrohemijsko ponašanje L-dope ispitivano je u prisustvu različitih koncentracija avarola, u opsegu 0,05 – 0,5 mM (tako da je molarni odnos avarol/L-dopa bio 0,1 – 1 mM) kao i u njegovom odsustvu (slika 40). Snimljen je i ciklovoltamogram čistog avarola koncentracije 0,5 mM.

Na ciklovoltamogramu avarola može se uočiti jedan anodni pik na potencijalu od 0,16 V, koji odgovara oksidaciji QH<sub>2</sub>, i jedan katodni pik na potencijalu od -0,18 V, koji odgovara procesu redukcije nastalog hinona. Ovaj zaključak je u skladu sa

literaturnim podacima, kojima je ustanovljeno da je oksidacija avarola u vodenoj sredini dvoelektronski-dvoprotonski proces, pri kojem dolazi do formiranja avarona na svim posmatranim pH vrednostima.<sup>301</sup>



**Slika 40.** Ciklovoltamogrami smeše 0,5 mM L-dope u etanolu i fosfatnom puferu sa različitim koncentracijama avarola: (A) prvi skenovi, (B) drugi skenovi, (C) odnos  $\log I_p$  i  $\log v$ , (D) prvi izvod linearnih voltamograma, (E) funkcija struje za oksidaciju L-dope, (F) simulirani anodni deo voltamograma snimljenog u rastvoru koji je sadržao 0,5 mM L-dopu i 0,1 mM avarol u smeši etanola i fosfatnog pufera, pri brzini od  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

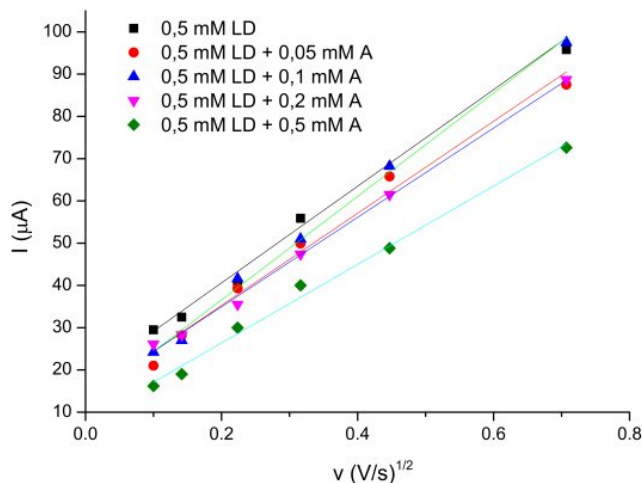
Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>331</sup>

Na ciklovoltamogramu  $L$ -dope može se uočiti jedan anodni pik na potencijalu od 0,38 V, koji se može pripisati oksidaciji  $L$ -dope do odgovarajućeg *o*-benzohinona ( $L$ -dopahinona). Na potencijalu od -0,60 V javlja se katodni pik, koji odgovara redukciji nastalog proizvoda. Zapravo, poreklo katodnog pika zavisi od pH vrednosti. U prethodnom radu<sup>332</sup>, ustanovljeno je da elektrooksidacija  $L$ -dope prati ECE (od eng. electrochemical-chemical-electrochemical) mehanizam, te da priroda proizvoda koji nastaje nakon prenosa prvog elektrona zavisi od pH vrednosti. Unutarmolekulska hemijska reakcija očekuje se u neutralnoj sredini. Pri drugom skeniranju, anodni pik javio se pri potencijalu od -0,45 V (slika 40 B). Može se primetiti i to da su struje pikova pri drugom skeniranju bile niže nego pri prvom. Do ovog pada dolazi usled prevlačenja površine elektrode polimernim filmom pri anodnoj oksidaciji  $L$ -dope<sup>333</sup>, kao i avarola<sup>301</sup>. Poznato je da do stvaranja ovakvog polimernog filma dolazi pri oksidaciji mnogih fenolnih jedinjenja, zbog toga što fenolni radikali koji tom prilikom nastaju podležu dimerizaciji i polimerizaciji sa drugim radikalima<sup>334</sup> ili molekulima<sup>335</sup>. Sličan proces može se očekivati i u slučaju  $L$ -dope.

Sa povećanjem koncentracije avarola, na ciklovoltamogramima je došlo do pojave dodatnog para pikova, koji odgovaraju oksidoredukciji samog avarola. Potencijali na kojima su se pikovi avarola i  $L$ -dope pojavili bili su razdvojeni dovoljno (oko 200 mV) da bi dalja analiza dobijenih voltamograma bila moguća. U cilju povećanja osetljivosti, za dalju analizu upotrebljena je linearna voltimetrija<sup>336</sup> čiji je prvi izvod prikazan na slici 40 D.

Grafički prikazane vrednosti  $\log I_p$  u funkciji  $\log v$  uvek su formirale prave linije sa nagibom od 0,35 do 0,40 (slika 40 C). Dobijene vrednosti nagiba, to jest linearnost pravih na grafiku, ukazuju da na proces elektrooksidacije  $L$ -dope na elektrodi od staklastog ugljenika utiče difuzija. Nikolson i Šain (Nicholson i Shain) smatraju oblik krive  $I_p/v^{1/2}$  u funkciji brzine skeniranja (tzv. funkcije strujnog pika – eng. peak current function) (slika 40 E) jednim od kriterijuma za utvrđivanje mehanizma reakcije na elektrodi.<sup>337</sup> Eksponencijalno opadanje vrednosti ove krive sa povećanjem brzine skeniranja ukazuje na mehanizam kod koga nakon prenosa elektrona dolazi do hemijske reakcije. Oblik ove krive bio je isti bez obzira na koncentraciju avarola, što dovodi do zaključka da je mehanizam elektrodne reakcije nepromenjen. Zavisnost vrednosti struje

pikova koji odgovaraju procesu oksidacije L-dope od brzine skeniranja prikazana je u prilogima 1 i 2. Zavisnost vrednosti  $I_p$  u funkciji  $v^{1/2}$  data je na slici 41.



**Slika 41.** Zavisnost vrednosti  $I_p$  u funkciji  $v^{1/2}$  za sistem koji je sadržao L-dope i avarol.

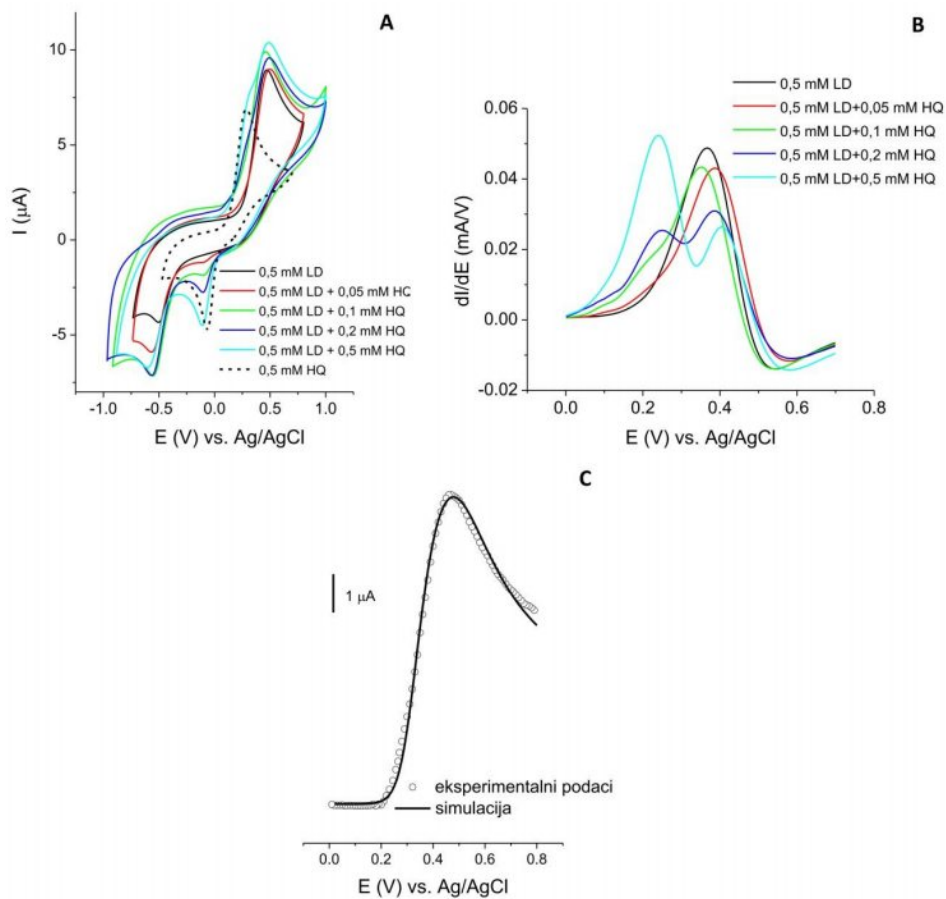
Elektrohemijsko ponašanje L-dope ispitivano je i u prisustvu hidrohina, u istom koncentracionom opsegu kao i u slučaju avarola (slika 42). Sa dobijenih ciklovoltamograma može se uočiti isto ponašanje kao i kod sistema avarol/L-dopa, s tim da je u slučaju sistema hidrohinon/L-dopa preklapanje pikova bilo izraženije.

L-dopa pokazuje ireverzibilno elektrohemijsko ponašanje na čistoj elektrodi od staklastog ugljenika, pri čemu je razmak pikova bio veći od 59 mV. Potencijal pika u funkciji brzine skeniranja može se predstaviti izrazom<sup>338</sup>:

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{(1-a)nF} \left\{ 0.780 + 2.303 \log \left( \frac{D_R^{1/2}}{k^0} \right) + 2.303 \log \left[ \frac{(1-a)nFv}{RT} \right]^{1/2} \right\} \quad (39)$$

gde su  $R$ ,  $T$  i  $F$  univerzalna gasna konstanta, apsolutna temperatura i Faradejeva konstanta, respektivno.  $D_R$  je difuzioni koeficijent redukovane vrste,  $k^0$  je standardna heterogena konstanta brzine reakcije,  $\alpha$  je koeficijent prenosa energije,  $n$  je broj elektrona prenetih tokom heterogene reakcije, a  $v$  je brzina skeniranja.

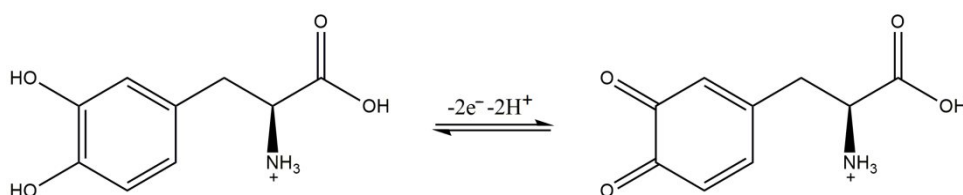




**Slika 42.** (A) ciklovoltamogrami snimljeni u rastvoru 0,5 mM  $L$ -dope u 0,1 M fosfatnom puferu sa različitim koncentracijama hidrohinona, (B) Prvi izvod linearne voltametrije, (C) simulirani anodni deo voltamograma smeše 0,5 mM  $L$ -dope i 0,1 mM hidrohinona u fosfatnom puferu snimljenih brzinom od  $20 \text{ mVs}^{-1}$ . Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>331</sup>

Kako bi bilo moguće odrediti heterogenu standardnu konstantu brzine reakcije ( $k^0$ ), neophodno je izvršiti računarsku simulaciju snimljenih voltamograma. Simulacije su vršene u programu CV\_EC\_Simulator v\_12.<sup>339</sup> Pretpostavljeni mehanizam elektrooksidacije  $L$ -dope upotrebljen za simulacije dat je na slici 43. Podaci su pre simulacija korigovani za vrednost pozadinske struje, dobijene snimanjem ciklovoltamograma pod istim uslovima, u odsustvu  $L$ -dope. Greška merenja određena je kao standardna devijacija vrednosti dobijenih simulacijom voltamograma snimljenih pri različitim brzinama skeniranja.<sup>340,341</sup> Reprezentativni simulirani voltamogrami avarola i

hidrohinona prikazani su na slikama 40 F i 42 C. Tokom simulacija je upotrebljena literaturno dostupna vrednost difuzionog koeficijenta L-dope ( $1,06 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ).<sup>341</sup>



**Slika 43.** Pretpostavljeni mehanizam elektrohemijske oksidacije L-dope na površini elektrode.

Vrednost  $k^0$  ukazuje na lakoću prenosa elektrona u posmatranom procesu. Postoje uobičajene vrednosti  $k^0$  za reverzibilne ( $k > 2 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ ), kvazi-reverzibilne ( $5 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1} < k < 2 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ ) i ireverzibilne ( $k < 5 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ ) elektrodne procese. U skladu sa tim, elektrooksidacija L-dope je kvazi-reverzibilan proces.

U prethodnim istraživanjima,<sup>299</sup> ispitivan je efekat fizisorbovanog i hemisorbovanog hinonskog monosloja na elektrooksidaciju katehola. Formiranje hemisorbovanog monosloja katalitički deluje na oksidaciju katehola. Pretpostavlja se da se ubrzanje koraka u kome dolazi do prenosa naelektrisanja javlja usled vodoničnog vezivanja hinonskog kiseonika i katehola. Na osnovu ovde prikazanih rezultata (tabela 5), može se zaključiti da uticaj hinona na oksidaciju katehola zavisi od njihovog odnosa. Promena vrednosti  $k^0$  sa promenom odnosa avarol/L-dopa, odnosno hidrohinon/L-dopa ukazuje na to da prenos naelektrisanja može biti ubrzan u pojedinim odnosima koncentracija. Pri odnosu od 0,1 (za oba sistema), vrednost  $k^0$  bila je umanjena, te je transfer elektrona bio otežan. Najveća vrednost  $k^0$  uočena je kod avarola/L-dope u odnosu 0,4, i hidrohinona/L-dope u odnosu 0,2. Kod odnosa 1 (u oba sistema), dobijena je umanjena vrednost  $k^0$ . Može se pretpostaviti da u ovom odnosu formiranje polimernog sloja dovodi do pasivizacije elektrode, a time i do otežanog prenosa naelektrisanja.

Iz tabele 5 može se uočiti i da su vrednosti  $k^0$  bile niže kod eksperimenata izvedenih u smeši etanol/pufer (eksperimenti sa avarolom), nego u samom fosfatnom puferu (eksperimenti sa hidrohinonom). Poznato je da atomi vodonika iz  $-\text{NH}^{3+}$  i fenolnih hidroksilnih grupa dopamina mogu formirati vodonične veze sa hidroksilnom

grupom etanola.<sup>342</sup> Slično ponašanje moguće je očekivati i u slučaju *L*-dope i etanola, usled čega bi proces oksidacije u smeši etanol/pufer bio otežan. Osim toga, moguće reakcije između molekula i jona u rastvoru u značajnoj meri zavise od protonovanosti/deprotonovanosti *L*-dope. Usled toga je moguće i postojanje snažnih jon-dipol interakcija sa neorganskim jonima prisutnim u fosfatnom puferu. Da bi se to potvrdilo, neophodno je izvršiti dodatna istraživanja.

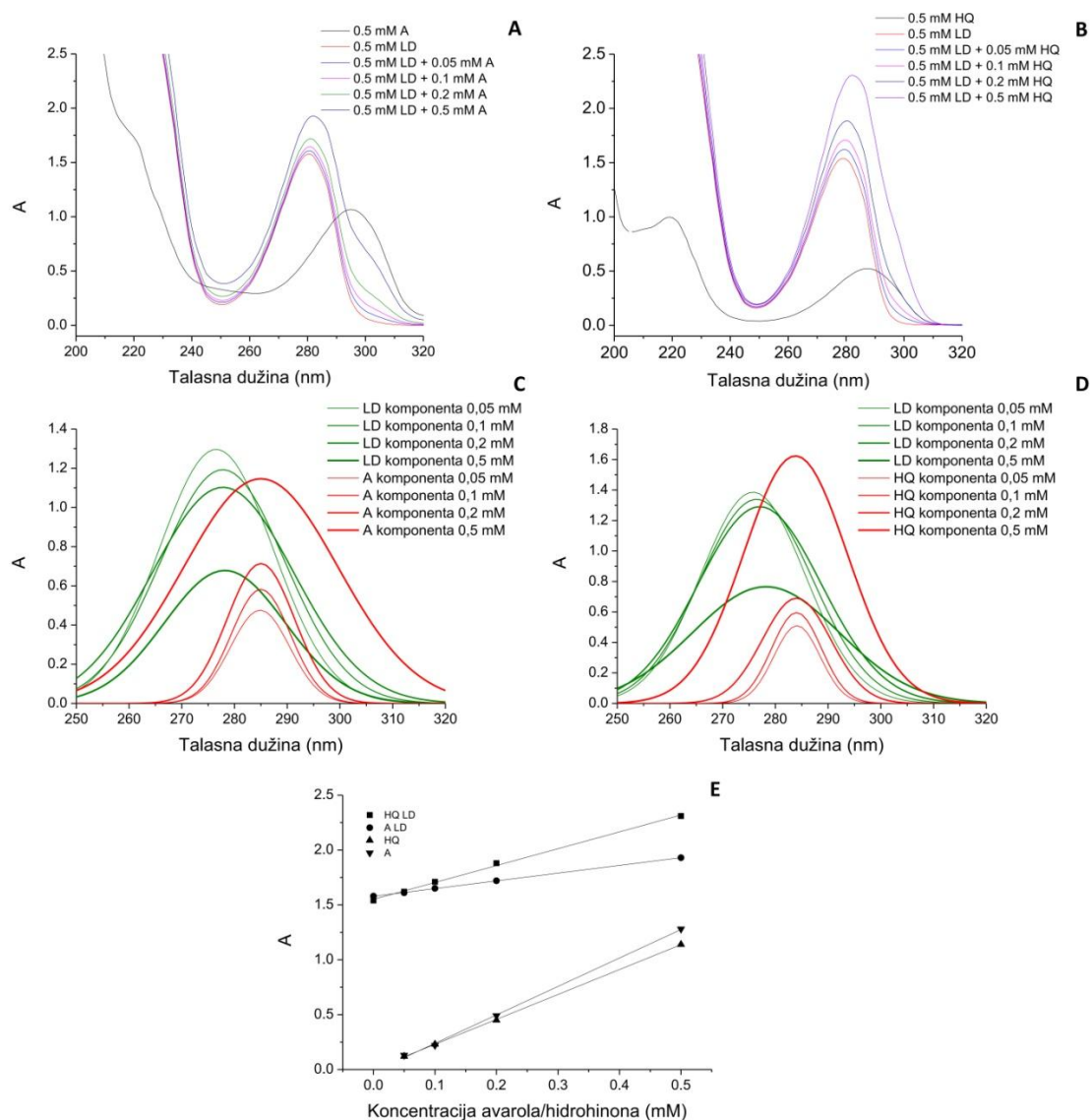
**Tabela 5.** Vrednosti  $k^0$  za sistem koji sadrži 0,5 mM *L*-dopu u prisustvu različitih koncentracija avarola, odnosno hidrohina. Pilagođeno iz rada kandidata.<sup>331</sup>

Koncentracija	Odnos	Sa avarolom	Sa hidrohonom
avarola ili hidrohina	A/LD ili HQ/LD	$k^0 \times 10^{-4} \text{ (cm s}^{-1}\text{)}$	$k^0 \times 10^{-4} \text{ (cm s}^{-1}\text{)}$
0	-	4,8	5,8
0,05 mM	0,1	3,7	5,2
0,1 mM	0,2	4,0	5,9
0,2 mM	0,4	4,9	5,4
0,5 mM	1	3,2	5,0

## 4.5. Rezultati UV-Vis eksperimenata

UV-Vis spektri *L*-dope u prisustvu avarola, odnosno hidrohina u različitim koncentracijama prikazani su na slici 44. U skladu sa dostupnim podacima<sup>343</sup>, dva maksimuma koji se na UV-Vis spektru *L*-dope javljaju na 218-280 nm mogu se pripisati  $\pi-\pi^*$  i  $L_a-L_b$  prelazima, respektivno.  $L_a-L_b$  prelaz se kod avarola i hidrohina javlja na nešto većim talasnim dužinama (295 i 287 nm, respektivno). Po dodatku avarola/hidrohina u rastvor *L*-dope, došlo je do blagog pomeranja maksimuma na 280 nm ka većim talasnim dužinama (batohromni pomeraj). To ukazuje na postojanje izvesnih interakcija između *L*-dope i avarola/hidrohina. Pouzdanija interpretacija UV-Vis spektara smeše jedinjenja može se dobiti dekonvolucijom apsorpcionih maksimuma

u obliku sume Gausijanskih krivih.<sup>344</sup> U tu svrhu, spektri su najpre skalirani do opsega talasnih dužina od 250-320 nm (što odgovara oblasti apsorpcionog maksimuma smeše avarola/hidrohinona sa L-dopom), nakon čega je izvršena njihova dekonvolucija upotrebom softvera Fityk (verzija 1.3.1)<sup>345</sup>, na dve Gausijanske komponente, fitovane Sbplx metodom (slika 44 C i D)<sup>346</sup>.



**Slika 44.** UV-Vis spektri L-dope: (A) u prisustvu različitih koncentracija avarola u smeši etanola i fosfatnog pufera, (B) u prisustvu različitih koncentracija hidrohinona u 0,1 M fosfatnom puferu, (C) dekonvoluirani UV-Vis spektar L-dope u prisustvu avarola, (D) dekonvoluirani UV-Vis spektar L-dope u prisustvu hidrohinona, (E) kalibracione prave za oba ispitivana sistema, kao i za avarol i hidrohinon zasebno. Prilagođeno iz rada kandidata.<sup>331</sup>

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da doprinos komponente koja potiče od avarola, odnosno hidrohina, raste sa porastom njihove koncentracije, što je u skladu sa očekivanjima. Nasuprot tome, doprinos komponente koja potiče od L-dope opadao je sa porastom koncentracije ovih molekula, iako je za očekivati bilo da ostane nepromenjen. Na osnovu toga je moguće zaključiti da između L-dope i avarola/hidrohina zaista dolazi do interakcije.

Osim pomeranja apsorpcionog maksimuma, i promena u apsorpcionom maksimumu može pružiti informaciju o intenzitetu reakcije. Iz tog razloga, nacrtane su kalibracione prave za oba posmatrana sistema, očitavanjem vrednosti apsorpcije na 280 nm za datu koncentraciju supstanci. Izvedeni su i uporedni eksperimenti sa variranjem koncentracije samog avarola, odnosno hidrohina. Njihov doprinos apsorpciji na 280 nm prikazan je zajedno sa kalibracionim pravama za sistem avarol + L-dopa, odnosno hidrohinon + L-dopa (slika 44 E). Pošto nagib pravih zavisi jedino od koeficijenta apsorpcije, njegova promena predstavljala bi i promenu u elektronskoj gustini ispitivanih supstanci, a time bi se dobila i informacija o intenzitetu interakcije između L-dope i avarola/hidrohina. Nagibi pravih za smeše bili su niži nego za pojedinačne supstance. Prisustvo L-dope je u manjoj meri uticalo na ponašanje avarola u poređenju sa hidrohonom. Ovo se može objasniti konformacionim ograničenjima avarola, slabom reaktivnošću terpenoidnog dela ovog molekula, ili interakcijom L-dope sa etanolom prisutnim u rastvoru. Interakciji L-dope sa etanolom u prilog ide i mala razlika u apsorpciji rastvora čiste L-dope u zavisnosti od rastvarača.

## 5. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije, teorijski i eksperimentalno je analizirana antiradikalna aktivnost avarola, seskviterpenoidnog hidrohina izolovanog iz morskog sunđera *Dysidea avara*. Dok je eksperimentalno analizirana antiradikalna aktivnost avarola, za teorijsku analizu odabran je hidrohina, jer je pretpostavljeni aktivni segment molekula avarola, a zbog svojih dimenzija je znatno jednostavniji za modelovanje. Osim toga, primenom ciklične voltometrije i ultraljubičaste i vidljive spektroskopije ispitane su i interakcije avarola sa neurotransmiterom L-dopom.

Teorijski su analizirane interakcije hidrohina sa hidroksilnim, hidroperoksilnim i metoksi radikalom. Hidroksilni i hidroperoksilni radikal odabrani su zbog svog biološkog značaja (delom i zbog malih dimenzija, jer su jednostavniji za modelovanje). Metoksi radikal je odabran zbog svojih malih dimenzija, kao jednostavan model za proučavanje interakcija hidrohina (avarola) sa radikalima organskog porekla. Antiradikalna svojstva hidrohina analizirana su u gasovitoj fazi. Kvantna teorija atoma u molekulima (QTAIM) je teorijska tehnika koja je pružila dublje razumevanje promena koje se u sistemu hidrohina i odgovarajućih radikala dešavaju tokom hemijskih reakcija. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se proces apstrakcije atoma vodonika sa molekula hidrohina dešava putem PCET mehanizma, te da proton i elektron istovremeno vrše prelaz na radikalski atom kiseonika.  $\text{H-O}^{\text{HQ}}$  i  $\text{H-O}^{\text{rad}}$  rastojanja i vrednosti elektronske gustine u njima odgovarajućim kritičnim tačkama veze monotono se menjaju u smeru od predreakcionog ka postreakcionom kompleksu. Ključne promene dužine posmatranih veza, a time i njihovih svojstava (elektronske gustine, njenog Laplasijana, delokalizacionog indeksa) odvijaju se u dolini proizvoda, bliže globalnom minimumu hiperpovršni potencijalne energije.

Kod svih posmatranih reakcija, svojstva atoma vodonika u blizini prelaznog stanja imaju neobičan trend, zbog blizine i donora i akceptora. Usled snažnih interakcija sa dva elektronegativna atoma kiseonika, kriva koja predstavlja promenu naelektrisanja atoma vodonika tokom reakcije ima neobični „M” oblik. Iz istih razloga se neuniformno menja i zapremina atoma vodonika tokom reakcije. Na osnovu primene tri različita modela, ustanovljeno je da kod reakcija hidrohina sa hidroksilnim i hidroperoksilnim

radikalom, rastvarač ne utiče na promenu mehanizma kojim atom vodonika biva apstrahovan, niti utiče na način transfera samog protona i elektrona.

U cilju prevazilaženja problema rastvorljivosti avarola u vodi, izvršena je njegova inkorporacija u zid lipozoma. U tu svrhu, kao model upotrebljeni su 100 % DPPC lipozomi, zbog njihove jednostavnosti pravljenja i biokompatibilnosti. Ustanovljeno je da je nakon ekstruzije njihova veličina bila uniformna (oko 90-100 nm). Obeležavanjem pomoću spinske probe 5-DS ustanovljeno je da ni 100 % DPPC ni avarolski lipozomi ne pokazuju promene u fluidnosti membrane. Takođe, ustanovljeno je da su ispitivani lipozomi stabilni mesec dana nakon sintetisanja. Nakon interakcije obe vrste lipozoma sa  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{NO}\cdot$  radikalima, uočeno je da parametar uređenosti blago opada. Na osnovu toga zaključeno je da je oblast lipidnog dvosloja najbliža granici sa vodenom sredinom postala nešto fluidnija. Ova promena bila je manje izražena kod avarolskih lipozoma, ukazujući na to da avarol zapravo štiti lipozome od lipidne peroksidacije.

EPR eksperimentima ustanovljeno je da avarol poseduje snažnu antiradikalnu aktivnost prema reaktivnim kiseoničnim vrstama, pošto umanjuje aktivnost  $\cdot\text{OH}$  radikala za 86,2 % i  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikala za 50,9 %. Ovi rezultati su u dobroj korelaciji sa rezultatima teorijskih proračuna kojima je ustanovljeno da je energijska barijera za reakciju hidrohina sa  $\cdot\text{OH}$  radikalom izuzetno niska (1 kJ/mol). Kao generator za proizvodnju  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikala bolje je koristiti hipoksantin/ksantin-oksidazni sistem, pošto je eksperimentalno ustanovljeno da riboflavin (takođe generator  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikala) interaguje sa avarolom, što se odražava na količinu generisanih  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikala u sistemu. Avarol ima izvesnu, ali blagu antiradikalnu aktivnost prema reaktivnim azotnim vrstama, pošto je umanjio aktivnost  $\text{NO}\cdot$  radikala za 23,6 %. Kako je  $\text{NO}\cdot$  radikal prisutan pri normalnim fiziološkim uslovima u organizmu kao signalni molekul, njegovo intenzivno uklanjanje bilo bi nepoželjno. Pošto je stabilnost  $\text{Asc}\cdot$  radikala u vodenoj sredini tokom dužeg vremenskog perioda upitna, kao i sposobnost ovog radikala da naruši integritet lipozoma i time dođe u kontakt sa avarolom, njegova interakcija sa avarolom testirana je u DMSO. Ustanovljeno je da avarol poseduje anti-askorbil radikalnu aktivnost, pošto je umanjio aktivnost  $\text{Asc}\cdot$  za 61,8 %. Proučavanjem kinetika ovih reakcija potvrđeni su isti trendovi. Međutim, uočeno je i da su kinetike ovih procesa složene, verovatno jer se uporedo sa interakcijom između avarola i

odabranih radikala odvijaju i sporedni procesi koji imaju uticaj na redukciju signala spin-adukata i askorbil radikala. Ustanovljeno je da je snimanje EPR spektara dva minuta od generisanja slobodnih radikala optimalno za analizu, pošto tada sporedni procesi nisu izraženi. Opšti zaključak EPR eksperimenata važan je sa tri aspekta. Najpre, pokazano je da avarol poseduje izuzetno značajnu antiradikalisku aktivnost prema odabranim, fiziološki relevantnim radikalima, čime se potvrđuje njegov potencijalni značaj u tretmanu oboljenja uzrokovanih slobodnim radikalima (prevashodno Alchajmerove bolesti), ili poslužiti kao model za razvoj novih terapija koje bi pomogle u njihovom tretmanu. Zatim, uprkos činjenici da avarol može proći kroz krvno-moždanu barijeru, njegova primena bila je ograničena činjenicom da je nerastvoran u vodi, te da bi se mogao koristiti jedino lokalno, što bi kod neurodegenerativnih oboljenja bilo invazivno, a time praktično neprihvatljivo. Inkorporacijom u DPPC liposome ovaj problem je prevaziđen, odnosno avarol je indirektno učinjen „rastvornim” u vodi, pa se neometano može transportovati putem krvi. I treće, EPR eksperimenti sa avarolom prvi su takve vrste. Nikada ranije u literaturi nije opisana kombinacija EPR metode i lipozomske inkorporacije/enkapsulacije u cilju proučavanja antiradikaliske aktivnosti vodonerastvornih jedinjenja. Sličnih pokušaja bilo je sa micelama (ali ne prema biološki relevantnim radikalima), nad kojima lipozomi imaju značajnih prednosti.

Ciklovoltametrijskim eksperimentima ustanovljeno je da modifikacijom površine elektrode od staklastog ugljenika pomoću avarola dolazi do promene konstante brzine prenosa elektrona između elektrode i L-dope, te da je prenos naelektrisanja poboljšan u određenom opsegu koncentracija. Kako ciklovoltametrijski, tako i UV-Vis spektroskopskom analizom ustanovljeno je da je interakcija L-dope bila snažnija sa hidrohonom nego sa avarolom, najverovatnije zbog konformacionih ograničenja koja se javljaju kao posledica prisustva terpenoidnog segmenta u strukturi avarola.

Opšti zaključak koji je moguće izvesti na osnovu rezultata eksperimenata i proračuna prikazanih u okviru ove teze jeste da je moguće koristiti hidrohion kao model-molekul za ispitivanje interakcija avarola sa različitim nevoluminoznim sistemima, te da hidrohion jeste nosilac antiradikaliske aktivnosti avarola. Sem toga, postoji važna korelacija između teorijskih proračuna i rezultata EPR eksperimenata. Avarol poseduje izuzetno visoku antiradikalisku aktivnost prema gotovo svim



odabranim radikalima, a ujedno i biološki korisnu selektivnost u reakciji sa njima, dok je njegova nerastvorljivost u vodi prevaziđena inkorporacijom u zid lipozoma. Modifikacijom površine elektroda avarolom, moguće je povećati brzinu transporta elektrona između elektrode i neurotransmitera.

Iz eksperimenata i proračuna izvršenih u okviru ove disertacije moguće je dobiti i nekoliko smernica za dalja istraživanja. Najpre, dobijeni rezultati sugerišu da bi istraživanja trebalo proširiti i na molekule strukturno slične avarolu, kako bi se što bolje razumela hemija ovih jedinjenja, a u cilju iznalaženja najoptimalnije strukture za terapijske svrhe i razvoj novih lekova za terapiju bolesti uzrokovanih slobodnim radikalima.

Sa poboljšanjem računarskih resursa moguće bi bilo umesto hidrohina kao model-molekula, proračune vršiti koristeći strukturu samog avarola. Iako se smatra da je hidrohinski segment ovog molekula nosilac njegove biološke aktivnosti, (što je i potvrđeno, kako proračunima, tako i eksperimentima u okviru ove teze), poželjno je ispitati i način na koji seskviterpenoidni segment interaguje sa okolinom. Ovo je korisno i zbog toga što nije isključeno da upravo ova celina molekul avarola čini manje toksičnim u odnosu na srodna jedinjenja, pa i u odnosu na sam hidrohinon. Opisanoj metodologiji potrebno je primeniti i na druge radikale, kako bi se dobila što celovitija slika ovih procesa.

EPR eksperimente trebalo bi proširiti, ne samo na avarolu srodna jedinjenja i druge slobodnoradikalske vrste, već i tako da budu ispitane drugačije formulacije lipozoma. Ovo je korisno radi pronalaska najoptimalnije formulacije sa aspekta stabilnosti i vremena zadržavanja lipozoma u organizmu, ali i efikasnosti otpuštanja aktivnih komponenti.

Ciklovoltametrijske eksperimente trebalo bi proširiti i na druge neurotransmitere, ali i testirati sposobnost njihove simultane detekcije u rastvoru upotrebom elektroda čija je površina modifikovana avarolom.

## 6. Literatura

1. Orhan, I. E.; Ozcelik, B.; Konuklugil, B.; Putz, A.; Kaban, U. G.; Proksch, P. Bioactivity screening of the selected Turkish marine sponges and three compounds from *Agelas oroides*. *Rec. Nat. Prod.* **6**, 356–367 (2012).
2. De Rosa, S.; Tommonaro, G. Bioactive marine prenylated quinones/quinols. *Bioact. Nat. Prod.* **36**, 163–218 (2012).
3. Tommonaro, G.; Pejin, B.; Iodice, C.; Tafuto, A.; De Rosa, S. Further in vitro biological activity evaluation of amino-, thio- and ester-derivatives of avarol. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **30**, 333–335 (2015).
4. Pejin, B.; Iodice, C.; Kojić, V.; Jakimov, D.; Lazović, M.; Tommonaro, G. In vitro evaluation of cytotoxic and mutagenic activity of avarol. *Nat. Prod. Res.* **30**, 1293–1296 (2016).
5. Gordaliza, M. Cytotoxic terpene quinones from marine sponges. *Mar. Drugs* **8**, 2849–2870 (2010).
6. Pejin, B.; Iodice, C.; Tommonaro, G.; Stanimirović, B.; Ćirić, A.; Glamočlija, J.; Nikolić, M.; De Rosa, S.; Soković, M. Further in vitro evaluation of antimicrobial activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **15**, 583–588 (2014).
7. Amigó, M.; Payá, M.; Braza-Boils, A.; De Rosa, S.; Terencio, M. C. Avarol inhibits TNF- $\alpha$  generation and NF- $\kappa$ B activation in human cells and in animal models. *Life Sci.* **82**, 256–64 (2008).
8. Ferrandiz, M.; Sanz, M.; Bustos, G.; Paya, M.; Alcaraz, M.; Derosa, S. Avarol and avarone, two new antiinflammatory agents of marine origin. *Eur. J. Pharmacol.* **253**, 75–82 (1994).
9. Sladić, D.; Novaković, I.; Vujčić, Z.; Božić, T.; Božić, N.; Milić, D.; Šolaja, B.; Gašić, M. J. Protein covalent modification by biologically active quinones. *J. Serb. Chem. Soc.* **69**, 901–907 (2004).
10. De Rosa, S.; De Giulio, A.; Iodice, C. Biological effects of prenylated hydroquinones: structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp, and fish lethality assays. *J. Nat. Prod.* **57**, 1711–1716 (1994).
11. Anđus, R. K.; Ćirković, T.; Marjanović, M.; Gašić, M. J.; Dogović, N.; Sladić, D.

- Synaptosome inhibition by cytostatically and/or antibioticly active substances of marine invertebrate origin; modeling of dose-response patterns. *Period. Biol.* **88**, 99–101 (1986).
12. Bush, A. I.; Tanzi, R. E. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics* **5**, 421–432 (2008).
  13. Liu, D. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Neurosci.* **7**, 159–167 (1996).
  14. Koutsilieris, E.; Scheller, C.; Grünblatt, E.; Nara, K.; Li, J.; Riederer, P. Free radicals in Parkinson's disease. *J. Neurol.* **249**, 1–5 (2002).
  15. Van Horsen, J.; Witte, M. E.; Schreibelt, G.; de Vries, H. E. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1812**, 141–150 (2011).
  16. Knight, J. A. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **27**, 11–25 (1997).
  17. De Rosa, S.; Mitova, M. Bioactive marine sesterterpenoids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **32**, 109–168 (2005).
  18. Ling, T.; Poupon, E.; Rueden, E. J.; Kim, S. H.; Theodorakis, E. A. Unified synthesis of quinone sesquiterpenes based on a radical decarboxylation and quinone addition reaction. *J. Am. Chemistry Soc.* **124**, 12261–12267 (2002).
  19. De Caralt, S.; Sánchez-Fontenla, J.; Uriz, M. J.; Wijffels, R. H. In situ aquaculture methods for *Dysidea avara* (demospongiae, porifera) in the Northwestern Mediterranean. *Mar. Drugs* **8**, 1731–1742 (2010).
  20. Brynda, M. Introduction to electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biomed. Appl. Biophys.* **3**, 59–98 (2010).
  21. Zylberberg, C.; Matošević, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv.* **23**, 3319–3329 (2016).
  22. Kleschyov, A. L.; Wenzel, P.; Munzel, T. Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **851**, 12–20 (2007).
  23. Janzen, E. G. Spin trapping. *Methods Enzymol.* **105**, 188–198 (1984).
  24. Buettner, G. R.; Kiminyo, K. P. Optimal EPR detection of weak nitroxide spin

- adduct and ascorbyl free radical signals. *J. Biochem. Biophys. Methods* **24**, 147–151 (1992).
25. Mena, M. Á.; Casarejos, M. J.; Solano, R. M.; García De Yébenes, J. Half a century of L-DOPA. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 880–893 (2009).
  26. Wang, L.; Bai, J.; Huang, P.; Wang, H.; Zhang, L.; Zhao, Y. Electrochemical behavior and determination of epinephrine at a penicillamine self-assembled gold electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.* **1**, 238–249 (2006).
  27. Lushchak, V. I. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI J.* **13**, 922–937 (2014).
  28. Kelly, F. J. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup. Environ. Med.* **60**, 612–616 (2003).
  29. Sisein, E. A. Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Sch. Acad. J. Biosci.* **2**, 110–118 (2014).
  30. Devasagayam, T. P. A.; Tilak, J.; Bloor, K. K.; Sane, K. S.; Ghaskadbi, S. S.; Lele, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India* **52**, 794–804 (2004).
  31. Gomberg, M. On trivalent carbon. *J. Am. Chem. Soc.* **22**, 757–771 (1900).
  32. Commoner, B.; Townsent, J.; Pake, G. E. Free radicals in biological materials. *Nature* **174**, 689–691 (1954).
  33. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
  34. Bartosz, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1303–1315 (2009).
  35. Mittal, C. K.; Murad, F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4360–4364 (1977).
  36. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2002).
  37. Allen, R.; Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 463–499 (2000).
  38. Pham-Huy, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* **4**, 89–96 (2008).

39. McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**, 652–659 (2000).
40. Yoshikawa, T.; Naito, Y. What is oxidative stress? *Japan Med. Assoc. J.* **45**, 271–276 (2002).
41. Krzyminiewski, R.; Kruczynski, Z.; Stepien, A.; Dobosz, B. Spin traps in the detection of free radicals in the blood of patients with ischemia. *Pol. J. Med. Phys. Eng.* **15**, 47–54 (2009).
42. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oksford, Ujedinjeno Kraljevstvo (1999).
43. Martínez, M. C.; Andriantsitohaina, R. Reactive nitrogen species: Molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 669–702 (2009).
44. Barbusiński, K. Controversy over Fenton mechanism. *Ecol. Chem. Eng. S.* **16**, 347–358 (2009).
45. Müller, W. E. G.; Sladić, D.; Zahn, R. K.; Bassler, K. H.; Dogović, N.; Gerner, H.; Gašić, M. J.; Schröder, H. C. Avarol-induced DNA strand breakage in vitro and in Friend erythroleukemia cells. *Cancer Res.* **47**, 6565–6571 (1987).
46. Davies, M. J. Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods* **109**, 21–30 (2016).
47. Yadav, A.; Kumari, R.; Yadav, A.; Mishra, J. P.; Srivatva, S.; Prabha, S. Antioxidants and its functions in human body - A review. *Res. Environ. Life Sci.* **9**, 1328–1331 (2016).
48. Dornelles Schneider, C.; Reischak de Oliveira, A. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev. Bras. Med. Esporte* **10**, 314–318 (2009).
49. Yu, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**, 139–162 (1994).
50. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* **70**, 257–265 (2012).
51. Vollaard, N. B. J.; Shearman, J. P.; Cooper, C. E. Exercise-induced oxidative stress: Myths, realities and physiological relevance. *Sport. Med.* **35**, 1045–1062

- (2005).
52. Tirzitis, G.; Bartosz, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim. Pol.* **54**, 139–142 (2010).
  53. Saletnik, B.; Bartosz, G.; Markowskic, J.; Sadowska-Bartosz, I. Total antioxidant capacity of feces of mammalian herbivores and carnivores. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **69**, 165–169 (2014).
  54. Kirschbaum, B. Total urine antioxidant capacity. *Clin. Chim. Acta* **305**, 167–173 (2001).
  55. Serpen, A.; Capuano, E.; Fogliano, V.; Gökmen, V. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7676–7681 (2007).
  56. Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2512–2519 (2003).
  57. Shalaby, E. A.; Shanab, S. M. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J. Geo-marine Sci.* **42**, 556–564 (2013).
  58. Pisoschi, A. M.; Cimpeanu, C.; Predoi, G. Electrochemical methods for total antioxidant capacity and its main contributors determination: A review. *Open Chem.* **13**, 824–856 (2015).
  59. Sochor, J.; Dobes, J.; Krystofova, O.; Ruttkay-Nedecky, B.; Babula, P.; Pohanka, M.; Jurikova, T.; Zitka, O.; Adam, V.; Klejdus, B.; Kizek, R. Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties. *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 8464–8489 (2013).
  60. Chang, R. C. C. *Advanced understanding of neurodegenerative diseases*. Intech, Rijeka, Hrvatska (2011).
  61. Nowotny, P.; Kwon, J. M.; Goate, A. M. Alzheimer disease. *Encycl. Life Sci.* 1–6 (2001).
  62. Aprahamian, I.; Stella, F.; Forlenza, O. V. New treatment strategies for Alzheimer's disease: Is there a hope?. *Indian J. Med. Res.* **138**, 449–460 (2013).
  63. Wollen, K. Alzheimer's disease: The pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical and stimulatory therapies, with a discussion of treatment

- strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern. Med. Rev.* **15**, 223–244 (2010).
64. Cummings, J. L.; Morstorf, T.; Zhong, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline : Few candidates, frequent failures. *Alzheimers. Res. Ther.* **6**, 37 (2014).
  65. Jovanović, Z. Mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Med. Pregl.* **65**, 301–307 (2012).
  66. Duthey, B. Alzheimer disease and other dementias, update on 2004. *Bull. World Health Organ.* 6–77 (2013).
  67. Querfurth, H. W.; La Ferla, F. M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **362**, 329–344 (2010).
  68. Howard, R.; McShane, R.; Lindesay, J.; Ritchie, C.; Baldwin, A.; Barber, R.; Burns, A.; Denning, T.; Findlay, D.; Holmes, C.; Hughes, A.; Jacoby, R.; Jones, R.; Jones, R.; McKeith, I.; Macharouthu, A.; O'Brien, J.; Passmore, P.; Sheehan, B.; Juszczak, E.; Katona, C.; Hills, R.; Knapp, M.; Ballard, C.; Brown, R.; Banerjee, S.; Onions, C.; Griffin, M.; Adams, J.; Gray, R.; Johnson, T.; Bentham, P.; Phillips, P. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **366**, 893–903 (2012).
  69. Sung, S. C.; Sang-Rae, L.; Seung, U. K.; Hong, J. L. Alzheimer's disease and stem cell therapy. *Exp. Neurobiol.* **1**, 45–52 (2014).
  70. Kalara, R. N. The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **893**, 113–25 (1999).
  71. Vagnucci, A. H.; Li, W. W. Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet.* **361**, 605–608 (2003).
  72. Kook, S. Y.; Seok Hong, H.; Moon, M.; Mook-Jung, I. Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis. *Tissue Barriers* **1**, e23993 (2013).
  73. Montagne, A.; Barnes, S. R.; Sweeney, M. D.; Halliday, M. R.; Abhay, P.; Zhao, Z.; Toga, A. W.; Jacobs, R. E.; Liu, C. Y.; Harrington, M. G.; Chui, H. C.; Law, M.; Zloković, B. V. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* **85**, 296–302 (2016).
  74. Winblad, B.; Graf, A.; Riviere, M.-E.; Andreasen, N.; Ryan, J. M. Active immunotherapy options for Alzheimer's disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **6**, 1–12 (2014).

75. Leinenga, G.; Gotz, J. Scanning ultrasound removes amyloid- $\beta$  and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci. Transl. Med.* **7**, 278ra33 (2015).
76. Frecker, M. F.; Fraser, F. C.; Andermann, E.; Pryse-Phillips, W. E. Association between Alzheimer disease and amyotrophic lateral sclerosis? *Can. J. Neurol. Sci.* **17**, 12–14 (1990).
77. Kovačić, P.; Somanathan, R. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr. Neuropharmacol.* **10**, 289–302 (2015).
78. Sladić, D.; Gašić, M. J. Reactivity and biological activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol and related compounds from sponges of the order dictyoceratida. *Molecules* **11**, 1–33 (2006).
79. Jha, R. K.; Zi-Rong, X. Biomedical compounds from marine organisms. *Mar. Drugs* **2**, 123–146 (2004).
80. Stoddard, S. V.; Hamann, M. T.; Wadkins, R. M. Insights and ideas garnered from marine metabolites for development of dual-function acetylcholinesterase and amyloid- $\beta$  aggregation inhibitors. *Mar. Drugs* **12**, 2114–2131 (2014).
81. Haefner, B. Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today* **8**, 536–544 (2003).
82. Qiu, Y.; Xiu, M. W. A new sesquiterpenoid hydroquinone from the marine sponge *Dysidea arenaria*. *Molecules* **13**, 1275–1281 (2008).
83. Marcos, I. S.; Conde, A.; Moro, R. F.; Basabe, P.; Diez, D.; Urones, J. G. Quinone/hydroquinone sesquiterpenes. *Mini. Rev. Org. Chem.* **7**, 230–254 (2010).
84. Son, B. W.; Kim, J. C.; Choi, H. D.; Kang, J. S. A radical scavenging farnesylhydroquinone from a marine-derived fungus *Penicillium* sp. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 77–79 (2002).
85. Abdel-Lateff, A.; König, G. M.; Fisch, K. M.; Höller, U.; Jones, P. G.; Wright, A. D. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. *J. Nat. Prod.* **65**, 1605–1611 (2002).
86. 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).



87. Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Erpenbeck, D.; De Voogd, N. J.; Santodomingo, N.; Vanhoorne, B.; Kelly, M.; Hooper, J. N. A. Global diversity of sponges (Porifera). *PLOS ONE* **7**, e35105 (2012).
88. Terencio, M. C.; Ferrándiz, M. L.; Posadas, I.; Roig, E.; De Rosa, S.; De Giulio, A.; Payá, M.; Alcaraz, M. J. Suppression of leukotriene B4 and tumour necrosis factor  $\alpha$  release in acute inflammatory responses by novel prenylated hydroquinone derivatives. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **357**, 565–572 (1998).
89. De Pasquale, R.; Circosta, C.; Occhiuto, F.; De Stefano, S.; De Rosa, S. Central nervous system activity of terpenoids from marine sponge. *Pharmacol. Res. Commun.* **20**, 23–26 (1988).
90. Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Cariello, L.; Zanetti, L. Structure of two biologically active sesquiterpenoid amino-quinones from the marine sponge *Dysidea avara*. *Experientia* **38**, 896 (1982).
91. Utkina, N.K.; Denisenko, V.A.; Krasohin, V. B. Antioxidants from the Vietnamese marine sponges of the *Dysidea* genus. *Heal. Med. Ecol. Sci.* **3**, 55–56 (2014).
92. Pejin, B.; Glumac, M. A brief review of potent anti-CNS tumourics from marine sponges: covering the period from 1994 to 2014. *Nat. Prod. Res.* **32**, 375–384 (2018).
93. Pejin, B.; Kartali, T.; Stanimirović, B.; Karaman, M. Avarol effectively inhibits *Bacillus cereus* growth. *Asian J. Chem.* **26**, 8255–8256 (2014).
94. Pejin, B.; Tommonaro, G.; Glumac, M.; Jakimov, D.; Kojić, V. The redox couple avarol/avarone in the fight with malignant gliomas: the case study of U-251 MG cells. *Nat. Prod. Res.* **32**, 616–620 (2018).
95. Kurelec, B.; Zahn, R. K.; Gašić, M. J.; Britvić, S.; Lucić, D.; Müller, W. E. G. Antimutagenic activity of the novel antileukemic agents, avarone and avarol. *Mutat. Res.* **144**, 63–66 (1985).
96. Belisario, M. A.; Maturo, M.; Avagnale, G.; De Rosa, S.; Scopacasa, F.; De Caterina, M. In vitro effect of avarone and avarol, a quinone/hydroquinone couple of marine origin, on platelet aggregation. *Pharmacol. Toxicol.* **79**, 300–304 (1996).

97. De Pasquale, R.; Circosta, C.; Occhiuto, F.; De Rosa, S.; De Stefano, S. Pharmacological studies on terpenoids from marine sponges: Analgesic and muscle relaxant effects. *Phyther. Res.* **5**, 49–53 (1991).
98. Vujčić, M.; Tufegdžić, S.; Vujčić, Z.; Gašić, M.; Sladić, D. Interactions of the anti-tumor sesquiterpene hydroquinone avarol with DNA in vitro. *J. Serb. Chem. Soc.* **72**, 1265–1269 (2008).
99. Vujčić, M.; Tufegdžić, S.; Novaković, I.; Đikanović, D.; Gašić, M.; Sladić, D. Studies on the interactions of bioactive quinone avarone and its methylamino derivatives with calf thymus DNA. *Int. J. Biol. Macromol.* **62**, 405–410 (2013).
100. Novaković, I.; Vujčić, Z.; Božić, T.; Božić, N.; Milosavić, N.; Sladić, D. Chemical modification of  $\beta$ -lactoglobulin by quinones. *J. Serb. Chem. Soc.* **68**, 243–248 (2003).
101. Müller, W. E. G.; Maidhof, A.; Zahn, R. K.; Schröder, H. C.; Heidemann, D.; Eich, E.; Bernd, A.; Seibert, G.; Gašić, M. J.; Kurelec, B. Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **45**, 4822–4826 (1985).
102. Božić, T.; Novaković, I.; Gašić, M. J.; Juranić, Z.; Stanojković, T.; Tufegdžić, S.; Kljajić, Z.; Sladić, D. Synthesis and biological activity of derivatives of the marine quinone avarone. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 923–929 (2010).
103. Namba, T.; Kodama, R. Avarol induces apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells by activating PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP signaling. *Mar. Drugs* **13**, 2376–2389 (2015).
104. De Giulio, A.; De Rosa, S.; Strazzullo, G.; Diliberto, L.; Obino, P.; Marongiu, M. E.; Pani, A.; La Colla, P. Synthesis and evaluation of cytostatic and antiviral activities of 3' and 4'-avarone derivatives. *Antivir. Chem. Chemother.* **2**, 223–227 (1991).
105. Tommonaro, G.; García-Font, N.; Vitale, R. M.; Pejin, B.; Iodice, C.; Cañadas, S.; Marco-Contelles, J.; Oset-Gasque, M. J. Avarol derivatives as competitive AChE inhibitors, non hepatotoxic and neuroprotective agents for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **122**, 326–338 (2016).
106. Pejin, B.; Iodice, C.; Tommonaro, G.; Bogdanović, G.; Kojić, V.; De Rosa, S. Further in vitro evaluation of cytotoxicity of the marine natural product

- derivative 4'-leucine-avarone. *Nat. Prod. Res.* **28**, 37–41 (2014).
107. Cozzolino, R.; De Giulio, A.; De Rosa, S.; Strazzullo, G.; Gašić, M. J.; Sladić, D.; Zlatović, M. Biological activities of avarol derivatives, 1. Amino derivatives. *J. Nat. Prod.* **53**, 699–702 (1990).
  108. Pejin, B.; Iodice, C.; Tommonaro, G.; De Rosa, S. Synthesis and biological activities of thio-avarol derivatives. *J. Nat. Prod.* **71**, 1850–1853 (2008).
  109. Amigó, M.; Payá, M.; De Rosa, S.; Terencio, M. C. Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF- $\alpha$  generation and NF- $\kappa$ B activation in mouse skin. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 353–365 (2007).
  110. Amigó, M.; Schalkwijk, J.; Olthuis, D.; De Rosa, S.; Payá, M.; Terencio, M. C.; Lamme, E. Identification of avarol derivatives as potential antipsoriatic drugs using an in vitro model for keratinocyte growth and differentiation. *Life Sci.* **79**, 2395–2404 (2006).
  111. Belisario, M. A.; Pecce, R.; Arena, A. R.; De Giulio, A.; Strazzullo, G.; De Rosa, S. Effect of avarol, avarone and nine of their natural and synthetic derivatives on microsomal drug-metabolizing enzymes. *Toxicol. Lett.* **57**, 183–193 (1991).
  112. Batke, E.; Ogura, R.; Vaupel, P.; Hummel, K.; Kallinowski, F.; Gašić, M. J.; Schröder, H. C.; Müller, W. E. G. Action of the antileukemic and anti-HTLV-III (anti-HIV) agent avarol on the levels of superoxide dismutases and glutathione peroxidase activities in L5178y mouse lymphoma cells. *Cell Biochem. Funct.* **6**, 123–129 (1988).
  113. Se-Kwon, K. *Handbook of anticancer drugs from marine origin*. Springer, Ham, Švajcarska (2015).
  114. Müller, W. E. G.; Zahn, R. K.; Gašić, M. J.; Dogović, N.; Maidhof, A.; Becker, C.; Diehl-Seifert, B.; Eich, E. Avarol, a cytostatically active compound from the marine sponge *Dysidea avara*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **80**, 47–52 (1985).
  115. Müller, W. E.; Dogović, N.; Zahn, R. K.; Maidhof, A.; Diehl-Seifert, B.; Becker, C.; Sachsse, W.; Gašić, M. J.; Schröder, H. C. Inhibition of mitosis by avarol, a natural product isolated from the sponge *Dysidea avara*. *Basic Appl. Histochem.* **29**, 321–330 (1985).
  116. Jiao, W-H.; Xu, T-T.; Gu, B-B.; Shi, G-H.; Zhu, Y.; Yang, F.; Han, B-N.; Wang, S-P.; Li, Y-S.; Zhang, W.; Li, J.; Lin, H-W. Bioactive sesquiterpene quinols and

- quinones from the marine sponge *Dysidea avara*. *RSC Adv.* **5**, 87730–87738 (2015).
117. Gordaliza, M. Synthetic strategies to terpene quinones/hydroquinones. *Mar. Drugs* **10**, 358–402 (2012).
  118. Seibert, G.; Raether, W.; Dogović, N.; Gašić, M. J.; Zahn, R. K.; Müller, W. E. G. Antibacterial and antifungal activity of avarone and avarol. *Zentralbl. bakt. mik. hyg. - Abt. I Orig. A* **260**, 379–386 (1985).
  119. Jeremić, M.; Pešić, M.; Dinić, J.; Banković, J.; Novaković, I.; Šegan, D.; Sladić, D. Simple avarone mimetics as selective agents against multidrug resistant cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **118**, 107–120 (2016).
  120. Vilipić, J.; Novaković, I.; Stanojković, T.; Matić, I.; Šegan, D.; Kljajić, Z.; Sladić, D. Synthesis and biological activity of amino acid derivatives of avarone and its model compound. *Bioorganic Med. Chem.* **23**, 6930–6942 (2015).
  121. Jeremić, M.; Dinić, J.; Pešić, M.; Stepanović, M.; Novaković, I.; Šegan, D.; Sladić, D. Alkylamino and aralkylamino derivatives of avarone and its mimetic as selective agents against non-small cell lung cancer cells, their antibacterial and antifungal potential. *J. Serb. Chem. Soc.* **83**, 1193–1207 (2018).
  122. Novaković, I.; Anđelković, U.; Zlatović, M.; Gašić, M. J.; Sladić, D. Bioconjugate of lysozyme and the antibacterial marine sesquiterpene quinone avarone and its derivatives. *Bioconjug. Chem.* **23**, 57–65 (2012).
  123. Pejin, B.; Ćirić, A.; Marković, D.; Tommonaro, G.; Soković, M. In vitro avarol does affect the growth of *Candida* sp. *Nat. Prod. Res.* **30**, 1956–1960 (2016).
  124. De Giulio, A.; De Rosa, S.; Di Vincenzo, G.; Strazzullo, G. Further bioactive derivative of avarol from *Dysidea avara*. *Tetrahedron* **46**, 7971–7976 (1990).
  125. Crispino, A.; De Giulio, A.; De Rosa, S.; Strazzullo, G. A new bioactive derivative of avarol from the marine sponge *dysidea avara*. *J. Nat. Prod.* **52**, 646–648 (1989).
  126. Tsoukatou, M.; Maréchal, J. P.; Hellio, C.; Novaković, I.; Tufegdžić, S.; Sladić, D.; Gašić, M. J.; Clare, A. S.; Vagias, C.; Roussis, V. Evaluation of the activity of the sponge metabolites avarol and avarone and their synthetic derivatives against fouling micro- and macroorganisms. *Molecules* **12**, 1022–1034 (2007).
  127. Fusetani, N. *Drugs from sea*. Karger, Bazel, Švajcarska (2000).

128. De Rosa, S.; De Caro, S.; Iodice, C.; Tommonaro, G.; Stefanov, K.; Popov, S. Development in primary cell culture of demosponges. *J. Biotechnol.* **100**, 119–25 (2003).
129. Müller, W. E. G.; Böhm, M.; Batel, R.; De Rosa, S.; Tommonaro, G.; Müller, I. M.; Schröder, H. C. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: Synthesis of avarol by primorphs from *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1077–1081 (2000).
130. Baell, J. B. Feeling nature's PAINS: Natural products, natural product drugs, and pan assay interference compounds (PAINS). *J. Nat. Prod.* **79**, 616–628 (2016).
131. McGregor, D. Hydroquinone: An evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. *Crit. Rev. Toxicol.* **37**, 887–914 (2007).
132. Enguita, F. J.; Leitão, A. L. Hydroquinone: Environmental pollution, toxicity, and microbial answers. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 1–14 (2013).
133. Lewars, E. G. *Computational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*. Springer, Hajdelberg, Nemačka (2011).
134. Gupta, S. *Viral proteases and their inhibitors*. Academic Press, Kembridž, Sjedinjene Američke Države (2017).
135. Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and applications*. Pearson Education Limited, Harlov, Ujedinjeno Kraljevstvo (2001).
136. Jensen, F. *Introduction to computational chemistry*. Wiley, Čičester, Ujedinjeno Kraljevstvo (2006).
137. Cramer, C. *Essentials of computational chemistry: Theories and models*. Wiley, Čičester, Ujedinjeno Kraljevstvo (2004).
138. Chakraborty, T.; Ranjan, P.; Pandey, A. *Computational chemistry methodology in structural biology and materials sciences*. Apple Academic Press, Oukvil, Kanada (2018).
139. Young, D. C. *Computational Chemistry: a practical guide for applying techniques to real-world problems*. Wiley, Njujork, Sjedinjene Američke Države (2001).
140. Onishi, T. *Quantum computational chemistry*. Springer, Singapur, Singapur (2018).

141. Zhou, A. A mathematical aspect of Hohenberg-Kohn theorem. *Sci. China Math.* **62**, 63–68 (2019).
142. Sahni, V. *Quantal Density Functional Theory*. Springer, Hajdelberg, Nemačka (2004).
143. Capelle, K. A bird's-eye view of density-functional theory. *Braz. J. Phys.* **36**, 1318–1343 (2006).
144. Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. General performance of density functionals. *J. Phys. Chem. A* **111**, 10439–10452 (2007).
145. Marques, M. A. L.; Ullrich, C. A.; Nogueira, F.; Rubio, A.; Burke, K.; Gross, E. K. U. *Time-dependent density functional theory*. Springer, Hajdelberg, Nemačka (2006).
146. Peintinger, M. F.; Oliveira, D. V.; Bredow, T. Consistent Gaussian basis sets of triple-zeta valence with polarization quality for solid-state calculations. *J. Comput. Chem.* **34**, 451–459 (2013).
147. Petković, M. *Primenjena kvantna hemija*. Univerzitet u Beogradu - Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, Srbija (2013).
148. Huzinaga, S. *Gaussian basis sets for molecular computations*. Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo (1984).
149. Dyllal, K. G. Relativistic double-zeta, triple-zeta, and quadruple-zeta basis sets for the 4s, 5s, 6s, and 7s elements. *J. Phys. Chem. A* **113**, 12638–12644 (2009).
150. Camiletti, G. G.; Machado, S. F.; Jorge, F. E. Gaussian basis set of double zeta quality for atoms K through Kr: Application in DFT calculations of molecular properties. *J. Comput. Chem.* **29**, 2434–2444 (2008).
151. Boereboom, J. M.; Fleurat-Lessard, P.; Bulo, R. E. Explicit solvation matters: Performance of QM/MM solvation models in nucleophilic addition. *J. Chem. Theory Comput.* **14**, 1841–1852 (2018).
152. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3093 (2005).
153. Mennucci, B. Continuum solvation models: What else can we learn from them? *J. Phys. Chem. Lett.* **1**, 1666–1674 (2010).
154. Gupta, M.; Da Silva, E. F.; Svendsen, H. F. Explicit solvation shell model and continuum solvation models for solvation energy and pK<sub>a</sub> determination of amino

- acids. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 5021–5037 (2013).
155. Pauling, L. *The nature of the chemical bond*. The Cornell University Press, Njujork, Sjedinjene Američke Države (1939).
  156. Oliveira, B.; De Cássia Maritan Ugulino De Araujo, R.; De Carvalho, A. B.; Ramos, M. N. QTAIM densities and Ab initio basis sets: A chemometrical analysis of the intermolecular electronic densities of the hydrogen-bonded complexes  $C_2H_4O \cdots HX$  ( $X = F, CN, NC,$  and  $CCH$ ). *Acta Chim. Slov.* **56**, 704–711 (2009).
  157. Tognetti, V.; Joubert, L. Density functional theory and Bader's atoms-in-molecules theory: towards a vivid dialogue. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 14539–14550 (2014).
  158. Kümmel, S.; Kronik, L. Orbital-dependent density functionals: Theory and applications. *Rev. Mod. Phys.* **80**, 3–60 (2008).
  159. Silva Lopez, C.; De Lera, A. R. Bond ellipticity as a measure of electron delocalization in structure and reactivity. *Curr. Org. Chem.* **15**, 3576–3593 (2011).
  160. Rodríguez, J. I. An efficient method for computing the QTAIM topology of a scalar field: The electron density case. *J. Comput. Chem.* **34**, 681–686 (2013).
  161. Bader, R. F. W. *Atoms in molecules: a quantum theory*. Clarendon Press, Oksford, Ujedinjeno Kraljevstvo (1994).
  162. Bader, R. F. W.; Matta, C. F. Atomic charges are measurable quantum expectation values: A rebuttal of criticisms of QTAIM charges. *J. Phys. Chem. A* **108**, 8385–8394 (2004).
  163. Matta, C. F.; Boyd, R. J. *The quantum theory of atoms in molecules*. Wiley, Vajnhajm, Nemačka (2007).
  164. Murugesan, R. Theoretical study of stability, molecular structure and intramolecular hydrogen bonding of an energetic molecule 1-phenyl-2-nitroguanidine: A QTAIM approach. *Int. J. Chem. Sci.* **14**, 67–87 (2016).
  165. Gora, R. W.; Grabowski, S. J.; Leszczynski, J. Dimers of formic acid, acetic acid, formamide and pyrrole-2-carboxylic acid: An Ab initio study. *J. Phys. Chem. A* **109**, 6397–6405 (2005).
  166. Silva López, C.; Nieto Faza, O.; Cossío, F. P.; York, D. M.; De Lera, A. R.

- Ellipticity: A convenient tool to characterize electrocyclic reactions. *Chem. - A Eur. J.* **11**, 1734–1738 (2005).
167. Silva Lopez, C.; De Lera, A. R. Bond ellipticity as a measure of electron delocalization in structure and reactivity. *Curr. Org. Chem.* **15**, 3576–3593 (2011).
168. Silva López, C.; Nieto Faza, O.; Cossío, F. P.; York, D. M.; De Lera, A. R. Ellipticity: A convenient tool to characterize electrocyclic reactions. *Chem. - A Eur. J.* **11**, 1734–1738 (2005).
169. Baranov, A. I.; Kohout, M. Electron localization and delocalization indices for solids. *J. Comput. Chem.* **32**, 2064–2076 (2011).
170. Bader, R. F. W.; Larouche, A.; Gatti, C.; Carroll, M. T.; MacDougall, P. J.; Wiberg, K. B. Properties of atoms in molecules: Dipole moments and transferability of properties. *J. Chem. Phys.* **87**, 1142 (1987).
171. Muñoz-Rugeles, L.; Galano, A.; Alvarez-Idaboy, R. J. Non-covalent  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions turn off non-adiabatic effects in proton-coupled electron transfer reactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 6969–6972 (2017).
172. Muñoz-Rugeles, L.; Galano, A.; Alvarez-Idaboy, R. J. The role of acid-base equilibria in formal hydrogen transfer reactions: Tryptophan radical repair by uric acid as a paradigmatic case. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 15296–15309 (2017).
173. Muñoz-Rugeles, L.; Alvarez-Idaboy, R. J. A proton-electron sequential transfer mechanism: theoretical evidence about its biological relevance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 28525–28528 (2015).
174. Litwinienko, G.; Ingold, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 3. novel kinetics in sequential proton loss electron transfer chemistry. *J. Org. Chem.* **70**, 8982–8990 (2005).
175. Mayer, J. M.; Hrovat, D. A.; Thomas, J. L.; Borden, W. T. Proton-coupled electron transfer versus hydrogen atom transfer in benzyl/toluene, methoxyl/methanol, and phenoxy/phenol self-exchange reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11142–11147 (2002).
176. Skone, J. H.; Soudackov, A. V.; Hammes-Schiffer, S. Calculation of vibronic couplings for phenoxy/phenol and benzyl/toluene self-exchange reactions: Implications for proton-coupled electron transfer mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.*



- 128**, 16655–16663 (2006).
177. Tishchenko, O.; Truhlar, D. G.; Ceulemans, A.; Nguyen, M. T. A unified perspective on the hydrogen atom transfer and proton-coupled electron transfer mechanisms in terms of topographic features of the ground and excited potential energy surfaces as exemplified by the reaction between phenol and radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7000–7010 (2008).
178. Warren, J. J.; Tronic, T. A.; Mayer, J. M. Thermochemistry of proton-coupled electron transfer reagents and its implications. *Chem. Rev.* **110**, 6961–7001 (2010).
179. Sirjoosingh, A.; Hammes-Schiffer, S. Proton-coupled electron transfer versus hydrogen atom transfer: Generation of charge-localized diabatic states. *J. Phys. Chem. A* **115**, 2367–2377 (2011).
180. 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).
181. Luzhkov, V. B. Mechanisms of antioxidant activity: The DFT study of hydrogen abstraction from phenol and toluene by the hydroperoxyl radical. *Chem. Phys.* **314**, 211–217 (2005).
182. Iuga, C.; Alvarez-Idaboy, R. J.; 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).
183. 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).
184. Aliaga, C.; Almodovar, I.; Rezende, M. C. A single theoretical descriptor for the bond-dissociation energy of substituted phenols. *J. Mol. Model.* **21**, (2015).
185. Weil, J. A.; Bolton, J. R. *Electron paramagnetic resonance: Elementary theory and practical applications*. Wiley, Hoboken, Sjedinjene Američke Države (2007).
186. Jackson, D. S.; Hargreaves, J. S. J. *Metal oxide catalysis*. Wiley, Vajnhajm,

- Nemačka (2009).
187. Gondran, M.; Gondran, A. Measurement in the de Broglie-Bohm interpretation: Double-slit, Stern-Gerlach and EPR-B. *Phys. Res. Int.* **2014**, i605908 (2014).
  188. Zavoisky, E. Spin-magnetic resonance in paramagnetics. *Fiz. Zhurnal* **9**, 211–245 (1945).
  189. Kochelaev, B. I.; Yablokov, Y. V. *The beginning of paramagnetic resonance*. World Scientific, Singapur, Singapur (1995).
  190. Junk, M. J. N. *Assessing the functional structure of molecular transporters by EPR spectroscopy*. Springer, Hajdelberg, Nemačka (2012).
  191. Hagen, W. R. *Biomolecular EPR spectroscopy*. CRC Press, Boka Raton, Sjedinjene Američke Države (2009).
  192. Mangion, I.; Liu, Y.; Reibarkh, M.; Williamson, R. T.; Welch, C. J. Using electron paramagnetic resonance spectroscopy to facilitate problem solving in pharmaceutical research and development. *J. Org. Chem.* **81**, 6937–6944 (2016).
  193. Brustolon, M.; Giamello, E. *Electron Paramagnetic Resonance*. Wiley, Hoboken, Sjedinjene Američke Države (2009).
  194. Macomber, R. *A complete introduction to NMR spectroscopy*. Willey, Hoboken, Sjedinjene Američke Države (1998).
  195. Ahmad, R.; Kuppusamy, P. Theory, instrumentation, and applications of EPR oximetry. *Chem Rev.* **110**, 3212–3236 (2011).
  196. Thompson, J.; Rink, J. *Encyclopedia of scientific dating methods*. Springer, Dordrecht, Holandija (2014).
  197. Parish, R. V. *NMR, NQR, EPR, and Mössbauer spectroscopy in inorganic chemistry*. Ellis Horwood, Čičester, Ujedinjeno Kraljevstvo (1990).
  198. Hilal, N.; Ismail, A. F.; Matsuura, T.; Oatley-Radcliffe, D. *Membrane characterization*. Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo (2017).
  199. Bunce, N. J. Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals. *J. Chem. Educ.* **64**, 907–914 (1987).
  200. Vij, D. R. *Handbook of applied solid state spectroscopy*. Springer, Njujork, Sjedinjene Američke Države (2006).
  201. Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Barr, D. P.; Weber, R. T. *Quantitative EPR*. Springer, Beč, Austrija (2010).

202. Gast, P.; Groenen, E. J. J. EPR interactions - g-anisotropy. *eMagRes* **5**, 1435–1444 (2016).
203. Roessler, M. M.; Salvadori, E. Principles and applications of EPR spectroscopy in the chemical sciences. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 2534–2553 (2018).
204. Popović-Bijelić, A.; Mojović, M. *Praktikum iz biofizičke hemije*. Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija (2017).
205. Eaton, S. S.; Eaton, G. R.; Berliner, L. J. *Biomedical EPR, part A: free radicals, metals, medicine, and physiology*. Kluwer Academic, Njujork, Sjedinjene Američke Države (2005).
206. Eaton, S. S.; Eaton, G. R. The future of EPR. *Bull. Magn. Reson.* **16**, 149–192 (1992).
207. Gerson, F.; Huber, W. *Electron Spin resonance spectroscopy of organic radicals*. Wiley, Vajnhajm, Nemačka (2003).
208. Jingchuan, D.; Kuixiang, W.; Weiqing, X. A simplified apparatus for EPR imaging. *Imaging* **7**, 904–907 (1996).
209. Hoff, A. J. *Advanced EPR: Applications in biology and biochemistry*. Elsevier, Amsterdam, Holandija (1989).
210. Berliner, L. J.; Bender, C. J. *EPR: Instrumental methods*. Springer, Njujork, Sjedinjene Američke Države (2004).
211. Rosen, G. M.; Finkelstein, E. Use of spin traps in biological systems. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* **1**, 345–375 (1985).
212. Buettner, G. R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic. Biol. Med.* **3**, 259–303 (1987).
213. Mojović, M.; Spasojević, I.; Vuletić, M.; Vučinić, Ž.; Bačić, G. An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes. *J. Serb. Chem. Soc.* **70**, 177–186 (2005).
214. Villamena, F. A. *Reactive species detection in biology: From fluorescence to electron paramagnetic resonance spectroscopy*. Elsevier, Amsterdam, Holandija (2017).
215. Cutler, R. G.; Rodriguez, H. *Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in basic science, diagnostics*. World Scientific, Singapur, Singapur (2002).

216. Savić, A. G.; Mojović, M. Free radicals identification from the complex EPR signals by applying higher order statistics. *Anal. Chem.* **84**, 3398–3402 (2012).
217. Jackson, S. K.; Liu, K. J.; Liu, M.; Timmins, G. S. Detection and removal of contaminating hydroxylamines from the spin trap DEPMPO, and re-evaluation of its use to indicate nitron radical cation formation and S(N)1 reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 228–232 (2002).
218. Janzen, E. G.; Jandrisits, L. T.; Shetty, R. V.; Larry Haire, D.; Hilborn, J. W. Synthesis and purification of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide for biological applications. *Chem. Biol. Interact.* **70**, 167–172 (1989).
219. Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics* **9**, E12 (2017).
220. Rideau, E.; Dimova, R.; Schwille, P.; Wurm, F. R.; Landfester, K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 8572–8610 (2018).
221. Lamichhane, N.; Udayakumar, T. S.; D’Souza, W. D.; Simone, C. B.; Raghavan, S. R.; Polf, J.; Mahmood, J. Liposomes: Clinical applications and potential for image-guided drug delivery. *Molecules* **23**, E288 (2018).
222. Uhumwangho, U. M.; Okor, R. S. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: A review. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* **4**, 9–21 (2005).
223. Rudokas, M.; Najlah, M.; Alhnan, M. A.; Elhissi, A. Liposome delivery systems for inhalation: A critical review highlighting formulation issues and anticancer applications. *Med. Princ. Pract.* **25**, 60–72 (2016).
224. Sharma, S.; Sharma, N.; Kumar, S.; Gupta, G. D. Liposomes: A review. *J. Pharm. Res.* **2**, 1163–1167 (2009).
225. Ahn, H.; Park, J. H. Liposomal delivery systems for intestinal lymphatic drug transport. *Biomater. Res.* **20**, 16–21 (2016).
226. Jesorka, A.; Orwar, O. Liposomes: Technologies and analytical applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 801–832 (2008).
227. Weissig, V. *Liposomes methods and protocols volume 1: Pharmaceutical nanocarriers*. Humana Press, Njujork, Sjedinjene Američke Države (2010).
228. Akbarzadeh, A.; Rezaei-sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.;

- Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome : classification , preparation , and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, (2013).
229. Pinheiro, M.; Lucio, M.; Lima, J. L.; Reis, S. Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB. *Nanomedicine* **6**, 1413–1428 (2011).
230. Decker, C.; Steiniger, F.; Fahr, A. Transfer of a lipophilic drug (temoporfin) between small unilamellar liposomes and human plasma proteins: Influence of membrane composition on vesicle integrity and release characteristics. *J. Liposome Res.* **23**, 154–165 (2013).
231. Flaten, G. E.; Chang, T. T.; Phillips, W. T.; Brandl, M.; Bao, A.; Goins, B. Liposomal formulations of poorly soluble camptothecin: Drug retention and biodistribution. *J. Liposome Res.* **23**, 70–81 (2013).
232. Chemin, C.; Péan, J. M.; Pape, A. Le, Delbos, J. M.; German-Fattal, M.; Wüthrich, P.; Couvreur, P. Biodistribution and anticancer activity of a new vinca alkaloid encapsulated into long-circulating liposomes. *J. Liposome Res.* **20**, 62–72 (2010).
233. Whitaker, R. D.; Ingebrigtsen, S. G.; Naderkhani, E.; Skar, M. L.; Flaten, G. E. Investigation of parameters influencing incorporation, retention and cellular cytotoxicity in liposomal formulations of poorly soluble camptothecin. *J. Liposome Res.* **23**, 298–310 (2013).
234. Zhigaltsev, I. V.; Tam, Y. K.; Leung, A. K.; Cullis, P. R. Production of limit size nanoliposomal systems with potential utility as ultra-small drug delivery agents. *J. Liposome Res.* **26**, 96–102 (2016).
235. Hua, S. Synthesis and in vitro characterization of oxytocin receptor targeted PEGylated immunoliposomes for drug delivery to the uterus. *J. Liposome Res.* doi: 10.1080/08982104.2018.1556293 (2019).
236. Abu Lila, A. S.; Ishida, T. Liposomal delivery systems: Design optimization and current applications. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, (2017).
237. Sur, S.; Fries, A. C.; Kinzler, K. W.; Zhou, S.; Vogelstein, B. Remote loading of preencapsulated drugs into stealth liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2283–2288 (2014).
238. Grumezescu, A. *Design of nanostructures for theranostics applications*. Elsevier, Oksford, Ujedinjeno Kraljevstvo (2018).

239. Shashi, K.; Satinder, K.; Bharat, P. A complete review on: Liposomes. *Int. Res. J. Pharm.* **3**, 10–16 (2012).
240. Van Etten, E. W. M.; Ten Kate, M. T.; Snijders, S. V.; Bakker-Woudenberg, I. A. J. M. Administration of liposomal agents and the phagocytic function of the mononuclear phagocyte system. *Int. J. Pharm.* **162**, 5–10 (1998).
241. Nisini, R.; Poerio, N.; Mariotti, S.; De Santis, F.; Fraziano, M. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. *Front. Immunol.* **9**, A155 (2018).
242. Frézard, F. Liposomes: From biophysics to the design of peptide vaccines. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 181–189 (1999).
243. Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 36–48 (2013).
244. Ozkan, S. A.; Kauffmann, J.-M.; Zuman, P. *Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences*. Springer, Hajdelberg, Nemačka (2015).
245. Espinoza, E. M.; Clark, J. A.; Soliman, J.; Derr, J. B.; Morales, M.; Vullev, V. I. Practical aspects of cyclic voltammetry: How to estimate reduction potentials when irreversibility prevails. *J. Electrochem. Soc.* **166**, H3175–H3187 (2019).
246. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, J. F.; Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Brooks/Cole, Belmont, Sjedinjene Američke Države (2013).
247. Compton, R. G.; Banks, C. E. *Understanding voltammetry*. World Scientific, London, Ujedinjeno Kraljevstvo (2018).
248. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*. Wiley, Hoboken, Sjedinjene Američke Države (2006).
249. Rieger, P. H. *Electrochemistry*. Chapman & Hall, Njujork, Sjedinjene Američke Države (1993).
250. Pletcher, D.; Greff, R.; Peat, R.; Peter, L. M.; Robinson, J. *Instrumental methods in electrochemistry*. Woodhead Publishing, Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo (2010).
251. Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.* **95**, 197–206 (2018).

252. Harvey, D. T. *Modern analytical chemistry*. McGraw-Hill, Njujork, Sjedinjene Američke Države (2000).
253. Milosavljević, S. M. *Strukturne instrumentalne metode*. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija (2004).
254. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. *Introduction to spectroscopy*. Brooks/Cole, Ontario, Kanada (2000).
255. Leder, P. J.; Porcu, O. M. The importance of UV-Vis spectroscopy: Application in food products characterization. *Sch. J. Food Nutr.* **1**, 59–62 (2018).
256. Minenkov, Y.; Singstad, Å.; Occhipinti, G.; Jensen, V. R. The accuracy of DFT-optimized geometries of functional transition metal compounds: A validation study of catalysts for olefin metathesis and other reactions in the homogeneous phase. *Dalton Trans.* **41**, 5526–5541 (2012).
257. Yadav, A.; Mishra, P. C. Dimers and trimers of polycyclic aromatic hydrocarbons as models of graphene bilayers and trilayers: Enhanced electron density at the edges. *Mol. Phys.* **112**, 88–96 (2014).
258. Trujillo, C.; Sánchez-Sanz, G.; Karpavičiene, I.; Jahn, U.; Čikotiene, I.; Rulíšek, L. Divergent pathways and competitive mechanisms of metathesis reactions between 3-arylprop-2-ynyl esters and aldehydes: An experimental and theoretical study. *Chem. - A Eur. J.* **20**, 10360–10370 (2014).
259. Ren, H.; Yang, X.; Li, X.; Liu, Y.; Wei, X. The hydrogen abstraction reaction mechanism and rate constants from 200 K to 2000 K between sevoflurane and chlorine atom: A theoretical investigation. *Chem. Phys. Lett.* **605**, 28–34 (2014).
260. Rad, A. S.; Shadravan, A.; Soleymani, A. A.; Motaghedi, N. Lewis acid-base surface interaction of some boron compounds with N-doped graphene; First principles study. *Curr. Appl. Phys.* **15**, 1271–1277 (2015).
261. Hamzehloueian, M.; Sarrafi, Y.; Aghaei, Z. An experimental and theoretical study on the regioselective synthesis of a new class of spiropyrrolothiazoles with quinoxaline motifs via a 1,3-dipolar cycloaddition reaction. An evaluation of DFT methods. *RSC Adv.* **5**, 76368–76376 (2015).
262. Kolokoltsev, Y.; Sanders, D. P.; Basiuk, V. A. Population and QTAIM analysis of metalloporphyrin-fullerene supramolecular complexes. *J. Comput. Theor. Nanosci.* **12**, 674–681 (2015).

263. Hohenstein, E. G.; Chill, S. T.; Sherrill, C. D. Assessment of the performance of the M05-2X and M06-2X exchange-correlation functionals for noncovalent interactions in biomolecules. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 1996–2000 (2008).
264. Zhao, Y.; Truhlar, D. G. 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 functionals. *Theor. Chem. Acc.* **120**, 215–241 (2008).
265. Zhao, Y.; Truhlar, D. G. How well can new-generation density functionals describe the energetics of bond-dissociation reactions producing radicals? *J. Phys. Chem. A* **112**, 1095–1099 (2008).
266. Mennucci, B.; Tomasi, J.; Cammi, R.; Cheeseman, J. R.; Frisch, M. J.; Devlin, F. J.; Gabriel, S.; Stephens, P. J. Polarizable continuum model (PCM) calculations of solvent effects on optical rotations of chiral molecules. *J. Phys. Chem. A* **106**, 6102–6113 (2002).
267. Keith, T. A. AIMAll (verzija 15.09.27, Professional), (2014).
268. Benita, S. *Microencapsulation: Methods and industrial applications*. CRC Press, Boca Raton, Sjedinjene Američke Države (2005).
269. Nii, T.; Ishii, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *Int. J. Pharm.* **298**, 198–205 (2005).
270. Barenholz, Y. Relevancy of drug loading to liposomal formulation therapeutic efficacy. *J. Liposome Res.* **13**, 1–8 (2003).
271. Lapinski, M. M.; Castro-Forero, A.; Greiner, A. J.; Ofoli, R. Y.; Blanchard, G. J. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: Rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir* **23**, 11677–11683 (2007).
272. Alves, N. J.; Cusick, W.; Stefanick, J. F.; Ashley, J. D.; Handlogten, M. W.; Bilgicer, B. Functionalized liposome purification via liposome extruder purification (LEP). *Analyst* **138**, 4746–4751 (2013).
273. Kraft, J. C.; Freeling, J. P.; Wang, Z.; Ho, R. J. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J.*



- Pharm. Sci.* **103**, 29–52 (2014).
274. Hinna, A.; Steiniger, F.; Hupfeld, S.; Stein, P.; Kuntsche, J.; Brandl, M. Filter-extruded liposomes revisited: A study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters. *J. Liposome Res.* **26**, 11–20 (2016).
275. Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. Wiley, Njujork, Sjedinjene Američke Države (1976).
276. Sabu, T.; Raju, T.; Ajesh, Z.; Mishra, R. *Thermal and rheological measurement techniques for nanomaterials characterization*. Elsevier, Oksford, Ujedinjeno Kraljevstvo (2017).
277. Codd, S. L.; Seymour, J. D. *Magnetic resonance microscopy: Spatially resolved nmr techniques and applications*. Wiley, Vajnhajm, Nemačka (2008).
278. 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).
279. Da Silveira, M. G.; Golovina, E. A.; Hoekstra, F. A.; Rombouts, F. M.; Abee, T. Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5826–5832 (2003).
280. Pavićević, A.; Popović-Bijelić, A.; Mojović, M.; Šušnjar, S.; Bačić, G. Binding of doxyl stearic spin labels to human serum albumin: An EPR study. *J. Phys. Chem. B* **118**, 10898–10905 (2014).
281. Pejin, B.; Savić, A. G.; Petković, M.; Radotić, K.; Mojović, M. In vitro anti-hydroxyl radical activity of the fructooligosaccharides 1-kestose and nystose using spectroscopic and computational approaches. *Int. J. Food Sci. Technol.* **49**, 1500–1505 (2014).
282. Villamena, F. A.; Hadad, C. M.; Zweier, J. L. Kinetic study and theoretical analysis of hydroxyl radical trapping and spin adduct decay of alkoxy carbonyl and dialkoxyphosphoryl nitrones in aqueous media. *J. Phys. Chem. A* **107**, 4407–4414 (2003).
283. Frejaville, C.; Karoui, H.; Tuccio, B.; Le Moigne, F.; Culcasi, M.; Pietri, S.; Lauricella, R.; Tordo, P. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: A new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping

- of oxygen-centered radicals. *J. Med. Chem.* **38**, 258–265 (1995).
284. Hardy, M.; Rockenbauer, A.; Vasquez-Vivar, J.; Felix, C.; Lopez, M.; Srinivasan, S.; Avadhani, N.; Tordo, P.; Kalyanaraman, B. Detection, characterization, and decay kinetics of ROS and thiyl adducts of mito-DEPMPO spin trap. *Chem. Res. Tox.* **20**, 1053–1060 (2007).
285. 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).
286. 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).
287. Buettner, G. R. Ascorbate oxidation: UV absorbance of ascorbate and ESR spectroscopy of the ascorbyl radical as assays for iron. *Free Radic. Res.* **10**, 5–9 (1990).
288. Cordeiro, R. M. Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 438–444 (2014).
289. Itri, R.; Junqueira, H. C.; Mertins, O.; Baptista, M. S. Membrane changes under oxidative stress: The impact of oxidized lipids. *Biophys. Rev.* **6**, 47–61 (2014).
290. Yusupov, M.; Wende, K.; Kupsch, S.; Neyts, E. C.; Reuter, S.; Bogaerts, A. Effect of head group and lipid tail oxidation in the cell membrane revealed through integrated simulations and experiments. *Sci. Rep.* **7**, N5761 (2017).
291. Stansley, B.; Yamamoto, B. L-dopa and brain serotonin system dysfunction. *Toxics* **3**, 75–88 (2015).
292. Zorc, B.; Ljubić, M.; Antolić, S.; Filipović-Grčić, J.; Maysinger, D.; Alebić-Kolbah, T.; Jalšenjak, I. Macromolecular prodrugs. II. Esters of l-dopa and  $\alpha$ -methyl-dopa. *Int. J. Pharm.* **99**, 135–143 (1993).
293. Misu, Y.; Ueda, H.; Goshima, Y. Neurotransmitter-like Actions of L-DOPA. *Adv. Pharmacol.* **32**, 427–459 (1995).
294. Di Stefano, A.; Sozio, P.; Cerasa, L. S.; Iannitelli, A. L-Dopa prodrugs: An overview of trends for improving Parkinsons disease treatment. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 3482–3493 (2011).

295. Sourkes, T. L. Actions of levodopa and dopamine in the central nervous system. *J. Am. Med. Assoc.* **218**, 1909–1911 (1971).
296. Guin, P. S.; Das, S.; Mandal, P. C. Electrochemical reduction of quinones in different media: A review. *Int. J. Electrochem.* **2011**, 1–22 (2011).
297. Chen, S. M.; Peng, K. T. The electrochemical properties of dopamine, epinephrine, norepinephrine, and their electrocatalytic reactions on cobalt(II) hexacyanoferrate films. *J. Electroanal. Chem.* **547**, 179–189 (2003).
298. Güell, A. G.; Meadows, K. E.; Unwin, P. R.; MacPherson, J. V. Trace voltammetric detection of serotonin at carbon electrodes: Comparison of glassy carbon, boron doped diamond and carbon nanotube network electrodes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 10108–10114 (2010).
299. 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).
300. Zhang, L.; Teshima, N.; Hasebe, T.; Kurihara, M.; Kawashima, T. Flow-injection determination of trace amounts of dopamine by chemiluminescence detection. *Talanta* **50**, 677–683 (1999).
301. 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).
302. Gašić, M. J.; Sladić, D. The avarol-avarone redox behaviour in acetonitrile. *Croat. Chem. Acta* **58**, 531–536 (1985).
303. Zlatović, M.; Sladić, D.; Gašić, M. J. The kinetics of the reduction of the lipophilic quinone avarone by n-alkyl-1,4-dihydronicotinamides of various lipophilicities. *J. Serb. Chem. Soc.* **64**, 647–654 (1999).
304. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega,

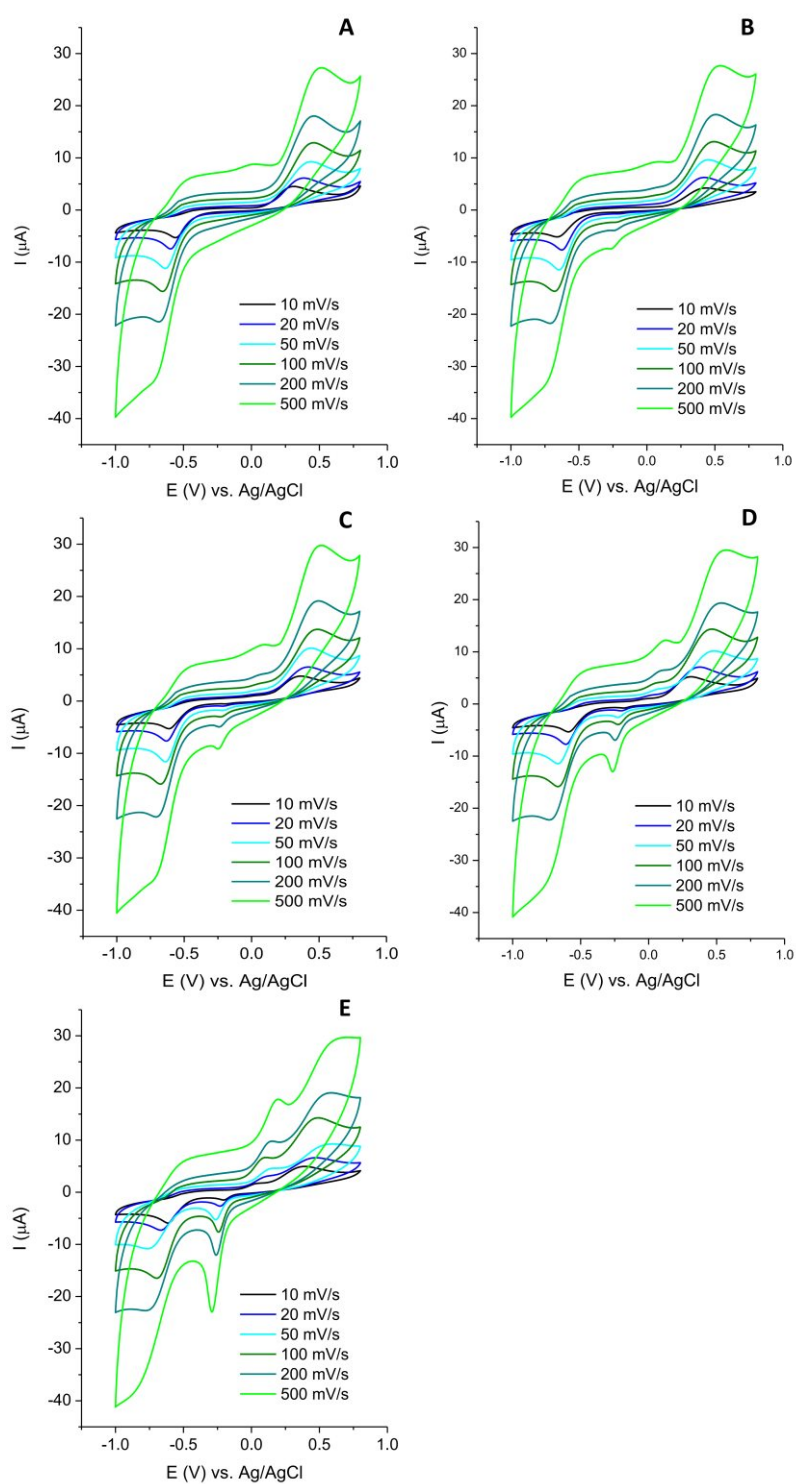
- N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A. J.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian 09 Revision D.01. (2009).
305. McLean, A. D.; Chandler, G. S. Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms,  $Z=11-18$ . *J. Chem. Phys.* **72**, 5639–5648 (1980).
306. Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *J. Chem. Phys.* **72**, 650–654 (1980).
307. Clark, T.; Chandrasekhar, J.; Spitznagel, G. W.; Von Rague Schleyer, P. Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21 + G basis set for first-row elements, Li-F. *J. Comput. Chem.* **4**, 294–301 (1983).
308. Frisch, M. J.; Pople, J. A.; Binkley, J. S. Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.* **80**, 3265–3269 (1984).
309. Johnson, E. R.; Keinan, S.; Mori-Sánchez, P.; Contreras-García, J.; Cohen, A. J.; Yang, W. Revealing noncovalent interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6498–6506 (2010).
310. Nakarada, Đ.; Petković, M. Mechanistic insights on how hydroquinone disarms OH and OOH radicals. *Int. J. Quantum Chem.* **118**, e25496 (2018).
311. Petković, M.; Nakarada, D.; Etinski, M. When hydroquinone meets methoxy radical: Hydrogen abstraction reaction from the viewpoint of interacting quantum atoms. *J. Comput. Chem.* **39**, 1868–1877 (2018).
312. Petković, M.; Kühn, O. Multidimensional hydrogen bond dynamics in salicylaldimine: Coherent nuclear wave packet motion versus intramolecular vibrational energy redistribution. *J. Phys. Chem. A* **107**, 8458–8466 (2003).

313. Petković, M.; Kühn, O. Ultrafast wave packet dynamics of an intramolecular hydrogen transfer system: From vibrational motion to reaction control. *Chem. Phys.* **304**, 91–102 (2004).
314. Giese, K.; Petković, M.; Naundorf, H.; Kühn, O. Multidimensional quantum dynamics and infrared spectroscopy of hydrogen bonds. *Phys. Rep.* **430**, 211–276 (2006).
315. Petković, M.; Novak, J.; Došlić, N. Shaping the infrared spectrum of the acetic acid dimer in the OH-stretching range: Multiple conformers and anharmonic coupling. *Chem. Phys. Lett.* **474**, 248–252 (2009).
316. Petković, M. O-H stretch in phenol and its hydrogen-bonded complexes: Band position and relaxation pathways. *J. Phys. Chem. A* **116**, 364–371 (2012).
317. Jovanović, V.; Miyazaki, Y.; Ebata, T.; Petković, M. Vibrational spectroscopy of picolinamide and water: From dimers to condensed phase. *J. Phys. Chem. A* **117**, 6474–6482 (2013).
318. Petković, M.; Etinski, M. Intramolecular OHO bonding in dibenzoylmethane: Symmetry and spectral manifestations. *RSC Adv.* **4**, 38517–38526 (2014).
319. Mitra, S.; Chandra, A. K.; Gashnga, P. M.; Jenkins, S.; Kirk, S. R. Exploring hydrogen bond in the excited state leading toward intramolecular proton transfer: Detailed analysis of the structure and charge density topology along the reaction path using QTAIM. *J. Mol. Model.* **18**, 4225–4237 (2012).
320. Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of Ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem. Phys.* **55**, 117–129 (1981).
321. Scalmani, G.; Frisch, M. J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.* **132**, A114110 (2010).
322. Nakarada, Đ.; Pejin, B.; Tommonaro, G.; Mojović, M. Liposomal integration method for assessing antioxidative activity of water insoluble compounds toward biologically relevant free radicals: example of avarol. *J. Liposome Res.* doi:10.1080/08982104.2019.1625378 (2019).
323. Berliner, L. J. *Spin labeling*. Academic Press, Njujork, Sjedinjene Američke Države (1976).
324. Belisario, M. A.; Maturo, M.; Pecce, R.; Derosa, S.; Villani, G. R. D. Effect of

- avarol and avarone on in vitro-induced microsomal lipid peroxidation. *Toxicology* **72**, 221–233 (1992).
325. Mojović, M.; Vuletić, M.; Bačić, G. G. Detection of oxygen-centered radicals using EPR spin-trap DEPMPO: The effect of oxygen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1048**, 471–475 (2005).
  326. Kawamori, A.; Yamauchi, J.; Ohta, H. *EPR in the 21st century: Basics, applications to materials, life and Earth sciences*. Elsevier, Amsterdam, Holandija (2002).
  327. Esplugues, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 1079–1095 (2002).
  328. Blaise, G. A.; Gauvin, D.; Gangal, M.; Authier, S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* **208**, 177–192 (2005).
  329. Roginsky, V. A.; Stegmann, H. B. Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities. *Free Radic. Biol. Med.* **17**, 93–103 (1994).
  330. Erdem, G.; Öner, C.; Önal, A. M.; Kisakürek, D.; Ögüs, A. Free radical mediated interaction of ascorbic acid and ascorbate/Cu(II) with viral and plasmid DNAs. *J. Biosci* **19**, 9–17 (1994).
  331. Nakarada, Đ.; Pejin, B.; Dimić, D.; Ivanović-Šašić, A.; Mojović, Z.; Mojović, M. Electrochemical and spectroscopic study of l-dopa interaction with avarol. *React. Kinet. Mech. Catal.* **127**, 219–229 (2019).
  332. Eslami, M.; Namazian, M.; Zare, H. R. Electrochemical behavior of 3,4-dihydroxyphenylalanine in aqueous solution. *Electrochim. Acta* **88**, 543–551 (2013).
  333. Liu, X.; Zhang, Z.; Cheng, G.; Dong, S. Spectroelectrochemical and voltammetric studies of L-DOPA. *Electroanalysis* **15**, 103–107 (2003).
  334. Cervellati, R.; Greco, E.; Blagojević, S. M.; Blagojević, S. N.; Anić, S.; Čupić, Ž. D. Experimental and mechanistic study of the inhibitory effects by phenolics on the oscillations of the Orbàn–Epstein reaction. *React. Kinet. Mech. Catal.* **123**, 125–139 (2018).
  335. Gattrell, M.; Kirk, D. W. A study of the oxidation of phenol at platinum and preoxidized platinum surfaces. *J. Electrochem. Soc.* **140**, 1534–1540 (1993).

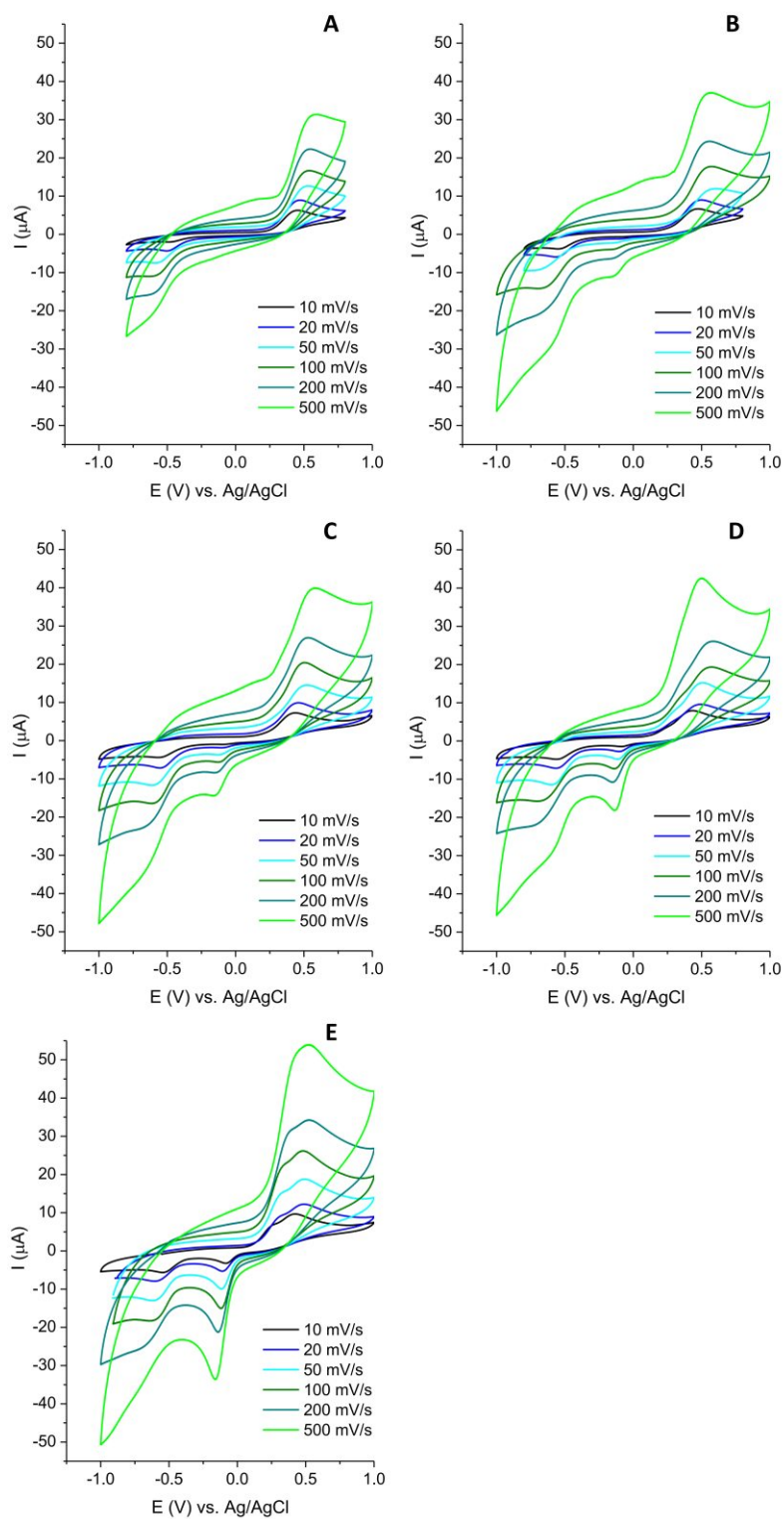
336. Kim, M.-H.; Smith, V. P.; Hong, T.-K. First- and second-order derivative polarography/voltammetry for reversible, quasi-reversible, and irreversible electrode processes. *J. Electrochem. Soc.* **140**, 712–721 (1993).
337. Nicholson, R. S.; Shain, I. Theory of stationary electrode polarography: Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal. Chem.* **36**, 706–723 (1964).
338. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*. Wiley, Njujork, Sjedinjene Američke Države (2001).
339. Brown, J. H. Analysis of two redox couples in a series: An expanded experiment to introduce undergraduate students to cyclic voltammetry and electrochemical simulations. *J. Chem. Educ.* **93**, 1326–1329 (2016).
340. Lente, G. *Deterministic kinetics in chemistry and systems biology*. Springer, London, Ujedinjeno Kraljevstvo (2015).
341. Ortiz, M. E.; Núñez-Vergara, L. J.; Squella, J. A. Voltammetric determination of the heterogeneous charge transfer rate constant for superoxide formation at a glassy carbon electrode in aprotic medium. *J. Electroanal. Chem.* **549**, 157–160 (2003).
342. Zhai, C.; Sun, F.; Zhang, P.; Ma, H.; Song, A.; Hao, J. Interactions of dopamine and dopamine hydrochloride with ethanol. *J. Mol. Liq.* **223**, 420–426 (2016).
343. Barreto, W. J.; Ponzoni, S.; Sassi, P. A Raman and UV-Vis study of catecholamines oxidized with Mn(III). *Spectrochim. Acta - Part A* **55**, 65–72 (1999).
344. Ósz, K. A new, model-free calculation method to determine the coordination modes and distribution of copper(II) among the metal binding sites of multihistidine peptides using circular dichroism spectroscopy. *J. Inorg. Biochem.* **102**, 2184–2195 (2008).
345. Wojdyr, M. Fityk: A general-purpose peak fitting program. *J. Appl. Crystallogr.* **43**, 1126–1128 (2010).
346. Rowan, T. *Functional stability analysis of numerical algorithms*. Doktorska disertacija. Univerzitet Teksasa, Ostin, Sjedinjene Američke Države (1990).

# Prilozi



**Prilog 1.** Zavisnost vrednosti struje pikova koji odgovaraju procesu oksidacije L-dope od brzine skeniranja bez avarola (A), odnosno kada je on u sistemu prisutan u koncentraciji od 0,05 mM (B), 0,1 mM (C), 0,2 mM (D) i 0,5 mM (E).





**Prilog 2.** Zavisnost vrednosti struje pikova koji odgovaraju procesu oksidacije L-dope od brzine skeniranja bez hidrohina (A), odnosno kada je on u sistemu prisutan u koncentraciji od 0,05 mM (B), 0,1 mM (C), 0,2 mM (D) i 0,5 mM (E).

## Biografija

Đura Nakarada je rođen 23.03.1987. godine u Pančevu. Osnovnu i srednju školu završio je u Pančevu. Diplomirao je 2012. godine na Hemijskom fakultetu, i odbranom diplomskog rada „*Ispitivanje elektrohemijskog ponašanja kompleksa bakra (II) sa tetradentatnim Šifovim bazama*“, stekao zvanje diplomirani hemičar. Master studije na Fakultetu za fizičku hemiju završio je 2013. godine odbranom master rada „*Hemijski sastav i anti-hidroksil radikalska aktivnost isparljivih komponenti slatkovodne briozoe Hyalinella punctata*“. Novembra 2013. je upisao doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju. Od 1.12.2016. zaposlen je kao istraživač-pripravnik na Fakultetu za fizičku hemiju na projektu III41005 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „*Biomarkeri u neurodegenerativnim i malignim procesima*“. Odlukom Nastavno-naučnog veća Fakulteta za fizičku hemiju 18.01.2018. izabran je u zvanje istraživač-saradnik.

Dobitnik je pohvalnice prestolonaslednika Aleksandra II Karađorđevića kao đak generacije (2006). Član je Kluba mladih hemičara pri Srpskom hemijskom društvu (2011) i Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalsku fiziologiju (2013).

Đura Nakarada je autor ili koautor 7 radova objavljenih u međunarodnim časopisima (1 kategorije M21, 5 kategorije M22 i 1 kategorije M23), od čega su 4 rada iz okvira doktorske disertacije (1 kategorije M21, 2 kategorije M22 i 1 kategorije M23), pri čemu je prvi autor na tri rada. Osim toga, autor je ili koautor i 16 saopštenja na naučnim skupovima.

## Naučni radovi u kojima su publikovani rezultati iz doktorske disertacije

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21):

**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>

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):

**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>

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*, **39**, 1868–1877 (2018).

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

Rad u međunarodnom časopisu (M23):

**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>

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ђура Накарада

број индекса 2013/0309

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Антирадикалска активност аварола: теоријски и експериментални приступ“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2019.





Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Ђура Накарада  
Број индекса 2013/0309  
Студијски програм Докторске академске студије – физичка хемија  
Наслов рада „Антирадикалска активност аварола: теоријски и експериментални приступ“  
Ментор др Милена Петковић, ванредни професор Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду  
др Борис Пејин, научни саветник, Институт за мултидисциплинарна истраживања – IMSI Универзитета у Београду, Одсек за науке о живим системима

Потписани/а Ђура Накарада

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2019.



Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Антирадикалска активност аварола: теоријски и експериментални приступ“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

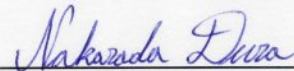
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 02.07.2019.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.