

НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Душана Димића, мастер физикохемичара

На XI редовној седници Наставно–научног већа Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду, одржаној 06.09.2018. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Душана Димића, мастер физикохемичара, под насловом:

„Експериментално и теоријско испитивање односа структура–антирадикалска активност одабраних неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита“

Израда докторске дисертације под наведеним насловом одобрена је на II редовној седници Наставно–научног већа, одржаној 09.11.2017. године (број одлуке: 1428). На основу те одлуке, Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је, на својој X седници одржаној 30.11.2017. године, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације.

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

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидата Душана Димића, мастер физикохемичара, је написана на 211 страна куцаног текста, у складу са Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду. Докторска дисертација садржи следећа поглавља: *Уводни део* (10 страна), *Неуротрансмитери, њихови прекурсори и метаболити* (8 страна), *Теорије развоја неуродегенеративних болести, утицај слободних радикала* (4 стране), *Значај неуротрансмитера у борби против оксидационог стреса – преглед литературе* (10 страна), *Циљ рада* (1 страна), *Експерименталне и теоријске методе* (30 страна), *Резултати и дискусија* (89 страна), *Закључак* (7 страна), *Литература* (308 литературних навода, 31 страна) и *Додатак* (14 страна). Кандидат је уз дисертацију приложио *Биографију* и листу радова проистеклих из тезе (3 стране). Дисертација садржи и прилоге прописане правилима Универзитета о подношењу докторске дисертације на одобравање (4 стране).

Дисертација садржи 61 слику (12 слика из постојеће литературе, 49 слика представљају оригиналне резултате кандидата) и 33 табеле (све табеле представљају оригиналне резултате кандидата).

У поглављу *Уводни део* дефинисани су термини потребни за разумевање проблематике која је обрађена у оквиру докторске тезе. У оквиру овог поглавља дефинисани су појмови као што су: слободни радикали, антиоксиданси, оксидациони стрес, реактивне врсте кисеоника (*Reactive Oxygen Species, ROS*), азота (*Reactive Nitrogen Species, RNS*), хлора (*Reactive Chlorine Species, RCS*) и сумпора (*Reactive Sulphur Species, RSS*), као и последице деловања слободних

радикала. У наставку су детаљно описане реакције формирања реактивних врста, посебно оних које су у оквиру тезе експериментално и теоријски испитане: хидрокси-радикала, супероксид радикал-анјона и аскорбил-радикала. У оквиру поглавља су описани и хлоровани метилперокси-радикали. У последњем потпоглављу приказана је подела антиоксиданаса.

У поглављу *Неуротрансмитери, њихови прекурсори и метаболити* приказане су основне карактеристике испитиваних молекула, L-3,4-дихидроксифенилаланина (*L-3,4-dihydroxyphenylalanine*, L-DOPA), допамина, норепинефрина, епинефрина, 3,4-дихидроксифенилсирћетне киселине (*3,4-dihydroxyphenyl acetic acid*, DOPAC), хомованилинске киселине (*homovanillic acid*, HVA), ванилилбадемове киселине (*vanillylmandelic acid*, VMA), 3-метокситирамина, тирамина, тирозина, фенилаланина, фенилетиламина, октопамина, 6-хидроксидопамина и катехола. Структурне формуле и биолошке функције су описани за свако од поменутих једињења.

У поглављу *Теорије развоја неуродегенеративних болести, утицај слободних радикала* је дат преглед литературе о значају слободних радикала за развој најчешћих неуродегенеративних обољења, Паркинсонове болести, Алцхајмерове болести, шизофреније и амиотрофичне латералне склерозе. Посебно су анализирани утицаји неуротрансмитера на процес развоја ових болести.

Поглавље *Значај неуротрансмитера у борби против оксидационог стреса – преглед литературе* је подељено у четири целине. У првом делу је приказан преглед експерименталних и теоријских метода које се користе за анализу структуре неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита. Посебно је продискутовано слагање експерименталних и теоријских података са аспекта конформационе анализе и интрамолекулских интеракција. Правилно описивање структуре, односно проналажење одговарајуће комбинације функционала и базисног скупа за оптимизацију структуре је био први корак у коришћењу квантно-механичких прорачуна у овој тези. Други део прегледа литературе се односи на анализу резултата експерименталних испитивања антирадикалске активности неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита, са посебним освртом на тестове, експерименталне методе и технике. Треће поглавље се односи на преглед теоријских метода за испитивање антирадикалске активности молекула одабраних у оквиру дисертације. Описане су методе које су базиране на неколико стандардних реакционих модела и израчунавање термодинамичких и кинетичких параметра реакција. Последње поглавље даје приказ литературе која се односи на интеракције молекула допамина и L-DOPA са говеђим серум албумином.

У поглављу *Циљ рада* дефинисана су четири основна циља тезе: 1) структурна карактеризација испитиваних молекула применом експерименталних спектроскопских метода и теоријских израчунавања, а за које у литератури не постоје оптимизоване структуре и поређење са експерименталним спектрима (3-метокситирамин, октопамин, 6-хидроксидопамин, VMA); 2а) одређивање односа структура–активност неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита према следећим радикалима: DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), ABTS радикал-катјон (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*), хидрокси-радикал, супероксид радикал-анјон и аскорбил-радикал; 2б) теоријско испитивање различитих антирадикалских механизма (са посебним освртом на разликовање механизма преноса атома водоника (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) и механизма спрегнутог преноса протона и електрона (*Proton Coupled Electron Transfer*, PCET) и процена највероватнијих механизма на основу вредности термодинамичких и кинетичких параметара реакција; 3) експериментално и теоријско испитивање интеракција одабраних молекула са говеђим серум албумином (*Bovine Serum Albumin*, BSA); 4а) синтеза, спектроскопско, кристалографско и теоријско испитивање структуре 3-(1-((3,4-дихидроксифенил)амино)етилиден)-хроман-2,4-диона, деривата кумарина и допамина; 4б) испитивање антитуморске активности новосинтетисаног једињења; 4в)

испитивање интеракција новосинтетисаног једињења са циклин–зависном киназом (*Cyclin-dependent kinases*, CDKs) методом молекулског докинга.

У поглављу **Експерименталне и теоријске методе** дат је списак коришћених хемикалија, описане су експерименталне методе, експериментални услови рада и инструменти који су коришћени. Објашњене су основе коришћених експерименталних метода: електронске спектроскопије, вибрационе (инфрацрвене и раманске) спектроскопије, електронске парамагнетске спектроскопије (ЕПР), нуклеарне магнетске резонантне спектроскопије (НМР), цикличне волтаметрије, спектрофлуориметрије и кристлографије X-зрака. У овом делу рада су такође ближе описане и коришћене рачунарске методе: методе молекулске механике, теорија функционала густине (*Density Functional Theory*, DFT), теорија природних везивних орбитала (*Natural Bond Orbital Theory*, NBO), теоријски механизми антирадикалске активности, израчунавање константе брзине на основу теорије прелазног стања, израчунавање константе брзине преноса електрона на основу Маркусове теорије, квантна теорија атома у молекулу (*Quantum Theory of Atoms in Molecules*, QТАИМ) и Фукуи функције.

Поглавље **Резултати и дискусија** је подељено, на основу постављених циљева рада, у четири дела. Први део представља резултате оптимизације структуре 3-метоксирамина, октопамина, 6-хидроксидопамина и VMA помоћу функционала B3LYP, CAM-B3LYP, B3LYP-D3, M05-2X и M06-2X са 6-311++G(d,p) базисним скупом и поређење добијених резултата са кристалографском структуром. Након одабира функционала који најбоље репродукује експерименталне дужине и углове веза детаљно су испитане интрамолекулске интеракције које доводе до стабилизације конформера. Теоријски вибрациони, ¹H и ¹³C НМР спектри, и електронски спектри су упоређени са експерименталним како би се додатно потврдила предложена теоријска геометрија. Други део представља резултате експерименталног одређивања активности одабраних једињења према поменутиим радикалима. Мерења су вршена на одређеном броју једињења за које у литератури не постоје резултати. Термодинамички најповољнији механизми су одређени за све радикале на основу вредности промене енталпија реакција. Код испитивања антирадикалске активности према DPPH радикалу је продискутована разлика између два реакциона механизма, преноса атома водоника и спрегнутог преноса протона и електрона. Реакције са хлорованим метилперокси-радикалима су само теоријски испитане како би се одредио утицај броја атома хлора на механизам реакције. Спектрофлуориметријски је анализирано везивање одабраних једињења за BSA. На основу резултата молекулског докинга одређене су интеракције које су одговорне за везивање испитиваних молекула за активно место BSA. Структура новосинтетисаног једињења, 3-(1-((3,4-дихидроксифенил)амино)етилиден)-хроман-2,4-диона, је дефинисана помоћу кристалографске анализе. Детаљно су описане интрамолекулске интеракције које доводе до стабилизације структуре новосинтетисаног једињења. Инфрацрвени и рамански спектар једињења су приказани и продискутовани, заједно са експерименталним и теоријским вредностима хемијских помераја у ¹H и ¹³C НМР спектрима.

У поглављу **Закључак** сумирани су сви закључци изведени на основу резултата приказаних у оквиру докторске тезе.

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

У поглављу **Додатак** су приказане додатне табеле и слике које иду у прилог осталим резултатима и дискусији, али су изостављени из основног текста због прегледности.

Б. Опис резултата дисертације

Резултати проистекли из истраживања у оквиру ове докторске тезе су подељени у четири дела: *Експериментално и теоријско испитивање структуре метаболита неуротрансмитера*; *Експериментално и теоријско одређивање антирадикалске активности неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита према одабраним радикалима*; *Спектрофлуориметријско испитивање везивања неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита за говеђи серум албумин* и *Спектроскопско и структурно испитивање 3-(1-((3,4-дихидроксифенил)амино)етилиден)-хроман-2,4-диона*.

Кристалографске структуре 3-метокситирамина, октопамина, 6-хидроксидопамина и VMA су одабране као полазне структуре за оптимизацију помоћу функционала B3LYP, CAM-B3LYP, B3LYP-D3, M05-2X и M06-2X са 6-311++G(d,p) базисним скупом. Коефицијент корелације и средња апсолутна грешка су параметри који су коришћени за поређење експерименталних и теоријских дужина и углова веза. На основу оваквог поређења одабрани су следећи функционали: B3LYP за 3-метокситирамин, B3LYP-D3 за октопамин, M06-2X за 6-хидроксидопамин и M05-2X за молекулу VMA. За сваки од метаболита оптимизоване су три стабилне структуре и продискутоване интеракције које додатно стабилизују конформере. Код 3-метокситирамина стабилизациона интеракција укључује катјон- π интеракцију која постоји код молекула опште формуле $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$. Конформер октопамина је стабилизован водоничном везом која се гради између хидроксилне и аминок групе алифатичног низа, тако да је доминантан издужени конформер. У најстабилнијој структури 6-хидроксидопамина постоји интрамолекулска водонична веза између аминок групе и додатне хидроксилне групе на ароматичном прстену. Резултати показују да је најзначајнија интеракција, која стабилизује конформер молекула VMA, водонична веза која се гради између кисеоника карбоксилне групе и хидроксилне групе алифатичног низа. Детаљна асигнација трака у вибрационим (инфрацрвеним и раманским) спектрима је урађена за 3-метокситирамин и молекулу VMA, са коефицијентима корелације између експерименталних и теоријских таласних бројева трака од преко 0,99. Додатне потврде применљивости одабраних функционала су добијене поређењем експерименталних и теоријских израчунатих вредности хемијских помераја у ^1H и ^{13}C NMR спектрима. У свим случајевима вредности коефицијента корелације су биле преко 0,99. Теоријски израчунати апсорпциони максимуми у електронским спектрима свих испитиваних једињења се налазе у области од 200-230 nm, што је блиско експерименталним вредностима. Уочена разлика од 30 до 40 nm у таласној дужини апсорпционог максимума основног електронског прелаза, који се налази на око 280 nm и који је приписан НОМО \rightarrow ЛУМО прелазу, се може објаснити специфичним интеракцијама поларних група са растварачем. Ове интеракције додатно стабилизују структуру и условљавају батохромно померање апсорпционог максимума који одговара овом прелазу.

Испитивање антирадикалске активности молекула према различитим радикалима је показало да су катехолна и карбоксилна групна важни структурни параметри реактивности. У случају DPPH радикала активност молекула L-DOPA, DOPAC-а, допамина, норепинефрина, епинефрина, катехола и 6-хидроксидопамина, са EC_{50} вредностима између $5,7$ и $13,4 \times 10^{-6}$ M, су биле упоредиве са активностима стандардних антиоксиданса, кверцетина и галне киселине. Активност тирозина, HVA, VMA и 3-метокситирамина је била вишеструко мања. Добијени резултат се може објаснити заменом једне хидроксилне групе, у катехолној структури, метоксилном групом или губитком хидроксилне групе, у случају тирозина код кога је примећен утицај карбоксилне групе на активност. Мала вредност EC_{50} параметра октопамина (300×10^{-6} M) указује да молекули са хидроксилном групом у *para*-положају и аминок групом на алифатичном низу немају значајну активност. Додатак хидроксилне групе на алифатичном низу

и присуство треће хидроксилне групе на ароматичном прстену такође не утичу на укупну активност молекула. На основу вредности термодинамичких параметара, израчунатих за структуре оптимизоване у води и метанолу, показано је да су два конкурентска механизма НАТ и губитак протона праћен преносом електрона (*Sequential Proton Loss Electron Transfer*, SPLET). Детаљном анализом структуре прелазног стања (у реакцији DPPH радикала, са молекулима L-DOPA, допамин, норепинефрин и епинефрин), промене спинске густине и наелектрисања на атомима од интереса закључено је да се пренос атома водоника у случају ових молекула не може једноставно окарактерисати као НАТ или PCET механизам, због присутних карактеристика оба механизма које, највероватније, могу бити последица стерних сметњи и стабилности самог DPPH радикала. Поређењем вредности константе брзине преноса електрона и преноса атома водоника закључено је да је SPLET доминантан механизам у реакцији неуротрансмитера са DPPH радикалом. Редослед реактивности испитиваних молекула према ABTS радикал-катјону је следећи: L-DOPA > DOPAC > норепинефрин > епинефрин > допамин > тирамин > тирозин > HVA > фенилетиламин > фенилаланин. Константовано је да су исти структурни параметри, одговорни за редослед реактивности молекула према DPPH радикалу, одговорни и за активност молекула према ABTS радикал-катјону. Такође је констатовано да се реакције испитиваних молекула и ABTS радикал-катјона одвијају према два механизма, НАТ и механизму преноса једног електрона и преноса протона (*Single Electron Transfer-Proton Transfer*, SET-PT). ЕПР спектроскопско испитивање активности молекула према хидрокси-радикалу је показало да резултати значајно зависе од експерименталних услова рада, посебно рН вредности раствора. На рН=3,3 молекули са катехолном структуром (L-DOPA, DOPAC, допамин, норепинефрин, епинефрин, катехол и 6-хидроксидопамин) комплексирају Fe(III) јоне и редукују их до Fe(II) јона при чему се значајно повећава концентрација хидрокси-радикала који настаје у Фентоновој реакцији. У реакцијама молекула са једном хидроксилном и једном метоксилном групом уочено је смањење (3-метокситирамин и HVA) или мало повећање (VMA) интензитета сигнала DEPMPO-OH' адукта (*(2-Methyl-3,4-dihydro-1-oxide-2H-pyrrol-2-yl)diethylphosphonate*, DEPMPO). Додатак октопамина такође смањује интензитет сигнала DEPMPO-OH' адукта. Овакав резултат указује на про-оксидационо деловање молекула са катехолном структуром, односно на слабу антирадикалску активност молекула без катехолне структуре. Резултати експеримената који су поновљени на рН=7,8 показали су да, на рН која је блиска физиолошкој вредности, сви испитивани молекули, доминантно испољавају антирадикалско дејство. Редослед активности је норепинефрин > епинефрин > допамин > DOPAC > L-DOPA > 3-метокситирамин > октопамин > 6-хидроксидопамин > VMA > HVA. Константовано је да при наведеним експерименталним условима карбоксилна група, због могућности депротоновања, није доминантан структурни параметар који условљава активност молекула. Теоријски прорачуни су показали да су НАТ и SPLET термодинамички повољни механизми. На основу ЕПР мерења активности према аскорбил-радикалу одабрани молекули се могу поделити у две групе. Прву чине норепинефрин и DOPAC са процентима редукције радикала од 35%, док другу чине октопамин, VMA и HVA. Термодинамички параметри показују да је реакција допамина, норепинефрина, DOPAC-а и L-DOPA, у води и пентилетаноату који симулира липидну средину, са аскорбил-радикалом спонтана и да се одвијају према НАТ механизму. Ово представља значајан резултат из разлога што је познато да аскорбил-радикал настаје у реакцији аскорбинске киселине са слободним радикалима и није очекивано да може даље да редукује биолошки важне молекуле. Реактивност молекула према супероксид радикал-анјону испитана је применом цикличне волтаметрије. Експерименти су рађени у DMSO као растварачу тако да није било очекивано значајно депротоновање испитиваних молекула. Реактивност молекула према супероксид радикал-анјону опада у следећем низу DOPAC > 6-хидроксидопамин > допамин > норепинефрин > HVA

> 3-метокситирамин > октопамин > тирамин. На основу добијеног низа реактивности закључено је да је катехолна група важан структурни параметар који доприноси стабилизацији насталог радикала неуротрансмitera. Теоријски прорачуни термодинамичке повољности механизма реакције између неуротрансмitera и хлорованих метилперокси-радикала показују да се, са повећањем броја атома хлора, најповољнији механизам мења од SPLET до HAT механизма. Овакав резултат је објашњен на основу распореда спинске густине и наелектрисања на кисеониковом атому који није директно везан за метил групу.

Везивање неуротрансмitera и њихових метаболита за говеђи серум албумин је испитано спектрофлуориметријски. Како испитивани неуротрансмитери и њихови метаболити представљају молекуле који су природно присутни у организму то је њихова интеракција са BSA протеином била очекивана. Константовано је да додатак молекула неуротрансмitera, њихових прекурсора и метаболита доводи до смањења интензитета флуоресценције BSA што се може тумачити променом конформације протеина, односно изложеношћу флуоресцентно-активних места у протеину испитиваним молекулима, као и везивањем молекула за активна места протеина различитим типовима интеракција. Резултати су показали да додатак допамина, DOPAC-а, 3-метокситирамина, VMA, норепинефрина и октопамина доводи до смањења интензитета флуоресцентне емисије протеина за око 30%. Приближно исти проценат смањења интензитета флуоресцентне емисије протеина приликом везивања структурно различитих молекула наводи на закључак да број, врста и положај функционалних група не утиче значајно на овај процес. Како би се овај резултат потврдио методама молекулског докинга је додатно испитано везивање одабраних супстанци и BSA. Резултати молекулског докинга показују да су енергија везивања и предвиђене вредности константе инхибиције блиских вредности за све поменуте молекуле. Јаче везивање је добијено у случају посматрања интеракција молекула које су биле ограничене на активно место протеина, у околини триптофана 134 (TRP134). Константовано је да су најважније интеракције молекула водоничне везе које се граде преко поларних група као и π -алкил, π - π стекинг (π - π *stacking*) и π -водоник интеракције.

Дериват кумарина, 3-(1-((3,4-дихидроксифенил)амино)етилиден)-хроман-2,4-дион, је синтетисан под благим условима из 4-хидроксикумарина и допамина. Добијена је кристалографска структура која показује да је важан параметар стабилности молекула интрамолекулска водонична веза, тзв. резонанцом потпомогнута водонична веза (*resonance assisted hydrogen bond*), која доводи до формирања шесточланог прстена. Кристалографска структура је искоришћена и за одређивање функционала који добро описује структурне параметре, дужине и углове веза у молекулу. Од испитиваних функционала, (B3LYP, B3PQ91, B3LYP-D3, M05-2X и M06-2X) са 6-311++G(d,p) базисним скупом, најбоље слагање са експерименталним вредностима добијено је применом M06-2X функционала. Оптимизацијом структуре молекула у DMSO и предвиђањем хемијских помераја у ^1H и ^{13}C NMR спектрима додатно је показано да се овај ниво теорије може успешно користити за описивање структуре овог и сличних једињења. Антитуморска активност новосинтетисаног једињења је одређена према здравим кератиноцитима (HaCaT), ћелијама цервикалног тумора (SiHa), ћелијама тумора дојке (MCF7) и ћелијама хепатоцелуларног тумора (HepG2). Константовано је да број преживелих ћелија зависи од концентрације молекула и да се при вишим концентрацијама смањује. Резултати показују да је новосинтетисани дериват активнији према ћелијама тумора у односу на полазни 4-хидроксикумарин. При концентрацији молекула од 300 μM , и након 48 часова, проценат смањења броја ћелија тумора дојке (MCF7) је био 20%, у случају 4-хидроксикумарина, и 57% у случају синтетисаног једињења. Резултати молекулског докинга показују да између синтетисаног деривата и аминокиселина циклин-зависне киназе постоји више типова нековалентних интеракција. Због већег броја интеракција закључено је да дериват јаче интерагује са протеином од 4-хидроксикумарина.

В. Упоредна анализа резултата дисертације са подацима из литературе

Детаљна анализа и поређење експерименталних и теоријских спектроскопских података метаболита неуротрансмитера урађени су на основу оптимизације кристалографских структура 3-метокситирамина (*N. Okabe, S. Mori, Y. Sasaki, Acta Crystallogr. Sect. A1. 48 (1991) 1448–1450*), октопамина (*K. Paxton, T.A. Hamor, Acta. Cryst. B33 (1977) 2143–2146*), 6-хидроксидопамина (*M. Kolderup, A. Mostad, C. Romming, Acta Chem. Scand. 26 (1972) 483–493*) и молекула VMA (*N. Okabe, T. Suga, Y. Kohyama, Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun. 51 (1995) 1322–1324*). Резултати оптимизације структуре 3-метокситирамина показују да најстабилнији конформер карактеришу Ar-CH₂-CH₂-NH₃⁺ интеракције какве су у литератури показане и за допамин (*A. Lagutschenkov, J. Langer, G. Berden, J. Oomens, O. Dopfer, Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 2815–23*), 2-фениламин (*J.J. Urban, C.W. Cronin, R.R. Roberts, G.R. Famini, J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 12292–12299*) и хистимин (*P.I. Nagy, G.J. Durant, W.P. Hoss, D.A. Smith, T. J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 4898–4909*). Услед грађења водоничне везе између група алифатичног низа структура октопамина је издужена, што одговара и структурама стабилних конформера епинефрина и норепинефрина (*P. ÇarÇabal, L.C. Snoek, T. Van Mourik, Mol. Phys. 103 (2005) 1633–1639*; *L.C. Snoek, T. Van Mourik, J.P. Simons, Mol. Phys. 101 (2003) 1239–1248*). Сви прорачуни за симулацију НМР спектра су урађени коришћењем GIAO методе (*M. Samsonowicz, M. Kowczyk-Sadowy, E. Regulska, W. Lewandowski, Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 118 (2014) 1068–1074*; *S. Marković, J. Tošović, J.M. Dimitrić Marković, Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 164 (2016) 67–75*). Поређењем теоријски израчунатих и експериментално добијених хемијских помераја потврђено је да се ова метода може користити за симулацију НМР спектра неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита.

Антирадикалска активност неуротрансмитера, у првом реду допамина, норепинефрина, епинефрина и молекула L-DOPA је у литератури испитана према различитим радикалима. Епинефрин је показао значајну антирадикалску активност према већем броју стандардних радикала (*Gülçin*) (*İ. Gülçin, A. Chem. Biol. Interact. 179 (2009) 71–80*). Активност допамина, L-DOPA-е, норепинефрина и епинефрина је одређена, применом различитих метода, и према галваноксил-, кумилоксил- и кумилпероксил-радикалима. Резултати су показали да су реактивности ових молекула упоредиве са реактивностима стандардних антиоксиданаса (*T. Kawashima, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, J. Phys. Chem. B. 114 (2010) 675–680*; *K. Ohkubo, Y. Moro-oka, S. Fukuzumi, Org. Biomol. Chem. 4 (2006) 999–1001*). У раду Шимицуа (*Shimizu*) и сарадника, спектрофотометријски и ЕПР спектроскопијом, анализирани су реактивности поменутих молекула према DPPH радикалу (*T. Shimizu, Y. Nakanishi, M. Nakahara, N. Wada, Y. Moro-oka, J. Clin. Biochem. Nutr., 47(2010)181–190*). Активности истих молекула према супероксид радикал-анјону су испитане применом ЕПР спектроскопије. Релативни распоред активности према радикалима је био: допамин > L-DOPA > норепинефрин > епинефин. Резултати кандидата подржавају тезу о великој реактивности неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита према радикалским врстама. Студија Сарбуа (*Sârbu*) и Касонија (*Casoni*) даје резултате мерења активности већег броја биогених амина, у које спадају и молекули испитани у тези, према DPPH радикалу (*C. Sârbu, D. Casoni, Open Chem. 11 (2013) 679–688*). Резултати спектрофотометријског одређивања активности, EC₅₀ вредност и време реакције, из дисертације кандидата показују добро слагање са подацима из литературе. У тези су такође испитани и молекули за које у литератури не постоје резултати за активност према DPPH радикалу (HVA, VMA, 6-хидроксидопамин). Прооксидационо дејство молекула са катехолном структуром у системима Фентоновог типа је детаљно испитано у низу радова (*V.*

Melin, A. *Henríquez*, C. *Radojkovic*, B. *Schwederski*, W. *Kaim*, J. *Freer*, D. *Contreras*, *Inorganica Chim. Acta.* 453 (2016) 1–7; P. *Salgado*, V. *Melin*, Y. *Durán*, H. *Mansilla*, D. *Contreras*, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 3687–3693; P. *Salgado*, V. *Melin*, M. *Albornoz*, H. *Mansilla*, G. *Vidal*, D. *Contreras*, *Appl. Catal. B Environ.* 226 (2018) 93–102). Поменути ефекат се посебно испољава при рН вредностима мањим од физиолошке, услед могућности грађења монокомплекса. На физиолошкој рН вредности, и рН вредностима вишим од ње, се граде бидентатни и тридентатни комплекси при чему није примећена редукција Fe(III) у Fe(II) јоне као ни повећање приноса Фентонове реакције. Резултати у оквиру тезе потврђују да у зависности од рН вредности средине молекули са катехолном структуром показују прооксидационо односно антиоксидационо деловање. Молекули са једном метоксилном и једном хидроксилном групом граде мање стабилне комплексе са Fe(III) јонима тако да је прооксидациони ефекат мање изражен.

Теоријско испитивање механизма антирадикалске активности је у литератури дато само за допамин, норепинефрин и епинефрин (C. *Iuga*, J.R. *Alvarez-Idaboy*, A. *Vivier-Bunge*, *J. Phys. Chem. B.* 115 (2011) 12234–12246; R. *Álvarez-Diduk*, A. *Galano*, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 3479–3491). На основу вредности константе брзине реакције закључено је да је SPLET механизам доминантан у реакцијама са хидрокси- и перокси-радикалима, као и да су хидроксилне групе у *para*-положају доминантна реакциона места (A. *Galano*, *J. Mex. Chem. Soc.* 59 (2015) 231–262). Ови резултати су, у оквиру тезе, потврђени за сва испитивања једињења. Поређењем теоријских вредности константе брзине и реактивности према перокси-радикалу у води констатовано је да норепинефрин, епинефрин и допамин имају 24, 17,5 и 2,5 пута веће вредности константе брзине од тролокса, који се у испитивањима користи као стандардни антиоксиданс. У неполарној средини активност допамина је 240 пута већа од активности тролокса, док је активност за норепинефрин и епинефрин 49 и 38 пута већа, респективно. Детаљнија теоријска испитивања антирадикалске активности осталих молекула у литератури нису приказана.

Интеракције неуротрансмитера и њихових прекурсора са говеђим серум албумином су анализиране за допамин и молекула L-DOPA (Q. *Zhang*, Y. *Ni*, S. *Kokot*, *Talanta.* 88 (2012) 524–532; Q. *Zhang*, Y. *Ni*, S. *Kokot*, *Spectrosc. Lett.* 45 (2012) 85–92). Показано је да у уској области концентрација наведених молекула њихово везивање прати Штерн-Фолмеров (*Stern-Volmer*) механизам гашења флуоресценције, при чему у случају интеракције BSA-L-DOPA константа гашења опада са температуром док при интеракцији BSA-допамин она расте. Резултати су такође показали да је везивање молекула L-DOPA са BSA било јаче од везивања допамина и BSA. У оквиру тезе ови резултати су проширени на норепинефрин, 3-метокситирамин, октопамин, DOPAC и HVA.

Синтеза 3-(1-((3,4-дихидроксифенил)амино)етилиден)-хроман-2,4-диона је урађена према поступку описаном у литератури за слична једињења (E.H. *Avdović*, D.S. *Dimić*, J.M. *Dimitrić Marković*, N. *Vuković*, M.Đ. *Radulović*, M.N. *Živanović*, N.D. *Filipović*, J.R. *Đorović*, S.R. *Trifunović*, Z.S. *Marković*, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 206 (2019) 421–429; E.H. *Avdović*, D.L. *Stojković*, V. V. *Jevtić*, D. *Milenković*, Z.S. *Marković*, N. *Vuković*, I. *Potočňák*, I.D. *Radojević*, L.R. *Čomić*, S.R. *Trifunović*, *Inorganica Chim. Acta.* 484 (2019) 52–59; E.H. *Avdović*, D. *Milenković*, J.M. *Dimitrić Marković*, J. *Đorović*, N. *Vuković*, M.D. *Vukić*, V.V. *Jevtić*, S.R. *Trifunović*, I. *Potočňák*, Z. *Marković*, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 195 (2018) 31–40). Као и једињења описана у литератури, и добијени дериват кумарина показује анти-туморску активност и отвара могућност даљих истраживања у овом смеру. Резултати тезе показују да су међумолекулске интеракције између синтетисаног једињења и циклин-зависне киназе истоветне оним за једињења сличне структуре која су описана у литератури E.H. *Avdović*, D.S. *Dimić*, J.M. *Dimitrić Marković*, N. *Vuković*, M.Đ. *Radulović*, M.N. *Živanović*, N.D. *Filipović*, J.R.

Dorović, S.R. Trifunović, Z.S. Marković, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 206 (2019) 421–429.

Г. Научни радови и саопштења публиковани из резултата дисертације

Кандидат Душан Димић је из резултата дисертације објавио 2 рада у врхунским међународним часописима (M₂₁) и 2 рада у истакнутом међународном часопису (M₂₂), као и 5 саопштења на скуповима од међународног значаја штампана у целини (M₃₃). На свим објављеним радовима и на три саопштења кандидат је први аутор.

1. Радови у врхунским међународним часописима (M₂₁)

1.1. **D. Dimić**, D. Milenković, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, “Antiradical activity of catecholamines and metabolites of dopamine: theoretical and experimental study”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19, pp: 12970-12980. (DOI: 10.1039/c7cp01716b)

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/cp/c7cp01716b>

1.2. **D. Dimić**, D. Milenković, J. Ilić, B. Šmit, A. Amić, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, “Experimental and theoretical elucidation of structural and antioxidant properties of vanillylmandelic acid and its carboxylate anion“, *Spectrochim. Acta A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 198, pp: 61-70. (DOI: 10.1016/j.saa.2018.02.063)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142518301811>

2. Радови у истакнутим међународним часописима (M₂₂)

2.1. **D. Dimić**, D. Milenković, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, “Thermodynamic and kinetic analysis of the reaction between biological catecholamines and chlorinated methylperoxy radicals“, *Molecular Physics*, 2018, 116 (9), pp: 1166-1178.

(DOI: 10.1080/00268976.2017.1414967)

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00268976.2017.1414967>

2.2. **D. Dimić**, D. Milenković, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, “Structural and Spectral Analysis of 3-methoxytyramine, an important metabolite of dopamine“, *Journal of Molecular Structure*, 2017, 1134, pp: 226-236. (DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.12.082)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286016314016>

3. Саопштења са међународних скупова штампана у целини (M₃₃)

3.1. **D. Dimić**, D. Milenković, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, „Theoretical study of the antioxidant activity of dopamine and its metabolites in water“, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2016, Book of Proceedings, pp: 431-434.

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

- 3.3. **D. Dimić**, E. Avdović, S. Trifunović, I. Potočnak, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, „Synthesis and crystallographic structure of novel coumarine derivative with dopamine“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28.09.2018, Book of Proceedings, pp: 113-116.
- 3.4. A. Radović, **D. Dimić**, Đ. Nakarada, J. Dimitrić Marković, „EPR and theoretical investigation of hydroxy radical scavenging of selected catecholamines“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28.09.2018, Book of Proceedings, pp: 479-482.
- 3.5. D. Sretenović, G. Jovanović, D. Milenković, E. Avdović, J. Đorović, **D. Dimić**, J. Dimitrić Marković, „The effect of additional OH group on the antiradical activity in dopamine/6-Ohdopamine and octopamine/norepinephrine pairs“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28.09.2018, Book of Proceedings, pp: 575-578.

Д. Закључак Комисије

На основу изложеног Комисија закључује да резултати кандидата Душана Димића, мастер физикохемичара, приказани у оквиру докторске дисертације представљају оригиналан и значајан научни допринос области физичке хемије, посебно њеним ужим научним областима – спектрохемији, биофизичкој хемији и динамици нелинеарних процеса и квантној хемији. Део резултата докторске дисертације објављен је у два рада у врхунским међународним часописима (M₂₁) и два рада у истакнутом међународном часопису (M₂₂). Резултати докторске дисертације су такође објављени и у виду пет саопштења са међународних скупова која су штампана у целини (M₃₃).

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Душана Димића, мастер физикохемичара под насловом:

„Експериментално и теоријско испитивање односа структура-антирадикалска активност одабраних неуротрансмитера, њихових прекурсора и метаболита“

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

Београд, 31.10.2018.

Комисија

др Јасмина Димитрић-Марковић, редовни професор,
Универзитет у Београду
Факултет за физичку хемију

др Зоран Марковић, редовни професор,
Државни универзитет у Новом Пазару
Департман за хемијско-технолошке науке

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

др Михајло Етински, ванредни професор,
Универзитет у Београду
Факултет за физичку хемију

др Марко Живановић, научни сарадник,
Универзитет у Крагујевцу,
Природно-математички факултет, Институт за биологију и екологију

Прилог 1 – Библиографија кандидата

Радови у међународним часописима изузетних вредности (M_{21a})

1. **D. Dimić**, A. G. Mercader, E. A. Castro, “Chalcone derivatives cytotoxicity activity against MCF-7 human breast cancer cells QSAR study”, *Chemometr. Intell. Lab.*, 2015, 146, pp: 378-384, DOI: 10.1016/j.chemlab.2015.06.011
2. N. Đorđević, M. Q. Y. Tay, S. Muthaiah, R. Ganguly, **D. Dimić**, D. Vidović, “C-F Bond Activation by Transient Phosphenium Dications”, *Inorg. Chem.*, 2015, 54 (9), pp: 4180-4182, DOI: 10.1021/ic5031125.

Радови у врхунским међународним часописима (M₂₁)

1. E. Avdović, **D. Dimić**, J. Dimitrić Marković, N. Vuković, M. Radulović, M. Živanović, N. Filipović, J. Đorović, S. Trifunović, Z. Marković, “Spectroscopic and theoretical investigation of the potential anti-tumor and anti-microbial agent, 3-(1-((2-hydroxyphenyl)amino)ethylidene)chroman-2,4-dione”, *Spectrochim. Acta A*, 2019, 206, pp: 421-429, DOI: 10.1016/j.saa.2018.08.034
2. **D. Dimić**, D. Milenković, J. Ilić, B. Šmit, A. Amić, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, “Experimental and theoretical elucidation of structural and antioxidant properties of vanillylmandelic acid and its carboxylate anion”, *Spectrochim. Acta A*, 2018, 198, pp: 61-70, DOI: 10.1016/j.saa.2018.02.063
3. **D. Dimić**, D. Milenković, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, “Antiradical activity of catecholamines and metabolites of dopamine: theoretical and experimental study”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, 19, pp: 12970-12980, DOI: 10.1039/c7cp01716b
4. **D. Dimić**, M. Petković, “Control of a Photoswitching Chelator by Metal Ions: DFT, NBO, and QTAIM Analysis”, *Int. J. Quantum Chem.*, 2016, 116 (1), pp: 27-34, DOI: 10.1002/qua.25018
5. C. Gurnani, N. Đorđević, S. Muthaiah, **D. Dimić**, R. Ganguly, M. Petković, D. Vidović, “Extending the chemistry of carbonates: P-N bond cleavage via an S_N2'-like mechanism”, *Chem. Commun*, 2015, 51, pp: 10762-10764, DOI: 10.1039/C5CC03194J

Радови у истакнутим међународним часописима (M₂₂)

1. **D. Dimić**, “The importance of specific solvent-solute interactions for studying UV-vis spectra of light-responsive molecular switches”, *C. R. Chim., In Press*, DOI: 10.1016/j.crci.2018.09.007
2. **D. Dimić**, D. Milenković, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, “Thermodynamic and kinetic analysis of the reaction between biological catecholamines and chlorinated methylperoxy radicals”, *Mol. Phys.*, 2018, 116 (9), pp: 1166-1178, DOI: 10.1080/00268976.2017.1414967
3. **D. Dimić**, D. Milenković, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, “Structural and Spectral Analysis of 3-methoxytyramine, an important metabolite of dopamine”, *J. Mol. Struct.*, 2017, 1134, pp: 226-236, DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.12.082

Радови у међународним часописима (M₂₃)

1. D. Milenković, E. H. Avdović, **D. Dimić**, Z. Bajin, B. Ristić, N. Vuković, S. Trifunović, Z. Marković, “Reactivity of the coumarine derivative towards cartilage proteins: combined NBO, QTAIM, and molecular docking study”, *Monatsh Chem*, 2018, 149, pp: 159-166, DOI: 10.1007/s00706-017-2051-4

Саопштења са међународних скупова штампана у целини (M₃₃)

1. **D. Dimić**, E. Avdović, S. Trifunović, I. Potočnak, J. Dimitrić Marković, Z. Marković, „Synthesis and crystallographic structure of novel coumarine derivative with dopamine“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28.09.2018, Book of Proceedings, pp: 113-116.
2. A. Radović, **D. Dimić**, Đ. Nakarada, J. Dimitrić Marković, „EPR and theoretical investigation of hydroxy radical scavenging of selected catecholamines“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28.09.2018, Book of Proceedings, pp: 479-482.
3. D. Sretenović, G. Jovanović, D. Milenković, E. Avdović, J. Đorović, **D. Dimić**, J. Dimitrić Marković, „The effect of additional OH group on the antiradical activity in dopamine/6-Ohdopamine and octopamine/norepinephrine pairs“, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28.09.2018, Book of Proceedings, pp: 575-578.
4. **D. Dimić**, D. Milenković, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, „Theoretical study of the antioxidant activity of dopamine and its metabolites in water“, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2016., Book of Proceedings, p.: 431-434.
5. **D. Dimić**, D. Milenković, Z. Marković, J. Dimitrić Marković, „Conformational and vibrational analysis of 3-methoxytyramine“, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2016., Book of Proceedings, p.: 143-146.
6. D. Milenković, Z. Marković, S. Jeremić, **D. Dimić**, J. Dimitrić Marković, „Vibrational spectroscopic analysis of kaempferol: a combined experimental and theoretical study“, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2016., Book of Proceedings, p.: 131-134.
7. **D. Dimić**, D. Milenković, D. Amić, J. Dimitrić Marković, „Thermodynamic and Kinetic Aspects of the Electron-Transfer Reaction of Dopamine and its Metabolites Towards Substituted Methylperoxy Radicals“, 4th South-East European Conference on Computational Mechanics, Kragujevac, 3-4.7.2017., Book of Abstracts, p.: 378-386.
8. M. Stanojević Pirković, S. Jeremić, J. Dimitrić Marković, **D. Dimić**, D. Amić, D. Milenković, „Computational Molecular Docking Studies of Kaempferol-Procalcitonin Interactions“, 4th South-East European Conference on Computational Mechanics, Kragujevac, 3-4.7.2017., Book of Abstracts, p.: 387-392.
9. **D. Dimić**, M. Petković, „Theoretical analysis of Cu⁺ and Fe²⁺ complexes of (*E*)-*N*'-[1-(2-hydroxyphenyl)ethylidene]isonicotinoylhydrazide“, 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2014., Book of Proceedings, p.: 176-179,
10. **D. Dimić**, M. Petković, „Stability and vibrational spectra of different complexes of Cu and Fe ions with (*E*)-*N*'-[1-(2-hydroxyphenyl)ethylidene]isonicotinoylhydrazide“, 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 22-26.09.2014., Book of Proceedings, p.: 1033-1036
11. **D. Dimić**, „Explicit Solvent Effect as a Parameter Influencing the Electronic Transitions of the Novel Molecular Switch“, EWinS 2016: EUSpec Winter School on core level spectroscopies, Ajdovščina, 1-11.2.2016., Book of Abstracts, p: 57-58.

12. **D. Dimić**, B. Adnađević, J. Jovanović, „Kinetics of osmotic drying of alginate beads“, 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 24-28.9.2012., Book of Proceedings, p.: 197-199

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M₃₄)

1. **D. Dimić**, M. Petković, „Photoisomerisation mechanism of novel molecular switches – a Theoretical Investigation“, 13th Young Researchers' Conference, Belgrade, 10-12.12.2014., Book of Abstracts, p.: 22.