

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**HEMIJSKI FAKULTET**



Jelena K. Korać Jačić

**Ispitivanje koordinativnih sposobnosti epinefrina  
prema  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  katjonima i redoks aktivnost  
nastalih kompleksa**

**doktorska disertacija**

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Jelena K. Korać Jačić

**Investigation of coordination capabilities of  
epinephrine towards  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  cations and redox  
activity of their complexes**

**Doctoral Dissertation**

Belgrade, 2020

Mentori: dr Ivan Spasojević, naučni savetnik  
Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u  
Beogradu  
dr Sanja Grgurić-Šipka, redovni profesor  
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije: dr Maja Šumar-Ristović, docent  
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu  
dr Dalibor Stanković, viši naučni saradnik  
Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji Odseka za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) Univerziteta u Beogradu. Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. OI 173017.*

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru dr Ivanu Spasojeviću, na aktivnom učešću, sugestijama i nesebičnoj podršci u svim fazama izrade ovog rada.*

*Srdačno se zahvaljujem svom drugom mentoru dr Sanji Grgurić-Šipki na ukazanom poverenju i podršci za moju profesionalnu budućnost.*

*Najiskrenije se zahvaljujem dr Jeleni Bogdanović Pristov na ukazanom poverenju, na stručnoj pomoći tokom cele izrade ove doktorske disertacije i pre svega prijateljskoj pomoći u toku mog celokupnog dosadašnjeg rada.*

*Zahvaljujem se dr Milanu Žižiću, dr Marini Stanić i dr Ljiljani Nikolić na vremenu, trudu i nesebičnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimenata.*

*Zahvaljujem se članovima komisije na korisnim sugestijama i pažljivom čitanju i korigovanju doktorske disertacije.*

*Svim saradnicima iz laboratorije Odseka za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu na prijatnoj atmosferi koja je ovo istraživanje učinila zabavnijim.*

*Na kraju, želim da se zahvalim svojoj porodici, ocu Komnenu, majki Dragici, bratu Savi i supruhu Dušanu. Njima, jer bez njihove безусловne ljubavi, podrške i apsolutne slobode koju si mu darivali u svemu što radim mnogo toga ne bi postojalo, zajedno sa mnom. Hvala.*

# *Ispitivanje koordinativnih sposobnosti epinefrina prema $Fe^{2+}$ i $Fe^{3+}$ katjonima i redoks aktivnost nastalih kompleksa*

## **SAŽETAK**

Epinefrin je kateholamin sa značajnom fiziološkom ulogom. Konformacija ovog molekula utiče na njegovu interakciju sa drugim molekulima i na njegove biološke efekte. Na fiziološkim pH vrednostima, koordinativne sposobnosti epinefrina prema gvožđu i redoks interakcije epinefrina sa gvožđem su od suštinske važnosti za razumevanje dve veoma različite pojave. Prva pojava je štetno dejstvo koje hronični psihološki/sredinski stres izaziva na nivou kardiovaskularnog sistema. Druga pojava je umrežavanje kateholaminima bogatih biopolimera i struktura. Kako bi se rasvetlile uloge rastvarača i vodoničnih veza u interakcijama epinefrina sa gvožđem, proučavana je konformacija epinefrina u vodi i polarnom rastvaraču dimetil sulfoksidu (DMSO).

U ovoj disertaciji su predstavljeni rezultati proučavanja mehanizama interakcije epinefrina sa  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  jonima pri različitim koncentracionim odnosima na pH 7,4, odnosno na pH vrednosti koja odgovara fiziološkim uslovima. U svrhu istraživanja bioloških efekata epinefrina, u ovoj disertaciji su predstavljena ispitivanja efekta Epi- $Fe^{3+}$  kompleksa na ćelije koje konstitutivno ekspimiraju adrenergičke receptore.

Konformacije epinefrina u polarnim rastvaračima, vodi i DMSO, su proučavane metodama  $^1H$  nuklearne magnetne rezonance ( $^1H$  NMR) kao i dvodimenzionalnim metodama nuklearne magnetne rezonance, i to:  $^1H$  -  $^1H$  COSY,  $^1H$  -  $^{15}N$  HSQC i NOESY. Na  $NH_2$  i  $CH_2$  grupama epinefrina su uočeni hemijski neekvivalentni protoni prilikom korišćenja DMSO kao rastvarača. Ove pojave nisu uočene kada je rastvarač bila voda. Analizom uticaja korišćenog rastvarača na NMR spektar, i analizom uticaja povećanja temperature uzorka na NMR spektar, dolazi se do zaključka da jedan od protona amino grupe formira jaku intramolekulsku vezu sa alifatičnom hidroksilnom grupom, koja je pak H donor drugoj intermolekularnoj vezi sa DMSO. Pomoću NOESY metode su prikupljeni podaci o prostornoj poziciji protona u bočnom lancu. Na taj način je formiran 3D model konformacije epinefrina u DMSO. Ukratko, epinefrin formira dodatni petočlani prsten koji sadrži bifurkovane intramolekulske/intermolekulske vodonične veze i zauzima strukturu oblika škorpiona, gde kateholni prsten predstavlja telo škorpiona, a bočni lanac predstavlja rep koji je povijen u smeru glave škorpiona. U vodi, kao rastvaraču, konformacija epinefrina ne poseduje intramolekulske vodonične veze pa je tada struktura ovog molekula najverovatnije definisana vodoničnim vezama sa molekulima vode.

U okviru ove disertacije ispitivanjima je ustanovljeno da epinefrin sa  $Fe^{3+}$  jonima gradi stabilne visokospinske komplekse čija je stehiometrija 1:1 ili 3:1. Stehiometrija ovog kompleksa zavisi od odnosa koncentracija epinefrina i  $Fe^{3+}$  jona. Na kateholnom prstenu epinefrina atomi kiseonika predstavljaju mesto za formiranje koordinacione veze unutar fiziološki relevantnog bidentatnog 1:1 kompleksa.  $Fe^{3+}$  katjon ima slab uticaj na redoks osobine epinefrina. Međutim, epinefrin i  $Fe^{2+}$  joni grade kompleks koji je jak redukcionni agens. Posledica je redukcija  $O_2$ , proizvodnja vodonik peroksida i formiranje Epi- $Fe^{3+}$  kompleksa. U ovom procesu epinefrin se ne oksiduje, odnosno  $Fe^{2+}$  jon nije prenosilac, već donor elektrona. Oksidacija  $Fe^{2+}$  jona koja je katalizovana epinefrinom predstavlja moguće hemijsko objašnjenje za stresom izazvana oštećenja ćelija srca. Takođe, rezultati ovih ispitivanja su u skladu sa prethodnim istraživanjima kateholamina u polimerima i njihovih interakcija sa gvožđem, i upućuju na nove strategije za poboljšavanje efikasnosti umrežavanja kateholaminima bogatih biopolimera i struktura.

U stresnim situacijama epinefrin se luči i može interagovati sa labilnim gvožđem koje se nalazi u ljudskoj plazmi. Te interakcije mogu prouzrokovati značajne patofiziološke posledice. U

ovoj disertaciji su prikazani rezultati istraživanja prema kojima epinefrin i  $\text{Fe}^{3+}$  joni na fiziološkom pH grade stabilni 1:1 bidentatni kompleks. Takođe je pokazano da na fiziološkom pH epinefrin ne degradira u prisustvu gvožđa. Utvrđeno je i da epinefrin i  $\text{Fe}^{2+}$  joni grade bezbojni kompleks i da je taj kompleks stabilan pri anaerobnim uslovima. Uočeno je i da epinefrin u prisustvu  $\text{O}_2$  značajno promovise oksidaciju  $\text{Fe}^{2+}$  jona i formiranje Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa. Pri eksperimentima rađenim metodom ciklične voltometrije, Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleks je pokazao potencijal  $E_{1/2} = -582 \text{ mV}$  (u odnosu na standardnu vodoničnu elektrodu). Ovakva vrednost  $E_{1/2}$  potencijala objašnjava katalizovanu oksidaciju. Interakcije sa gvožđem mogu uticati na biološke efekte/efikasnost epinefrina. Uticaj vezivanja gvožđa na biološko ponašanje epinefrina je ispitivan metodom nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji cela ćelija, u kulturi ćelija koje konstitutivno ekspimiraju adrenergičke receptore. Epinefrin je samostalno, bez značajnog prisustva gvožđa, uzrokovao povećanje amplitude struja usmerenih ka spoljašnosti ćelija, tj. povećanje izlaznih struja. Kompleks epinefrina sa  $\text{Fe}^{3+}$  nije izazivao slične posledice. Ovim se nameće zaključak da formiranje kompleksa sa gvožđem sprečava vezivanje epinefrina za adrenergičke receptore i njihovu posledičnu aktivaciju. Prooksidativna aktivnost Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleksa možda predstavlja vezu između hroničnog stresa i kardiovaskularnih problema, a labilno gvožđe u plazmi je potencijalni modulator bioloških aktivnosti liganda.

**Ključne reči: epinefrin,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  joni, struktura, kompleks, koordinacione veze, redoks potencijal, biološka aktivnost**

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Neorganska hemija

UDK broj:

# *Investigation of the coordination capabilities of epinephrine towards $Fe^{2+}$ and $Fe^{3+}$ cations and their redox activity*

## **ABSTRACT**

Epinephrine (Epi) is a catecholamine with important physiological roles. Interactions with other molecules and associated biological effects of Epi are controlled by its molecular conformation. Coordinate interactions of epinephrine with iron at physiological pH and their redox activity are crucial for understanding two distinct phenomena. First, the adverse effects that chronic stress causes to cardiovascular system. Second, the cross-linking of biopolymers and frameworks which are rich in catecholamines. Conformation of epinephrine in polar solvents, namely in dimethyl sulfoxide (DMSO) and water, was investigated in order to shed light on effects solvents and hydrogen bonds exert on interactions of epinephrine with iron.

Mechanism of epinephrine interactions with  $Fe^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  ions was studied at different concentration ratios, at physiological pH (pH 7.4), and the results are presented in this dissertation. For the sake of exploration of biological effects of epinephrine, this dissertation also contains the results of examination of effects Epi- $Fe^{3+}$  complex has on cell culture with constitutive expression of adrenergic receptors.

Conformation of epinephrine in polar solvents, namely in dimethyl sulfoxide (DMSO) and water, was investigated using  $^1H$  NMR,  $^1H$  -  $^1H$  COSY, NOESY and  $^1H$  -  $^{15}N$  HSQC methods. When DMSO was used as a solvent, chemical and magnetic nonequivalence of protons was spotted at  $NH_2$  and  $CH_2$  groups on epinephrine. Characteristics of hydrogen bonds in DMSO were determined by studying effect which temperature rise has on NMR spectra and also analyzing influences of solvent substitution on NMR spectra. Results have shown that epinephrine induces strong intramolecular bond between one of the protons of  $NH_2$  group and the OH group on the side chain. On the other hand, the OH group on the side chain, i.e. the aliphatic OH group, presents a proton donor for intermolecular bond between epinephrine and DMSO. This phenomenon was not noticed when water was used as a solvent. 3D modelling of epinephrine molecule structure was based on information about spatial arrangement of protons, which in turn was obtained using NOESY method. Obtained 3D model shows that epinephrine in DMSO has a rigid structure that resembles the shape of a scorpion, in which the catechol ring presents the body of the scorpion and the side chain presents the tail of the scorpion. This structure is a consequence of formation of an additional five-membered ring limited by inter/intra-molecular bonds. If water is used as a solvent (instead of DMSO), epinephrine takes different and non-rigid conformation which does not possess the aforementioned intramolecular hydrogen bond. In this case, conformation of epinephrine is determined by hydrogen bonds with solvent molecules.

Examinations conducted in the scope of this dissertation showed that epinephrine and  $Fe^{3+}$  form stable high-spin complexes in 1:1 and 3:1 stoichiometry. Stoichiometry of these depends on concentration ratio of epinephrine and  $Fe^{3+}$ . Results acquired using Raman spectroscopy have shown that 1:1 bidentate Epi- $Fe^{3+}$  complex is formed by coordinative bonding of  $Fe^{3+}$  ions to epinephrine molecule through O atoms on the catechol ring. Effect of  $Fe^{3+}$  and  $Fe^{2+}$  ions on redox properties of epinephrine was studied using method of cyclic voltammetry. It was observed that  $Fe^{3+}$  ions do not significantly affect redox properties of epinephrine, but epinephrine with  $Fe^{2+}$  ions forms strong reducing agent.  $Fe^{2+}$  ion presents electron donor that in the presence of epinephrine reduces  $O_2$  and causes production of  $H_2O_2$ . Specific hemism of epinephrine, which includes oxidation of  $Fe^{2+}$  ions, may present a mechanism that explains stress-induced cardiotoxicity and heart diseases. Also, these results can be used for improvement of synthesis and development of biopolymers.

In stressful situations epinephrine is released and it may interact with labile iron in human blood plasma. These interactions can have potentially important (patho)physiological effects. In this dissertation, it is shown that at physiological pH epinephrine and  $\text{Fe}^{3+}$  build stable 1:1 high-spin bidentate complex. It is also shown that in presence of iron, at physiological pH, epinephrine does not degrade. It was observed that epinephrine and  $\text{Fe}^{2+}$  build colorless complex, which was stable under anaerobic conditions. In presence of  $\text{O}_2$ , epinephrine significantly catalyzed oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  ions and formation of Epi- $\text{Fe}^{3+}$  complex. Cyclic voltammetry results showed that the mid-point potential of Epi- $\text{Fe}^{2+}$  complex equals -582 mV (vs. standard hydrogen electrode). This value of mid-point potential explains the oxidation promotion. Biological effects/efficiency of epinephrine are influenced by its interaction with iron. Iron binding effects on biological performance of epinephrine were examined using patch clamping in cell culture with constitutive expression of adrenergic receptors. Epinephrine, on its own, induced an increase of outward currents, whereas Epi- $\text{Fe}^{3+}$  complex did not evoke similar phenomenon. These imply that the binding of epinephrine to adrenergic receptors and their activation is inhibited by the formation of the complex of Epi with iron. Oxidative promoting activity of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence epinephrine may represent a basis for cardiovascular problems caused by chronic stress. The results obtained in this dissertation indicate that the labile iron pool may have a new function that represents a modulation of the activity of biologically significant ligands/molecules.

**Keywords: epinephrine,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  ions, conformation, complex, coordinate bond, redox potential, biological activity**

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Inorganic chemistry

UDK number:



## SKRAĆENICE

AMP	adenozin monofosfat
AR	adrenergički receptori
ATP	adenozin trifosfat
BDD	borom dopirana dijamantska (radna elektroda)
cAMP	ciklični adenzil monofosfat
COMT	katehol-O-metiltransferaza
CST	cerebrospinalna tečnost
CV	ciklična voltometrija
DA	dopamin
DAG	diacil glicerol
DEPMPO	5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksidi
DMSO	dimetil sulfoksid
Epi	epinefrin
GDP	guanozin difosfat
GTP	guanozin trifosfat
HO <sup>•</sup>	hidroksil radikal
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi
HSAB	tvrde i meke Luisove kiseline i baze (Hard and Soft (Lewis) Acids and Bases)
MAO	monoamin oksidaza
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NBTI	gvožđe koje se ne prenosi preko transferina
NE	norepinefrin
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoksid radikal anjon
PBS	fosfatom puferisan fiziološki rastvor
PKA	protein kinaza A
PLC	fosfolipaza C
PVDF	polivinildifluorid
ROS	reaktivne kiseonične vrste
SDS-PAGE	natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna elektroforeza
Tf	transferin
UV	ultraljubičasta oblast spektra elektromagnetnog zračenja (200 nm – 380 nm)
UV-A	oblast UV zračenja od 315 nm do 380 nm
VIS	vidljiva oblast spektra elektromagnetnog zračenja (380 nm – 740 nm)

# Sadržaj

1.	OPŠTI DEO .....	1
1.1	Kateholamini .....	2
1.1.1	Istorija epinefrina .....	2
1.1.2	Hemijske karakteristike epinefrina.....	3
1.1.3	Metabolizam epinefrina.....	5
1.1.4	Mehanizam delovanja epinefrina .....	7
1.1.5	Funkcije epinefrina.....	8
1.2	Hemija gvožđa.....	9
1.2.1	Koordinativna hemija gvožđa .....	9
1.2.2	Redoks hemija gvožđa .....	10
1.2.3	Metabolizam gvožđa .....	11
1.3	Kateholamini i kardiotoksičnost.....	13
1.4	Kompleksi katehola i gvožđa .....	14
1.4.1	Fe <sup>3+</sup> -katehol kompleksi u sintezi biopolimera.....	15
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	17
3.	MATERIJALI I METODE .....	18
3.1	Nuklearna magnetna rezonanca (NMR).....	18
3.1.1	<sup>1</sup> H NMR metoda.....	22
3.1.2	2D NMR spektroskopija.....	22
3.1.3	Eksperimentalni deo .....	23
3.2	UV/Vis spektroskopija .....	24
3.2.1	Eksperimentalni deo .....	24
3.3	Elektronska paramagnetna rezonanca (EPR) .....	25
3.3.1	EPR spektroskopija na niskim temperaturama.....	26
3.3.2	Magnetne osobine gvožđa .....	26
3.3.3	EPR metoda sa spinskim hvatačem.....	27
3.3.4	Eksperimentalni deo .....	27
3.4	Ramanova spektroskopija .....	28
3.4.1	Eksperimentalni deo .....	30
3.5	Ciklična voltometrija .....	31
3.5.1	Eksperimentalni deo .....	33
3.6	Oksimetrija i statički ORP.....	33
3.6.1	Eksperimentalno deo .....	34
3.7	Imunoblot .....	34

3.7.1	SDS poliakrilamidna elektroforeza .....	34
3.7.2	Eksperimentalni deo .....	35
3.8	Metoda nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji cela ćelija ( <i>whole cell patch clamp</i> ).....	36
3.8.1	Eksperimentalni deo .....	36
3.9	Statistička obrada rezultata.....	37
4.	REZULTATI I DISKUSIJA .....	38
4.1	Određivanje strukture epinefrina u vodi i dimetil sulfoksidu .....	38
4.1.1	Određivanje strukture epinefrina u vodi i dimetil sulfoksidu primenom $^1\text{H}$ NMR i $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY metode.....	38
4.1.2	Karakterizacija vodoničnih veza epinefrina u vodi i dimetil sulfoksidu pomoću efekta temperature.....	42
4.1.3	3D model epinefrina u dimetil sulfoksidu.....	46
4.2	Interakcija epinefrina sa $\text{Fe}^{3+}$ jonima .....	48
4.2.1	Strukturna analiza epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa primenom UV/Vis spektroskopije . .....	48
4.2.2	Strukturna analiza epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa primenom EPR spektroskopije...50	
4.2.3	Strukturna analiza epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa primenom Ramanove spektroskopije .....	52
4.2.4	Redoks analiza epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa primenom ciklične voltametrije.....53	
4.3	Interakcija epinefrina sa $\text{Fe}^{2+}$ jonima .....	55
4.3.1	Kompleks epinefrina i $\text{Fe}^{2+}$ i kinetika formiranja epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa polazeći od $\text{Fe}^{2+}$ jona.....	55
4.3.2	Epinefrin- $\text{Fe}^{2+}$ interakcija u aerobnim uslovima.....	56
4.3.3	Redoks analiza epinefrin- $\text{Fe}^{2+}$ interakcija primenom oksimetrije i redoks elektrode .....	59
4.3.4	Određivanje redoks karakteristika epinefrin- $\text{Fe}^{2+}$ kompleksa cikličnom voltametrijom u anaerobnim uslovima .....	61
4.3.5	Određivanje kapaciteta epinefrin- $\text{Fe}^{2+}$ kompleksa da redukuje disulfidne veze.... .....	63
4.4	Efekat vezivanja $\text{Fe}^{3+}$ jona za epinefrin na nivou adrenergičnih receptora.....	64
5.	ZAKLJUČAK .....	67
6.	LITERATURA .....	69
7.	PRILOZI .....	82
8.	BIOGRAFIJA AUTORA.....	i
9.	IZJAVA O AUTORSTVU .....	ii
10.	IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTOSKOG RADA .....	iii
11.	IZJAVA O KORIŠĆENJU .....	iv

# 1. OPŠTI DEO

Predmet rada ove doktorske disertacije je ispitivanje mehanizama koordinacionih i redoks interakcija epinefrina (Epi) sa  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  jonima, pri različitim koncentracionim odnosima Epi i gvožđa na pH 7,4, koji odgovara fiziološkim uslovima, kao i uticaja formiranja kompleksa Epi- $\text{Fe}^{3+}$  na efekte Epi na ćelijama koje konstitutivno ekspimiraju adrenergičke receptore (AR), kao i proučavanje strukture epinefrina u vodi i organskom rastvaraču dimetil sulfoksidu (DMSO) radi boljeg razumevanja uloge rastvarača i vodoničnih veza u interakcijama Epi sa gvožđem.

Epi predstavlja fiziološki važan molekul koji u organizmu pokazuje širok dijapazon dejstava. Povišen nivo Epi u krvotoku, koji je nosilac odgovora na sredinski, pre svega psihološki stres, se često smatra odgovornim za kardiovaskularna, imunska i druga oboljenja koja su povezana sa hroničnim izlaganjem stresu <sup>1</sup>, iako nije uspostavljena jasna veza. Dugo se smatralo da toksičnost Epi i drugih kateholamina potiče od autooksidacije ili oksidacije koja je katalizovana metalnim jonima uz istovremenu proizvodnju reaktivnih intermedijera i slobodnih radikala <sup>2</sup>.

Mnoge studije su pokazale da Epi i strukturno-sličan norepinefrin (NE) mogu izazvati oksidativno oštećenje, bez obzira na njihovu interakciju sa AR, što predstavlja važan faktor u patogenezi kateholamin-indukovane kardiotoksičnosti <sup>3-7</sup>. Međutim, oksidativni stres indukovani Epi u fiziološkim uslovima hemijski nije razrešen. Pretpostavlja se da su redoks interakcije Epi sa gvožđem odgovorne za ove procese. Pokazano je da Epi povećava proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta (*Reactive Oxygen Species*, ROS) u prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$  jona, što ukazuje na sposobnost kateholamina da formiraju redoks-aktivne komplekse gvožđa <sup>8</sup>. U skladu sa ovim, predložena su dva glavna mehanizma odgovorna za Epi-indukovani stres: autooksidacija Epi i redoks interakcije Epi sa gvožđem <sup>9-12</sup>.

Podaci iz literature pokazuju je da  $\text{Fe}^{3+}$  joni formiraju komplekse sa kateholima (katehol – 1,2-dihidroksibenzen). Međutim ova istraživanja nisu vršena u fiziološkim uslovima, pre svega na fiziološkoj pH 7,4. Većina dostupnih podataka se odnosi na ispitivanja koja su rađena u vodenoj sredini na nefiziološkoj pH vrednosti ili u različitim organskim rastvaračima <sup>13-20</sup>. Sposobnost koordinovanja liganda i formiranja kompleksa, kao i redoks osobine tih kompleksa, zavise od više faktora kao što su elektronski, sterični, induktivni, i hidrofobni efekat <sup>12</sup>. Stoga Epi-gvožđe interakcije treba posmatrati posebno u odnosu na postojeće literaturne podatke koji su dostupni za druge katehole.

Pored biološkog postoji i biotehnološki aspekt interakcija katehola sa gvožđem. Izuzetne adhezivne karakteristike određenih prirodnih polimera, kao što je „lepak“ koji sintetišu školjke, nastaju koordinativnim vezivanjem između kateholnih bočnih grupa pomoću  $\text{Fe}^{3+}$  jona <sup>21-24</sup>. Poznavanje mehanizama koordinovanja gvožđa za Epi je stoga od velikog značaja za razvoj biomimetičkih adhezivnih polimera.

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjene su brojne metode kao što su: nuklearna magnetna rezonanca (NMR), UV/Vis spektroskopija, elektronska paramagnetna rezonanca (EPR), Ramanova spektroskopija, zatim elektrohemijske metode kao što su ciklična voltametrija, oksimetrija i statički

redoks potencijal, imunohemijska metoda imunoblot kao i elektrofiziološka metoda nametnute voltaže na deliću membrane (*patch clamp*). Ove metode su primenjene radi određivanja hemijsko-strukturnih osobina i redoks osobina Epi i njegovih kompleksa sa  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  jonima, kao i praćenje efekata na AR.

Saznanja vezana za mehanizam formiranja kompleksa  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  jona sa Epi i mehanizam modulacije njihove redoks aktivnosti će omogućiti bolje razumevanje procesa metabolizma u koje je Epi uključen u biološkim i biomimetičkim sistemima.

S obzirom da su sva ova istraživanja urađena u *in vitro* i *ex vivo* uslovima, u budućnosti su u planu *in vivo* eksperimenti na životinjama kod kojih je indukovana poremećaj metabolizma gvožđa ili na animalnom modelu sredinskog stresa koji se tretira helirajućim agensima, i na taj način će se odgovoriti na brojna pitanja koja se odnose na metabolizam Epi u živim sistemima.

## 1.1 Kateholamini

Kateholamini predstavljaju hemijsku grupu jedinjenja, koja sadrže kateholnu grupu koju čini benzenov prsten sa dve susedne hidroksilne grupe i etilaminski bočni lanac sa jednom amino grupom, koji može biti dodatno supstituisan. U ljudskom organizmu najzastupljenija su tri fiziološki aktivna kateholamina, Epi, NE i dopamin (DA), i svi su derivati 3,4-dihidroksifeniletilamina<sup>25</sup>. Deluju kao neurotransmiteri u centralnom i perifernom nervnom sistemu i kao hormoni u endokrinom sistemu. Samim tim su od vitalnog značaja za održavanje homeostaze putem autonomnog nervnog sistema. Iako su sva tri kateholamina slične strukture, njihova distribucija u centralnom i perifernom nervnom sistemu, endokrinom sistemu, kao i njihovo delovanje u mozgu i drugim tkivima se značajno razlikuje<sup>26</sup>. Kateholamini su u organizmu zastupljeni u niskim koncentracijama i imaju značajnu ulogu u regulaciji mnogih funkcija centralnog nervnog sistema i predstavljaju važne terapijske mete<sup>25</sup>.

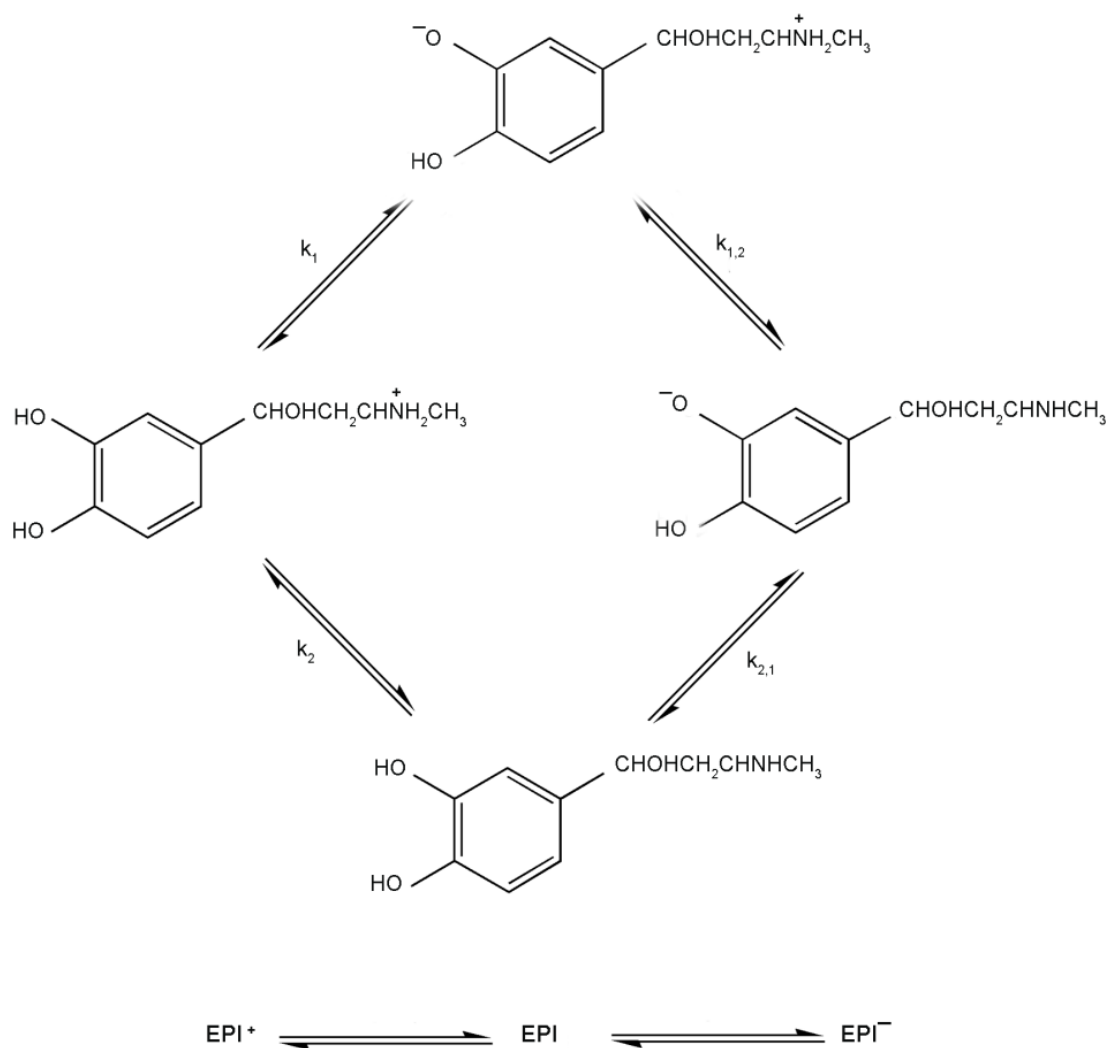
### 1.1.1 Istorija epinefrina

Epi je prvi kateholamin koji je izolovan<sup>27</sup>. Ovi rani eksperimenti omogućili su određivanje nekih fizičkih i biohemijskih osobina ekstrakta dobijenog iz nadbubrežnih žlezda volova i ovaca i uspostavljanje protokola za prečišćavanje aktivne supstance koji je prvi put postigao Džon Ejbl (*John Abel*) 1899. godine na Univerzitetu Džons Hopkins (*Johns Hopkins*) u Baltimoru. Ejbl je svoje jedinjenje nazvao epinefrin. Nezavisno od njega japanski naučnik Džokiči Takamine (*Jokichi Takamine*) je u svojoj laboratoriji u Njujorku izolovao aktivno jedinjenje u većoj količini i nazvao ga adrenalin. Adrenalin je opisao kao mikro-kristalnu supstancu koja se pojavljuje u najmanje pet kristalnih oblika prema vrsti i stanju upotrebljenog rastvarača. Takođe, pokazao je da je supstanca stabilna kada se osuši i da se razlaže na 207 °C. Svi vodeni rastvori ovog molekula bili su u opsegu boja od boje ruže, do crvene, i na kraju smeđe boje. U kiselinama se ovaj molekul lako rastvarao. Supstanca je pokazala veliku osetljivost na oksidaciona sredstva, posebno u prisustvu baza. On je definisao i empirijsku formulu adrenalina  $C_{10}H_{15}NO_3$ , za koju se kasnije utvrdilo da nije tačna, jer je supstanca sadržala nečistoće NE. Oba naučnika su 1899. godine publikovala pogrešnu empirijsku formulu. Ispravna empirijska formula  $C_9H_{15}NO_3$  prikazana je od strane Oldriča (*Aldrich*) 1901. godine<sup>28-30</sup>.

Aktivno jedinjenje Epi je izolovano kao kompleks gvožđa i prodavano je počev od 1900. godine od strane kompanije „Farbwerke Hoechst“ kao Suprarenin. Godinu dana kasnije Park-Dejvis (*Parke-Davis*) je počeo da prodaje isti molekul pod nazivom adrenalin, čija je proizvodnja izazvala konkurenciju. Proizvodnja sintetičkog Epi od strane kompanije „Hoechst“, 1906. godine, omogućila je veću i jeftiniju dostupnost hormona na tržištu. Hormon je u početku korišćen kao vazokonstriktor kod pacijenata koji su imali hirurški šok, i kao tretman prilikom astmatičnih napada<sup>27</sup>.

### 1.1.2 Hemijske karakteristike epinefrina

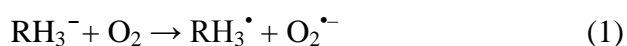
Epi ili 4-[1-hidroksi-2-(metilamino)etil]-1,2-benzendiol ima molekulsku masu 183,2 g/mol i slabo se rastvara u vodi na fiziološkoj pH 7,4. Njegova rastvorljivost u vodi zavisi od pH, što se može objasniti njegovim jonizacionim karakteristikama (slika 1.1).

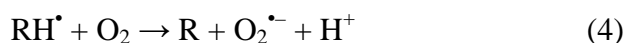
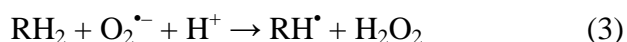
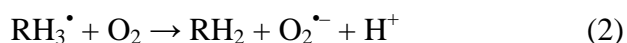


**Slika 1.1** Struktura Epi u zavisnosti od njegovih pKa vrednosti.

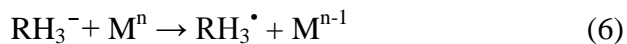
Prva reakcija deprotonacije potpuno protonovanog Epi uključuje gubitak protona sa amino grupe i hidroksilne grupe kateholnog prstena i stvaranje mešovite smeše koja sadrži cviter jon i neutralni molekul. Ova reakcija povezana je sa vrednošću  $pK_a = 8,69$ . Druga deprotonacija podrazumeva gubitak protona iz prethodno stvorenog cviter jona i neutralne forme i rezultira u formiranje Epi molekula čije je neto naelektrisanje  $-1$ , što je povezano sa vrednošću  $pK_a = 9,9$ <sup>31</sup>.

Epi je stabilan u kiselim rastvorima, ali sa povećanjem pH povećava se brzina oksidacije. Predloženo je da lančana reakcija koja uključuje superoksid radikal anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ) vodi do autooksidacije Epi i stvaranje hinona, odnosno adrenohroma, glavnog proizvoda oksidacije epinefrina. Autooksidacija epinefrina, koja uključuje  $O_2^{\bullet-}$  kao proizvod, se usporava sa smanjenjem pH počev od 10,2, i postaje nevidljiva na pH ispod 8,5. Drugim rečima, autooksidaciji je podložna jednom deprotonovana i (posebno) dvostruko deprotonovana forma Epi. Mehanizam koji uključuje  $O_2^{\bullet-}$  lančane progresivne vrste je važan na višim pH i postaje manje važan kada se smanji pH. Na visokim pH vrednostima, mehanizam autooksidacije Epi obuhvata sledeće korake:



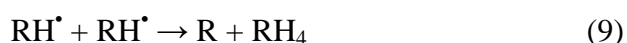


(Auto)oksidacija Epi može biti katalizovana u prisustvu metalnih jona.

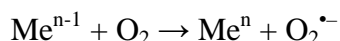


Autooksidacija, kao i oksidacija katalizovana metalima, uključuje lančane reakcije koje mogu biti inhibirane superoksid dismutazom.

Na nižim pH neki metali mogu inicirati proces oksidacije, koji se u užem smislu ne može nazvati autooksidacija, iako dalje reakcije mogu da se nastave nezavisno od metala. Organski radikali stvoreni u početnom koraku mogu da dovedu do stvaranja adrenohroma nizom dismutacionih reakcija:



Na ovaj način oksidacija Epi ne može biti inhibirana superoksid dismutazom. Redukujući metal stvoren u početnoj reakciji u bilo kom slučaju može biti reoksidovan pomoću  $\text{O}_2$ <sup>32</sup>:



Važno je reći, i od fiziološkog je značaja, da oksidacija Epi može biti promovisana u prisustvu redukujućih agensa, odnosno molekula sa relativno niskim redukcionim potencijalom na fiziološkoj pH. Tako askorbat može kroz redukciju metala da promoviše proizvodnju  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (metal redukuje  $\text{O}_2$ ) koji prema mehanizmu reakcije (3) indukuje oksidaciju Epi<sup>33</sup>.

Iz svega proizilazi da u širokom pH opsegu, gvožđe može da promoviše oksidaciju Epi. Međutim gvožđe ne može da indukuje oksidaciju Epi jer je redukcionni potencijal za par Epi radikal/Epi viši od para  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  na fiziološkoj pH (530 mV za katehol/semihinon par vs. 110 mV za gvožđe)<sup>12,34</sup>. I pored toga, ova reakcija se često pojavljuje u literaturi<sup>19,20,35</sup>.

U kakvom obliku se Epi nalazi na fiziološkom pH i kakva je njegova struktura, odnosno njegova konformaciona dinamika, veoma je bitno za razumevanje interakcija sa jonima gvožđa, kao i sa AR. Struktura Epi zavisi od rastvarača, jer konformacija predstavlja ravnotežu između intramolekulskih veza i uticaja okruženja. Većina do sada izvedenih studija o konformaciji je izvedena u gasnoj fazi ili u nepolarnim rastvaračima, jer su receptorska mesta jako hidrofobna. U njima su zapravo favorizovane intramolekularne vodonične veze zbog hidrofobnog okruženja<sup>36,37</sup>. Vodonične veze omogućavaju snižavanje energije i zauzimanje najstabilnije konformacije. Funkcionalne grupe kao što su OH na kateholnom prstenu, OH na bočnom lancu i  $\text{NH}_2$ , predstavljaju mesta gde se mogu formirati intra- i inter-vodonične veze sa rastvaračem, kao i mesta za formiranje koordinativnih veza sa metalima<sup>37</sup>. Formiranje kompleksa u rastvoru obuhvata reakcije supstitucije, u kojima ligand zamenjuje molekule rastvarača vezane za solvacionu sferu metalnog jona. Dakle razumevanje brzine, kinetike i mehanizma ovih reakcija zavisi od samog rastvarača.

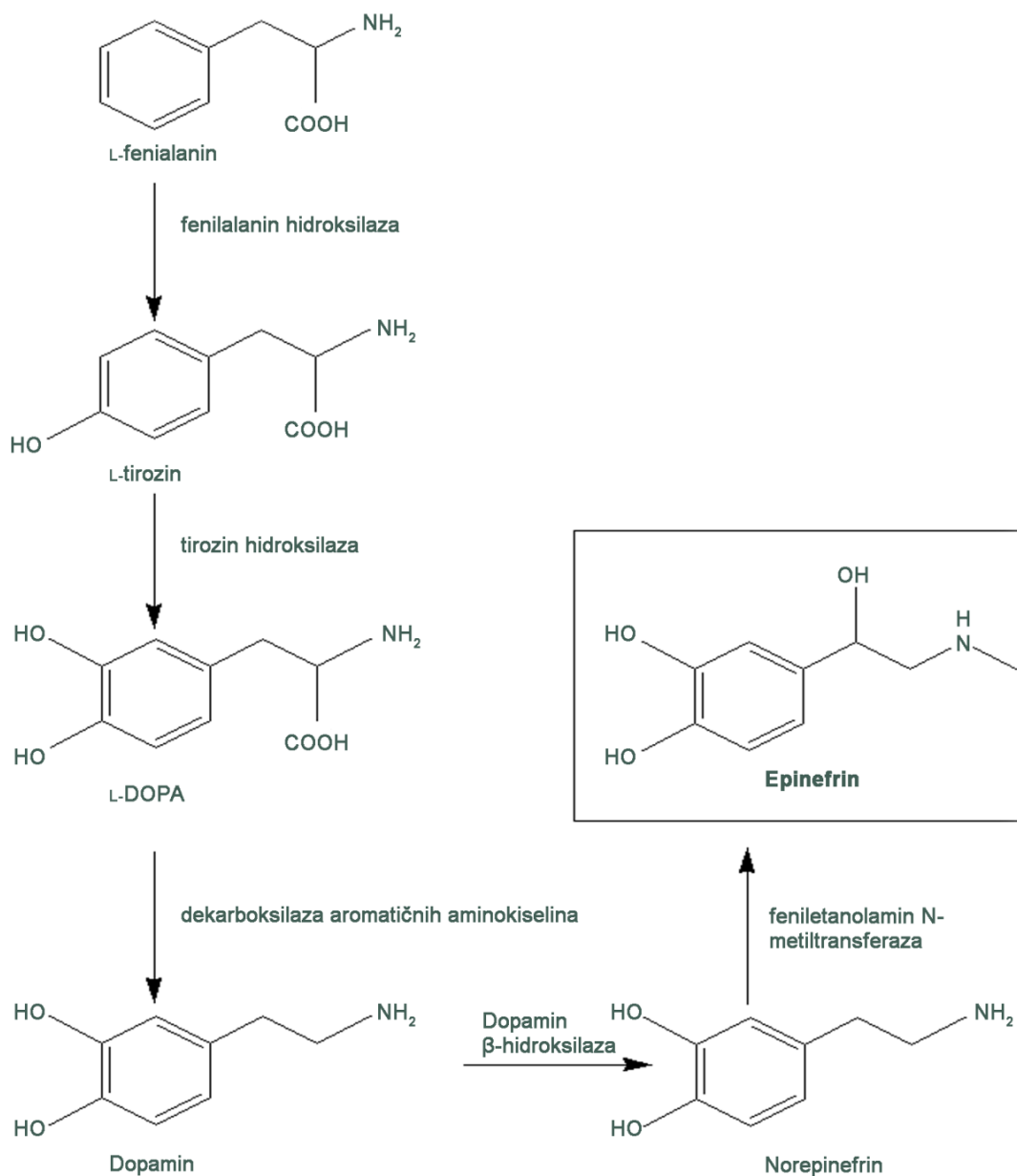
Međutim hemijsko okruženje, odnosno rastvarač, može da utiče i na formiranje i stabilnost kompleksa. Kompetitivno formiranje jakih vodoničnih veza sa ligandom, elektrostatičke interakcije ili transfer naelektrisanja, ometaju vezivanje metalnih jona ili čak u potpunosti inhibiraju nastajanje kompleksa. Drugim rečima, rastvarači imaju efekat na ove interakcije na osnovu različitih hemijskih interakcija, kisele ili bazne prirode, unutrašnje kohezije, dielektrične konstante, i mogućnosti formiranja vodoničnih veza<sup>38</sup>.

Sa druge strane, polarni rastvarači kao što je voda ili metanol, jako solvatišu anjone (kao što su  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) vodoničnim vezama i oni postaju neaktivni u ovoj vrsti rastvarača. Katjoni bivaju solvatisani elektronegativnim atomima rastvarača, ali je ova solvatacija slabija u odnosu na vodoničnu vezu, tako da katjoni postaju reaktivni i mogu da formiraju komplekse sa Epi. Aprotični rastvarači kao što je DMSO, jako solvatišu katjone i čine ih nereaktivnim, i onemogućavaju formiranje kompleksa <sup>39</sup>.

### ***1.1.3 Metabolizam epinefrina***

Epi se sintetiše u hromafinskim ćelijama u kori nadbubrežne žlezde i odatle se oslobađa u cirkulaciju, kao i u postganglijskim simpatičkim neuronima. Biosinteza kateholamina je omogućena preuzimanjem aminokiseline L-tirozina iz cirkulacije. Stoga, sinteza Epi (sintetišu se još i NE i drugi kateholamini) je unutar nadbubrežne žlezde regulisana serumskom koncentracijom aminokiseline tirozin. Nivo tirozina u plazmi i tkivu pokazuje karakterističnu dnevnu varijaciju, utičući na taj način na dostupnost prekursora za sintezu kateholamina. Epi je jedan od primarnih kateholamina koji se oslobađa nakon stimulacije simpatičkog nervnog sistema. Proces sinteze, prikazan na slici 1.2, uključuje brojne enzime koji se sintetišu u telu nervnih ćelija i aksoplazmatskim transportom prenose do nervnih završetaka. Enzim tirozin hidroksilaza pretvara tirozin u aminokiselinu L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). U većini fizioloških uslova hidroksilacija tirozina je korak koji reguliše brzinu sinteze kateholamina. Dekarboksilaza aromatičnih aminokiselina katalizuje reakciju dekarboksilacije levodope u DA. Zatim dopamin oksidaza katalizuje hidroksilaciju DA pri čemu nastaje NE. Poslednji korak u biosintezi kateholamina predstavlja konverzija NE u Epi, u reakciji koja je katalizovana enzimom feniletanolamin N-metiltransferazom. Sinteza Epi uključuje transfer metil grupe iz S-adenozilmetionina na aminski azot NE <sup>40</sup>.





**Slika 1.2** Biosintetski put Epi.

Kateholamini se brzo uklanjaju iz vanćelijske tečnosti. Krajer (*Cryer*) i saradnici su pokazali da je ovaj proces regulisan  $\beta$ -adrenergičkim mehanizmom<sup>41</sup>. Samo mala količina oslobođenih kateholamina se vezuje za receptore, dok se ostatak uklanja neuralnim ili ekstraneuralnim putem. Nivo kateholamina regulisan je pomoću enzima. Enzimi koji uklanjaju Epi prisutni su u sinapsama kao i unutar neurona. Među njima glavni enzimi su katehol-O-metiltransferaza (COMT) i monoamin oksidaza (MAO). COMT je unutarćelijski enzim koji postoji u rastvornoj formi koja se uglavnom nalazi u perifernim tkivima i membranski vezanoj formi koja se nalazi u presinaptičkim neuronima i glijalnim ćelijama. MAO je enzim koji se nalazi sa spoljašnje strane membrane mitohondrija presinaptičkih nervnih završetaka, a može se naći i u jetri, bubrezima, ćelijama miokarda i crevima<sup>42,43</sup>. Ekstraneuralna degradacija Epi pomoću enzima COMT vodi do formiranja metanefrina. Naknadna deaminacija i oksidacija MAO-om konačno dovodi do formiranja vanililmandelične kiseline, glavnog krajnjeg proizvoda katabolizma Epi<sup>44</sup>. Epi se vrlo kratko

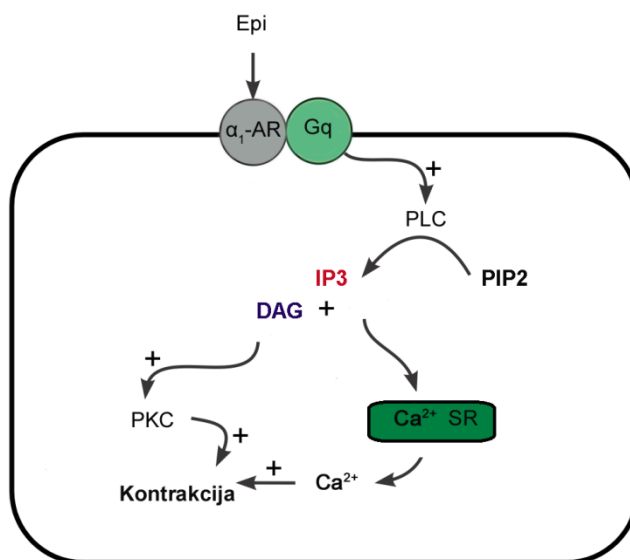
zadržava u cirkulaciji, tako da njegovo vreme poluživota iznosi oko 1-3 minuta, dok je njegov metabolički klirens 2-6 L/min. Cirkulišući epinefrin se uglavnom uklanja u jetri i bubrezima <sup>45</sup>.

### 1.1.4 Mehanizam delovanja epinefrina

Kateholamini, između ostalog i Epi, svoje dejstvo u centralnom i perifernom nervnom sistemu ispoljavaju vezivanjem za AR. AR su specifične molekularne strukture u/ili na efektorskim ćelijama za koje se kateholamini vezuju da bi izazvali karakterističan odgovor ćelija. Identifikovana su dva tipa AR -  $\alpha$  i  $\beta$  kao i određeni podtipovi ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ), što je dovelo do razumevanja molekularnih svojstva receptora i mehanizama preko kojih komuniciraju i moduliraju aktivnost efektorskih sistema. Međutim čini se da ova klasifikacija AR nije definitivna. Epi pokazuje afinitet vezivanja za oba tipa receptora,  $\alpha$  i  $\beta$ . Vezivanje Epi za različite tipove, odnosno podtipove, dovodi do oslobađanja različitih sekundarnih glasnika, koji aktiviraju jonske kanale i dovode do odgovarajućeg odgovora u organizmu i na taj način utiču na regulaciju različitih fizioloških procesa. AR pripadaju grupi receptora spregnutih sa G proteinom, heterotrimernim molekulom sastavljenim iz tri subjedinice ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) <sup>46-48</sup>.

$\alpha_1$ -AR sa svojim podtipovima ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) su važna klasa receptora spregnutih sa G proteinom. Ovi receptori učestvuju u regulaciji mnogih metaboličkih funkcija. Ekspimiraju se u različitim organima, uključujući mozak, srce, krvne sudove, jetru, bubreg, prostatu i slezinu, u kojima učestvuju u različitim efektima kao što su modulacija neurotransmisije, vazokonstrikcija, srčana inotropija i hronotropija, regulacija metabolizma. Iako mehanizam nije još uvek poznat, podaci pokazuju da su  $\alpha_{1A}$  i  $\alpha_{1B}$ -AR neophodni za fiziološku srčanu hipertrofiju, dok u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama  $\alpha_{1D}$ -AR izazivaju arterijsku vazokonstrikciju, posebno u koronarnim arterijama, koja indirektno utiče na funkciju srca <sup>49</sup>.

Aktivacija  $\alpha_1$ -AR dovodi do hidrolize polifosfoinozitida koja je katalizovana fosfolipazom C (PLC), pri čemu nastaju dva sekundarna glasnika: inozitol-trifosfat (IP3) i diacil glicerol (DAG), slika 1.3 <sup>50</sup>.

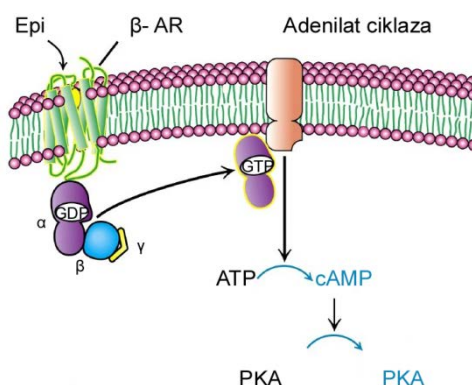


**Slika 1.3** Signalni put Epi nakon vezivanja za  $\alpha_1$  receptore.  $\alpha_1$ -AR - $\alpha_1$ -adrenergički receptor; Gq -G protein; PLC - fosfolipaza C; IP3 - inozitol-trifosfat; PIP2 - fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat; PKC - protein kinaza C; SR - sarkoplazmatični retikulum.

Stimulacija  $\alpha_2$ -AR receptora Epi dovodi do inhibicije adenil ciklaze i smanjenja koncentracije cikličnog adenzil monofosfata (cAMP). Epi dovodi do povećanja koncentracije  $Ca^{2+}$  jona izazvane delovanjem fosfolipaze C kroz modulaciju cAMP nivoa <sup>51</sup>.

Vezivanje liganda za  $\beta$  receptore dovodi do promene konformacije samog receptora, što za posledicu ima izmenu GDP (guanozin difosfata) sa GTP (guanozin trifosfatom) na  $\alpha$  subjedinici. Kao posledica toga  $\alpha$  subjedinica G proteina sa vezanim GTP-om disosuje od  $\beta\gamma$  proteina. Ovako aktiviran receptor aktivira adenilat ciklazu. Dalji mehanizmi odgovora na stimulaciju beta receptora od strane Epi su sažeto šematski prikazani na slici 1.4. Kada se adenilat ciklaza aktivira sa GTP-vezanom  $\alpha$  subjedinicom, ona katalizuje sintezu sekundarnog glasnika cAMP iz molekula ATP-a. cAMP aktivira i reguliše protein kinazu A (PKA). Transdukcija signala se završava degradacijom cAMP fosfodiesterazom<sup>52</sup>.

$\beta_1$  i  $\beta_2$  receptori na vaskularnim glatkim mišićima učestvuju u relaksaciji odgovora i dovode do vazodilatacije, dok  $\beta_3$  receptori eksprimirani na srčanim miocitima inhibiraju srčanu kontrakciju<sup>53</sup>.



**Slika 1.4** Vezivanje Epi za  $\beta$ -adrenergičke receptore.  $\beta$ -AR - $\beta$ -adrenergički receptor; GDP - guanozin difosfat; GTP - guanozin trifosfat; ATP - adenozin trifosfat; cAMP - ciklični adenozil monofosfat; PKA - protein kinaza A<sup>52</sup>.

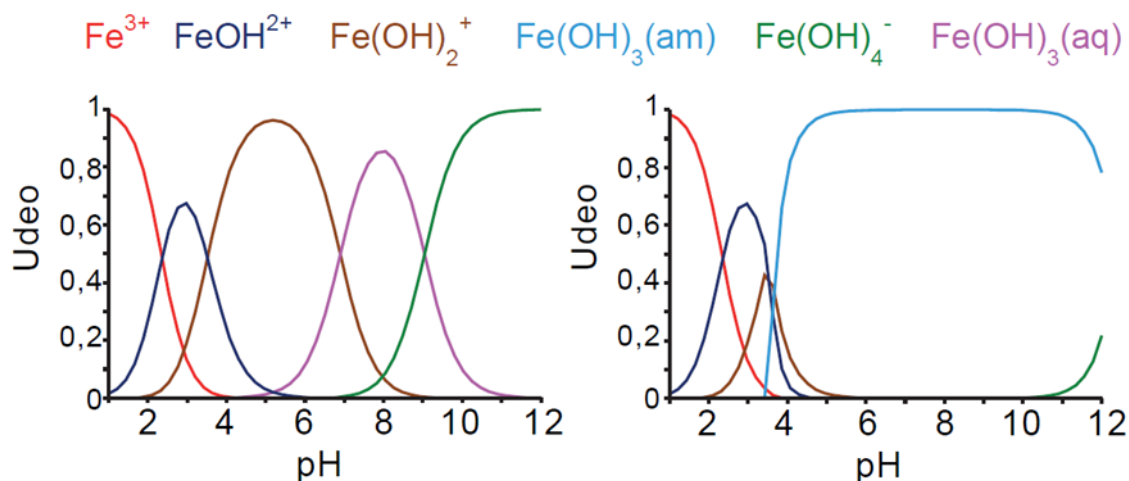
### 1.1.5 Funkcije epinefrina

Odgovor na stres od strane simpatičkog adrenomedularnog sistema dovodi do višesistemskog delovanja kateholamina, čija je primarna uloga mobilizacija fizioloških resursa. Kao odgovor na simpatičku stimulaciju, Epi se brzo izlučuje u krvotok sa izraženim efektima na kardiovaskularni sistem i oslobađanje energije (glukoza, slobodne masne kiseline)<sup>54</sup>. Pri akutnom i hroničnom fizičkom stresu, koncentracija Epi u plazmi je značajno veća u odnosu na fiziološko stanje. Oslobađanje Epi tokom stresa može dovesti do značajnih metaboličkih efekata koji uključuju povećanje glukoze u plazmi, glicerola u krvi, laktata u krvi,  $\beta$ -hidroksibutirata, i smanjenje insulina u plazmi<sup>55</sup>. Epi utiče i na regulaciju temperature. Međutim, istraživanja su pokazala da iako insulin i glukagon utiču na termogenezu, termogeneza izazvana Epi nezavisna je od sekundarnih promena ovih hormona<sup>56</sup>. Indukovanje lipolize kao posledice delovanja Epi povezano je sa aktivacijom  $\beta$ -receptora<sup>57</sup>. Epi ima glikogenolitičke efekte u mišićima jer deluje na selektivnu stimulaciju vlakana tipa 1<sup>58</sup>. Drugi efekti uključuju delovanje Epi na imuni sistem gde on može izazvati selektivnu supresiju Th1 odgovora i ćelijskog imuniteta stimulacijom  $\beta_2$ -adrenoreceptora-cAMP-PKA mehanizma, pri čemu se stimuliše proizvodnja tipa 2/anti-inflamatornih citokina (interleukin 10 i transformišući faktor rasta- $\beta$ ), dok se inhibira proizvodnja proinflamatornih citokina (interleukin-12, faktor nekroze tumora- $\alpha$ , i interferon- $\gamma$ ) pomoću antigen-prezentirajućih ćelija i T pomoćnih ćelija<sup>59</sup>. Takođe, Epi utiče na regulaciju jonskih struja L tipa voltažno zavisnih  $Ca^{2+}$  kanala<sup>60</sup>, koji predstavljaju glavni transporter labilnog gvožđa u kardiomiocitima i na taj način biva uključen u gvožđe povezanu kardiotoksičnost<sup>61</sup>.

## 1.2 Hemija gvožđa

Gvožđe predstavlja jedan od najzastupljenijih metala na zemlji i može se naći u oksidacionim stanjima od -2 do +4. U biološkim sistemima dominiraju dve forme gvožđa,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ . Jedinstvene elektrohemijske osobine gvožđa potiču od velike varijabilnosti redoks potencijala  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  para i čine ga idealnim redoks kofaktorom u mnogim biološkim procesima <sup>62</sup>. Standardni redoks potencijal  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  para u vodi i na pH 7 iznosi 110 mV <sup>63</sup>, koji se u zavisnosti od prisutnog liganda može menjati i na taj način obuhvatiti gotovo celokupan biološki značajan opseg redoks potencijala od -0,5 V do +0,6 V <sup>64</sup>. Veliki doprinos važnosti gvožđa čini njegova dostupnost i obilnost, iako na njegovu bioraspoloživost značajno utiče kiseonik.

U fiziološkim uslovima na pH 7,  $\text{Fe}^{3+}$  se nalazi u slabo rastvornom obliku  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  ( $K_{sp} = 10^{-39}$ ,  $[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-18}$  M), i njegove značajne koncentracije mogu se dobiti samo jakim kompleksiranjem  $\text{Fe}^{3+}$  sa raznim ligandima, slika 1.5 <sup>64</sup>. Za razliku od toga,  $\text{Fe}^{2+}$  je izuzetno rastvorljiva forma gvožđa koja nije stabilna i može se oksidovati u reakciji sa kiseonikom i nekim drugim molekulima, što dalje vodi produkciji ROS <sup>62</sup>. Širok spektar redoks potencijala kojim raspolaže ovaj metal, a koji se dobija interakcijom sa različitim koordinativnim ligandima, i njegova sposobnost da učestvuje u reakcijama jednoelektronskog prenosa, odgovaraju na pitanje zašto je gvožđe ključno za život <sup>62</sup>.



**Slika 1.5** Dijagrami prisustva različitih vrsta rastvornih i nerastvornih jona gvožđa u vodi u zavisnosti od pH; Dijagrami su dobijeni u Hidra-Medusa softveru (Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Švedska), korišćenjem sledećih parametara:  $[\text{Fe}^{3+}] = 0,1$  mM; pH opseg 1–12;  $T = 293$  K.

### 1.2.1 Koordinativna hemija gvožđa

Gvožđe je jedan od metala kojeg odlikuje složena koordinaciona hemija. I  $\text{Fe}^{3+}$  joni i  $\text{Fe}^{2+}$  joni pokazuju sposobnost koordinacije u različitim hemijskim okruženjima <sup>65</sup>. Oksidaciona stanja  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  jona se razlikuju po afinitetu prema ligandima i lakoći kojom mogu biti selektivno helirani od strane atoma donora u odnosu na druge metale. Zbog manje gustine naelektrisanja i većeg jonskog prečnika od 83 pm,  $\text{Fe}^{2+}$  joni su prema HSAB (*Hard and Soft (Lewis) Acids and Bases*) principu sličniji drugim biološki relevantnim jonima prelaznih metala, posebno  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . Iako je teško izdvojiti  $\text{Fe}^{2+}$  jone u odnosu na druge metale,  $\text{Fe}^{2+}$  joni pokazuju drugačiju geometriju ligandnog polja u odnosu na  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  jone.  $\text{Fe}^{2+}$  jon ima elektronsku konfiguraciju  $d^6$  i poseduje povoljnu energiju stabilizacije ligandnog polja za oktaedarske niskospinske komplekse <sup>66</sup>.  $\text{Fe}^{2+}$  jon se nalazi na granici između tvrdih i mekih kiselina. Stoga se može koordinovati za tvrde ligande koji sadrže kiseonik, i meke ligande poput onih koji sadrže azot i sumpor, kao što je imidazol, pirol,

metionin, histidin i cistein <sup>67</sup>. Oktaedarska geometrija je najčešća geometrija Fe<sup>2+</sup> kompleksa, mada postoje primeri tetra- i penta- koordinovanih kompleksa. Osnovno stanje Fe<sup>2+</sup> jona, <sup>5</sup>D<sub>2</sub>, u oktaedarskom kristalnom polju se cepa na <sup>5</sup>T<sub>2g</sub> i <sup>5</sup>E<sub>g</sub> nivoe, tako da u prisustvu jakog ligandnog polja Fe<sup>2+</sup> joni imaju elektronsku konfiguraciju t<sub>2g</sub><sup>6</sup> e<sub>g</sub><sup>0</sup>, dok je u slabom ligandnom polju elektronska konfiguracija t<sub>2g</sub><sup>4</sup> e<sub>g</sub><sup>2</sup>. Visokospinski Fe<sup>2+</sup> kompleksi koji nastaju u slabom ligandnom polju imaju magnetni momenat od oko 5,2 BM. Elektronski d-d prelaz iz <sup>5</sup>T<sub>2g</sub> do <sup>5</sup>E<sub>g</sub> dovodi do pojave široke apsorpcije u vidljivom ili blisko infracrvenom delu spektra. Jako ligandno polje u prisustvu donora azota dovodi do formiranja niskospinskih Fe<sup>2+</sup> kompleksa čiji spektri pokazuju intenzivne trake koje potiču od metal-ligand prenosa naelektrisanja <sup>68</sup>. Oktaedarski niskospinski kompleksi Fe<sup>2+</sup> jona su dijamagnetični, dok su visokospinski kompleksi paramagnetični <sup>65</sup>.

Tetraedarski Fe<sup>2+</sup> kompleksi su visokospinski kompleksi, sa magnetnim momentima prilično većim od predviđenih za četiri nesparena elektrona, i to usled orbitalnih doprinosa. Prelaz <sup>5</sup>E do <sup>5</sup>T<sub>2</sub> obično se javlja na oko 4000 cm<sup>-1</sup> i magnetnim momentima od 5,0 BM do 5,2 BM. Postoje i kvadratno-planarni Fe<sup>2+</sup> kompleksi. Ovi kompleksi sa dodatnim aksijalnim ligandima lako formiraju heksakoordinovane komplekse, koji su često niskospinski <sup>68</sup>.

Fe<sup>3+</sup> joni imaju d<sup>5</sup> elektronsku konfiguraciju, i pripadaju grupi tvrdih kiselina. Kod ovih jona metala, elektroni su vezani za metal i manje su dostupni za kovalentne veze, što za posledicu ima interakcije sa ligandima koji sadrže elektronegativnije donorske atome. Fe<sup>3+</sup> joni dovode do kraćih metal-ligand rastojanja i samim tim jaćih interakcija u odnosu na Fe<sup>2+</sup> jone, jer vrednosti cepanja ligandnog polja rastu sa porastom oksidacionog broja. Takođe Fe<sup>3+</sup> joni imaju veću gustinu naelektrisanja u odnosu na Fe<sup>2+</sup> jone, formirajući komplekse koji pokazuju veću stabilnost <sup>69</sup>. Većina kompleksa ima oktaedarsku geometriju. Afinitet Fe<sup>3+</sup> jona zaaminske ligande nije visok, međutim Fe<sup>3+</sup> kao tvrda kiselina pokazuju visok afinitet za donorske atome kiseonika <sup>66</sup>. Fe<sup>3+</sup> jon je „tvrda“ kiselina koja preferira „tvrde“ ligande poput fenolata i karboksilata, pre nego tiolna jedinjenja <sup>67</sup>. Ligandi bi trebalo da termodinamički favorizuju Fe<sup>3+</sup> jone u odnosu na Fe<sup>2+</sup> jone <sup>66</sup>. O d-d prelazima Fe<sup>3+</sup> jona se malo zna jer su njihovi UV/Vis spektri prekriveni intenzivnim trakama koje potiču od prenosa naelektrisanja <sup>68</sup>. U prisustvu slabog ligandnog polja (OH<sup>-</sup> jona), nastaju visokospinski kompleksi. Cepanje ligandnog polja je malo, što dovodi do maksimalnog broja nesparenih elektrona i elektronske konfiguracije t<sub>2g</sub><sup>3</sup> e<sub>g</sub><sup>2</sup>. U prisustvu jakog ligandnog polja Fe<sup>3+</sup> joni imaju elektronsku konfiguraciju t<sub>2g</sub><sup>5</sup> e<sub>g</sub><sup>0</sup>, tako da su nastali kompleksi niskospinski sa većim magnetnim momentom od predviđenog usled velikog orbitalnog doprinosa, koji se smanjuju na nižim temperaturama. Niskospinski Fe<sup>3+</sup> kompleksi mogu biti prilično inertni <sup>68</sup>. Obe vrste, i niskospinski i visokospinski oktaedarski kompleksi Fe<sup>3+</sup> jona su paramagnetični <sup>65</sup>.

## 1.2.2 Redoks hemija gvožđa

U organizmu, gvožđe ima tendenciju da se koordinuje sa različitim organskim i neorganskim ligandima formirajući komplekse. Slobodno gvožđe u organizmu se može vezivati za različite molekule, od kojih većina nije opisana, a od opisanih uočeni su kompleksi sa citratom, ATP, AMP, neurotransmiterima <sup>70,71</sup>. Ovo gvožđe je redoks aktivno gvožđe, što predstavlja potencijalni rizik jer može učestvovati u nekontrolisanom redoks ciklusu sa kiseonikom <sup>72</sup>. Iako predstavlja bitan element neophodan za normalno funkcionisanje, višak gvožđa može dovesti do oštećenja ćelija. U živim sistemima gvožđe može dovesti do proizvodnje ROS, što je i prikazano predstavljanjem relevantnih reakcija za Fe<sup>2+</sup> jone na fiziološkoj pH vrednosti (tabela 1.1) <sup>73,74</sup>. Ovo takozvano „labilno gvožđe“ predstavlja gvožđe potencijalno dostupno za proizvodnju i O<sub>2</sub><sup>-•</sup> i hidrosil radikala (HO<sup>•</sup>) kroz redukciju kiseonika i Fentonovu hemiju.

**Tabela 1.1** Relevantne reakcije za  $\text{Fe}^{2+}$  oksidaciju na pH 7,4 \*Fentonova reakcija; \*\*Mehanizam raspadanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  posredovan katalazom; Koncentracija akumulacije  $\text{H}_2\text{O}_2$ , koja je indukovana katalazom, izračunata je kao  $2 \times \Delta[\text{O}_2]$ .

Br.	Reakcija	k ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
1	$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet -}$	$4 \times 10^{-2}$
2	$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$	$1 \times 10^7$
3	$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet -} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$	$1,5 \times 10^8$
4*	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^{\bullet} + \text{OH}^-$	$10^2$
5	$\text{Fe}^{2+} + \text{HO}^{\bullet} \rightarrow \text{FeOH}^{2+}$	
6**	$2\text{H}_2\text{O}_2 \text{ (CAT)} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	

„Problem“ sa gvožđem je u tome što se ponaša kao reverzibilni šatl za elektrone. To je upravo karakteristika koju živi sistemi eksploatišu u velikom broju metaloproteina koji sadrže gvožđe, i koji se nalaze u samom centru mehanizama života (prenosu elektrona u mitohondrijalnom lancu). Sa druge strane, prenos elektrona sa redukujućih agensa na kiseonik ili vodonik peroksid, reakcija 1 i 4\*, su osnova (pato)fiziološkog delovanja labilnog gvožđa.

$\text{HO}^{\bullet}$  je izuzetno kratkoživeća vrsta sa malim prečnikom difuzije, koja pokazuje najveći standardni redukcionni potencijal u živim sistemima<sup>63</sup>. Ovaj radikal gotovo neselektivno reaguje sa svim molekulima koji se nađu u njegovoj okolini. Stoga se može očekivati da većina oksidativnih oštećenja nastaje u blizini mesta njegovog nastajanja<sup>75</sup>. Reakcije sa  $\text{HO}^{\bullet}$  obuhvataju tri procesa: oduzimanje vodonika, elektrofilno vezivanje i prenos elektrona<sup>74</sup>. Joni gvožđa su efikasni modulatori redoks stanja u živim sistemima, jer indukuju sukcesivno jednelektronsku redukciju  $\text{O}_2$  do  $\text{O}_2^{\bullet -}$ , tako da se oslobođeni elektron spušta niz kaskadu redukcionnih potencijala od 0,160 V za  $\text{O}_2^{\bullet -}$  do 1,8 V za  $\text{HO}^{\bullet}$ <sup>76-78</sup>. Nastali  $\text{HO}^{\bullet}$  uzrokuje oštećenje membranskih lipida i proteina, a unutarćelijski uzrokuje oštećenje nukleinskih kiselina, proteina, i dovodi do oštećenja različitih ćelijskih organela<sup>63</sup>. Važno je napomenuti da zbog svoje reaktivnosti  $\text{HO}^{\bullet}$  ne može proći kroz ćelijsku membranu. Uklanjanje slobodnog gvožđa iz cirkulacije mehanizmom heliranja Epi predstavlja obećavajući način sprečavanja patoloških stanja izazvanih hroničnim oksidativnim stresom. Ne postoji enzimska zaštita od  $\text{HO}^{\bullet}$ .

### 1.2.3 Metabolizam gvožđa

Gvožđe predstavlja esencijalni mikroelement neophodan za normalno funkcionisanje organizma. Učestvuje u vršenju i regulisanju brojnih fizioloških funkcija kao sastavni deo mnogih proteina i enzima. Dva oksidaciona stanja gvožđa,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ , čine ga pogodnim reaktantom u brojnim biohemijskim reakcijama. Važan je kofaktor mnogih redoks aktivnih proteina uključenih u veliki broj metaboličkih procesa kao što su: (i) transport, skladištenje i aktiviranje molekuskog kiseonika, (ii) katalizu oksido-redukcionih reakcija, (iii) transfer elektrona preko različitih nosača elektrona sa širokim spektrom redoks potencijala<sup>79</sup>.

Sistemska homeostaza gvožđa predstavlja poluzatvoren sistem u kojem ravnoteža gvožđa uglavnom zavisi od intestinalnog unosa gvožđa, koji je strogo kontrolisan. Unos gvožđa u organizam regulisan je pomoću hepcidina. Ovaj peptidni hormon, koji predstavlja glavni regulator sistemske homeostaze gvožđa, sintetiše se u jetri u uslovima prekomerne koncentracije gvožđa.

Hepcidin se vezuje za ferroportin, izaziva razgradnju ovog transportera gvožđa vezanog za ćelijsku membranu i na ovaj način se blokira unošenje gvožđa u krv <sup>80</sup>.

U ljudskom telu se nalazi oko 3,5 g do 4 g gvožđa koje je najvećim delom vezano za hemoglobin i njegove prekursore <sup>70</sup>. U organizmu gvožđe se može metabolizovati samo uz pomoć enzima Fe<sup>3+</sup> reduktaze i Fe<sup>2+</sup> oksidaze. Apsorpcija gvožđa vrši se u lumenu creva gde se Fe<sup>3+</sup> joni pomoću feri reduktaze redukuju do Fe<sup>2+</sup> jona. Zatim se Fe<sup>2+</sup> joni transportuju kroz apikalnu membranu enterocita pomoću transportera divalentnih metala, gde se unutar ćelije skladište ili prolaze kroz bazolateralnu membranu. Unutar ćelija, višak gvožđa koji ne prođe kroz bazolateralnu membranu se prerađuje i skladišti u feritinu. Feritin (450 kDa, 24 subjedinice, gvožđe u Fe<sup>3+</sup> formi) je unutarćelijski protein sa šupljim jezgrom u kojem se gvožđe čuva u formi Fe<sup>3+</sup> oksid-hidroksid fosfata. Feritin ima sposobnost da skladišti veliku količinu Fe<sup>3+</sup> jona, oko 4500 jona u netoksičnom i biološki nereaktivnom obliku. Značajno prisustvo feritina u plazmi implicira oštećenje ćelija i tkiva. Kod sisara feritin je izgrađen od teških (H) i lakih (L) subjedinica, koje imaju komplementarne funkcije u unosu gvožđa. Gvožđe koje se izbacuje u krvotok prolazi kroz bazolateralnu membranu pomoću transportera ferroportina SLC11A3. Efluks Fe<sup>2+</sup> jona pomoću ferroportina povezan je sa njegovom reoksidacijom do Fe<sup>3+</sup> jona. Ovaj proces katalizovan je membranski vezanom ferooksidazom, hefestinom, koja fizički komunicira sa ferroportinom. Vanćelijsko gvožđe se vezuje za serumski transferin (Tf) i tako dostavlja do određenih tkiva <sup>81</sup>. Tf (80 kDa, gvožđe u formi Fe<sup>3+</sup>) je glikoprotein koji je prisutan u krvi u koncentracijama od 25 μM do 50 μM, i ima mogućnost da vezuje dva jona Fe<sup>3+</sup> <sup>82</sup>. Gvožđe vezano za Tf se transportuje do drugih ćelija koje na svojim površinama sadrže specifične receptore i mehanizmom endocitoze unosi se u ćeliju. Sadržaj gvožđa u Tf iznosi manje od 0,1% ukupnog gvožđa u telu i veoma dinamično se menja tokom dana jer učestvuje u održavanju eritropoeze. Gvožđe vezano za Tf uglavnom potiče od gvožđa nastalog recikliranjem iz eritrocita i u manjoj meri od apsorbovanog gvožđa iz hrane <sup>81</sup>.

U organizmu gvožđe koje nije upotrebljeno za metaboličke procese čuva se kao rezerva, vezano za feritin i hemosiderin u hepatocitima i retikuloendotelnom sistemu makrofaga. Ovo uskladišteno gvožđe iznosi oko 20% do 30% ukupnog gvožđa u telu kod zdravih osoba.

Aktivnost gvožđa vezanog za proteine kao što su transferin i feritin je veoma ograničena i regulisana. Međutim, u plazmi, cerebrospinalnoj tečnosti (CST) i drugim vanćelijskim tečnostima kao i unutar ćelija, postoji gvožđe koje nije vezano za ove proteine i koje postaje potencijalno toksično za organizam, tzv. „labilno gvožđe“. Iako postoje zaštitni enzimi kao što su superoksid dismutaza i katalaza, koji smanjuju brzinu formiranja hidroksilnih radikala, ovi enzimi nisu u stanju da se izbore sa visokim nivoima gvožđa kada se zasite endogena mesta za skladištenje gvožđa <sup>83</sup>. Međutim, u organizmu labilno gvožđe može imati i pozitivnu ulogu, odnosno postoji ravnoteža između njegove pozitivne i negativne uloge koja je uslovljena promenom liganada koji utiču na reaktivnost, kao i promenom koncentracije samog gvožđa. Toksičnost, odnosno negativna uloga labilnog gvožđa, ogleda se u promociji oksidativnih oštećenja koja su povezana sa iniciranjem proizvodnje slobodnih radikala izazvanih gvožđem <sup>83</sup>. Brojna zdravstvena stanja povezana su sa promenama vanćelijskog labilnog pula gvožđa, uključujući naslednu hemohromatozu, Alchajmerovu bolest, Parkinsonovu bolest, sindrom nemirnih nogu, aceruloplazminemiju, Fridrajhovu ataksiju i druge <sup>84,85</sup>. Pozitivna uloga labilnog pula gvožđa može biti u neenzimskoj razgradnji metabolita, i ogleda se kroz česte toksične efekte helatora gvožđa <sup>86</sup>. Osim toga, sve je više podataka koji pokazuju da se labilno gvožđe transportuje u različite tipove ćelija radom niza Fe<sup>2+</sup> transportera, kao što su ZRT/IRT-nalik proteinu 14, L-tip Ca<sup>2+</sup> kanali, transporter divalentnih metalnih jona-1 <sup>87-89</sup>. Ovo je dominantan način transporta gvožđa u centralnom nervnom sistemu, gde CST pokazuje veoma niske koncentracije Tf. Kao što je već rečeno labilno gvožđe može postojati kao unutarćelijski i vanćelijski pul, koji se može nespecifično vezati za molekule male molekulske mase. Gvožđe koje unutar ćelije nije vezano za glavni skladišni protein, feritin, predstavlja formu unutraćelijskog labilnog pula gvožđa, koja je proizvod ravnoteže između feritina i drugih liganada. Smatra se da u plazmi gvožđe koje se ne prenosi preko Tf (*Non transferrin bound*

iron, NTBI) igra veliku ulogu u raznim patološkim stanjima u kojima dominira preopterećenje gvoždem. Međutim, treba naglasiti da labilni pul gvožđa i NTBI gvožđe u smislu terminologije nemaju isto značenje. NTBI predstavlja gvožđe kada su kapaciteti Tf prevaziđeni, i gvožđa ima u višku, dok labilni pul gvožđa postoji i kada kapaciteti Tf za vezivanje gvožđa nisu pokriveni. Labilni pul gvožđa je proizvod ravnoteže između Tf, koji ima najveći afinitet za Fe, i drugih liganda, koji najčešće imaju manji afinitet<sup>90,91</sup>.

Kliničke koncentracije NTBI gvožđa nalaze se u opsegu od 0,1  $\mu\text{M}$  do 10  $\mu\text{M}$ <sup>90</sup>. U plazmi su prisutni mnogi ligandi koji mogu da vežu NTBI gvožđe uključujući albumin, citrat i acetat, čije koncentracije iznose 600  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  do 140  $\mu\text{M}$ , i 20  $\mu\text{M}$  do 40  $\mu\text{M}$ , respektivno<sup>92</sup>. Albumin koji je prisutan u velikoj koncentraciji u plazmi zbog svog negativnog naelektrisanja na površini (-20), koje potiče od velikog broja karboksilatnih grupa, predstavlja jedan od kandidata koji je sposoban da veže NTBI gvožđe u  $\text{Fe}^{3+}$  formi. Kod pacijenata obolelih od talasemije *in vitro* eksperimenti ukazuju da albumin vezuje NTBI u prisustvu citrata u obliku labavog ternarnog kompleksa gvožđe-citrat-albumin. NMR analiza uzoraka plazme pacijenata obolelih od hemohromatoze ukazuje da citrat i acetat vezuju ovo gvožđe, formirajući komplekse koji mogu biti monomerni ili dimerni<sup>93</sup>. Redukcioni potencijal NTBI gvožđa koje je vezano za citrat je nešto niže od +0,1 V, tako da je redukcija  $\text{Fe}^{3+}$ -citrat kompleksa pomoću askorbata spor proces<sup>90</sup>. Međutim, kada je  $\text{H}_2\text{O}_2$  dostupan, kompleksi  $\text{Fe}^{3+}$ -citrat mogu doprineti patofiziološkim stanjima nastalim usled preopterećenja gvoždem<sup>94</sup>. Posebno su važni nedavni nalazi Đuiba (*Dzuiba*) i saradnika koji su koristeći LC-ICP-MS hromatografiju pokazali da u plazmi zdravih osoba i osoba obolelih od hemohromatoze, citrat nije dominantna forma koja vezuje labilno gvožđe. Postoje 2 do 6 različitih dominantnih vrsta koje vezuju labilno gvožđe u plazmi i čija masa se kreće od 400 Da do 2500 Da, i na taj način formiraju komplekse koji su prisutni u veoma niskim koncentracijama od  $10^{-7}$  M do  $10^{-8}$  M<sup>95</sup>. Uz to, postoji veći broj manje zastupljenih vrsta/liganda koji učestvuju u pulu labilog gvožđa.

Tačna priroda NTBI gvožđa u plazmi nije još poznata. Pretpostavlja se da postoje različiti oblici NTBI gvožđa u plazmi u zavisnosti od stepena viška gvožđa, njegovog trajanja i etiologije<sup>93</sup>.

### 1.3 Kateholamini i kardiotsičnost

U fiziološkim uslovima koncentracija cirkulišućeg Epi u ljudskoj plazmi iznosi od 50 pM do 1,2 nM<sup>96</sup>. U patofiziološkim uslovima koncentracija kateholamina povećana je i do nekoliko puta. Kao odgovor na stres, koncentracija Epi u ljudskoj plazmi može se povećati, dostižući vrednosti i do 50 nM, dok u nekim patofiziološkim stanjima, kao što je feohromocitom, tumor nadbubrežne žlezde, dostiže vrednosti i do 3,5  $\mu\text{M}$ <sup>58</sup>. Povećan nivo Epi u krvotoku odavno je prepoznat kao uzrok kardiovaskularnih problema koji se razvijaju kod hronične izloženosti stresu<sup>97,98</sup>. Emocionalni, fiziološki i fizički stres indukuju akutne i hronične kardiomiopatije i druga oboljenja i komplikacije. Međutim, brojne studije su ustanovile da su efekti Epi na kardiovaskularni sistem nezavisni od dejstva na receptore<sup>3-7</sup>.

Povećan nivo cirkulišućih kateholamina može izazvati toksične efekte na srce, uključujući nekrozu miokarda, i utiče na povećavanje tonusa krvnih sudova, srčanog ritma i volumena vanćelijske tečnosti, čime doprinosi povećanju krvnog pritiska, kao i smanjenju sistemske vaskularne rezistencije<sup>99,100</sup>. Pokazano je da povećanje nivoa kateholamina može dovesti do hipoksije, delom zbog redukcije  $\text{O}_2$  do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , koronarne insuficijencije, promene koncentracije elektrolita, promene propustljivosti membrane i unutarćelijskog preopterećenja  $\text{Ca}^{2+}$ , što doprinosi kardiotsičnosti indukovanoj kateholaminima. Morfološke promene koje nastaju na ovaj način slične su onima koje proizvodi infarkt miokarda, uključujući primarnu ćelijsku smrt kardiomiocita i progresivnu fokalnu fibrozu miokarda<sup>101</sup>.

Kardiotsičnost kateholaminima nije još uvek u potpunosti razjašnjena. Prema primarnom mehanizmu kardiotsičnost kateholamina uglavnom je povezana sa stimulacijom  $\beta$ -AR<sup>102</sup>. Sa



druge strane, niz istraživanja koja su ispitivala vezu između Epi, kardiotoksičnosti i oksidativnog stresa su utvrdila da ova patološka osa funkcioniše i bez učešća receptora, odnosno kroz specifičan hemizam Epi koji uključuje oksidaciju<sup>3-7</sup>.

Receptor-nezavisni mehanizmi kardiotoksičnosti kateholamina uključuju produkte oksidacije kateholaminima, formiranje ROS i formiranje kovalentnih veza sa ćelijskim SH grupama koje na taj način inaktiviraju mnoge ćelijske funkcije. Na fiziološkom pH oksidacija kateholamina je katalizovana tragovima metala kao što su gvožđe, bakar, nikal, kobalt. U prisustvu  $\text{Cu}^{2+}$  jona oksidacija kateholamina pokazuje linearnu zavisnost sa koncentracijom  $\text{Cu}^{2+}$ , kao i formiranje kompleksa sa  $\text{Cu}^{2+}$  jonima. Hemijska struktura kateholamina čini ih idealnim molekulima za uključivanje u redoks procese koji u prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$  ili  $\text{Cu}^{2+}$  jona dovode do produkcije  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , koji se pomoću dismutaze prevodi do  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>2</sup>. Sa druge strane, oksidacijom kateholamina nastaju različite visoko reaktivne vrste poput *o*-hinona, aminohroma, aminolutina, koje mogu reagovati sa ćelijskim nukleofilnim grupama, naročito SH grupama, koje su prisutne u cisteinu i glutationu, formirajući stabilne adukte i na taj način značajno utičući na funkciju ćelije<sup>2</sup>. Osim sa SH grupama *o*-hinoni mogu da interaguju sa drugim nukleofilnim grupama prisutnim u ćeliji formirajući hinoproteine<sup>103</sup>. Interakcija adrenohroma sa SH grupama indukuje depleciju kiseonika, askorbata i glutationa i na taj način izaziva štetne efekte<sup>2</sup>.

## 1.4 Kompleksi katehola i gvožđa

Molekuli koji sadrže aromatične hidroksilne grupe postavljene u *para* poziciji, kao što je katehol, su široko rasprostranjeni u biološkim sistemima. Zbog toga proučavanje interakcija prelaznih metala sa kateholom i njihovim derivatima postaje sve zanimljivije za istraživanje radi razumevanja njihove funkcije u biološkim sistemima. Mnogi molekuli koji sadrže kateholnu grupu se nalaze u ljudskom organizmu<sup>25</sup>, a neki se koriste u farmaciji kao lekovi u tretmanu hipertenzije<sup>104</sup>, Parkinsonove bolesti, itd.<sup>105</sup>.

Poznato je da kateholi reaguju sa gvožđem i formiraju komplekse. Međutim, samo mali broj kompleksa je proučavan u vodenoj sredini<sup>13-16,106,107</sup>. Protonovani kateholi (tzv.  $\text{catH}_2$ ) mogu se deprotonovati jednom ( $\text{catH}$ ) ili dva puta ( $\text{cat}$ ) na hidroksilnim grupama vezanim za kateholni prsten, kako bi se dobili anjonski ligandi za vezivanje metalnih jona. Većina kompleksa metal-katehol su dianjonskog oblika<sup>107</sup>. Postoji ograničen broj  $\text{catH}$  liganda, ali samo u kompleksima sintetisanim u organskim rastvaračima<sup>108-111</sup>.

Ligandi koji sadrže negativno naelektrisane O donorske atome pokazuju dobru linearnu korelaciju između  $\text{pK}_a$  i  $\log K$  vrednosti za  $\text{Fe}^{3+}$  jone, što ukazuje na dominantni uticaj elektrostatičkih interakcija između  $\text{Fe}^{3+}$  jona i ligandnih atoma. Ovo ukazuje da su idealni ligandi za  $\text{Fe}^{3+}$  jone ligandi kao što su kateholi, koji sadrže atome O i relativno visoke vrednosti  $\text{pK}_a$ <sup>83</sup>. Kateholni ligandi slični su okso ligandima i njihovoj sposobnosti da se koordiniraju kao jaki donori sa metalima kojima nedostaju elektroni. Nađeno je da jako  $\pi$  vezivanje između katehola i gvožđa obezbeđuje značajan stabilizujući efekat u odnosu na druge O donore<sup>112</sup>. Stoga kateholi poseduju visok afinitet za  $\text{Fe}^{3+}$  jone, pa je ova izuzetno jaka interakcija sa metalnim jonom sa tri pozitivne šarže rezultat velike elektronske gustine oko oba atoma kiseonika<sup>113</sup>. Konstante stabilnosti  $\text{Fe}^{3+}$ -katehol kompleksa su izuzetno visoke, u rasponu od  $\log K = 20,01$  za monokatehol komplekse, do  $\log K = 43,76$  za tris (katehol) komplekse<sup>114</sup>. Konstante stabilnosti za  $\text{Fe}^{2+}$ -katehol su nešto niže i iznose  $\log K = 7,95$  za  $\text{Fe}^{2+}$ -monokatehol kompleks<sup>115</sup>. Radi poređenja, konstanta stabilnosti za  $\text{Fe}^{3+}$ -Tf je  $10^{20} \text{ M}^{-1}$ <sup>116</sup>.

Velika gustina naelektrisanja povezana je i sa visokim afinitetom za protone ( $\text{pK}_a = 12,1$  i  $\text{pK}_a = 8,4$ ). Formiranje kompleksa između katehola i gvožđa zavisi od strukture kateholnog liganda i stepena koordinacije  $\text{Fe}^{3+}$  jona. Ranije studije su predložile da u vodenim rastvorima na pH vrednosti između 6 i 7 kateholi sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima grade bis-katehol- $\text{Fe}^{3+}$  kompleks  $[\text{Fe}(\text{cat})_2]$  koji

pokazuje UV/Vis apsorpcioni maksimum na 570 nm. Međutim, na vrednostima pH većim od 9,5 grade tris-katehol-Fe<sup>3+</sup> kompleks [Fe(cat)<sub>3</sub>]<sup>3-</sup> koji UV/Vis apsorpcioni maksimum pokazuje na 480 nm. Mono-katehol-Fe<sup>3+</sup> kompleks se formira na vrednostima pH < 5 sa  $\lambda = 714 \text{ nm}$ <sup>117</sup>. U anaerobnim uslovima Sančez (*Sanchez*) i saradnici su predložili da na pH 7,4 [Fe(cat)<sub>2</sub>] predstavlja dominantnu vrstu u rastvoru. Međutim, u rastvoru se nalazi i mala količina [Fe(cat)<sub>3</sub>]<sup>3-</sup>. UV/Vis spektri pokazuju maksimum na 540 nm, što je, kao što se i očekuje, bliže onom koji se obično posmatra za [Fe(cat)<sub>2</sub>] (576 nm) nego za [Fe(cat)<sub>3</sub>]<sup>3-</sup> (483 nm)<sup>91</sup>. Ipak, treba istaći da su ova istraživanja, zasnovana na korišćenju samo UV/Vis spektroskopije za praćenje formiranja kompleksa u zavisnosti od pH vrednosti, metodološki ograničena. Takođe, treba naglasiti da ne postoje studije koje se bave proučavanjem kompleksa katehola i gvožđa u čvrstom stanju, sintetisanim na pH 7,4. U čvrstom stanju se proučavaju analogna jedinjenja sa kateholnom grupom, sintetisana u organskim rastvaračima<sup>109,110,118</sup>.

U poslednjih nekoliko godina sintetisani su u različitim organskim rastvaračima i opisani brojni katehol-Fe<sup>3+</sup> kompleksi koji predstavljaju strukturalne i funkcionalne modele katehol dioksigenaza<sup>119</sup>. Takođe, proučavana je i fiziološka uloga Fe-katehol kompleksa. Proučavane su slobodno-radikalne reakcije, proizvodnja HO<sup>•</sup>, kao i njihova antioksidativna svojstva. Sposobnost heliranja gvožđa može da predstavlja važno antioksidativno svojstvo helatora. Antioksidativna aktivnost kateholnog helatora je proučavana određivanjem kompetitivnosti sa ferozinom, jakim helatorom Fe<sup>2+</sup> jona, za Fe<sup>2+</sup> jone u rastvoru, i određivanjem kapaciteta da inhibira nastajanje Fe<sup>2+</sup>-ferozin kompleksa. Takođe, antioksidativna aktivnost je proučavana i merenjem sposobnosti Fe<sup>3+</sup>-katehol kompleksa da uklanjaju DPPH stabilni slobodni radikal. Na osnovu tih rezultata, predloženo je da heliranje gvožđa kateholima može biti osnova antioksidativnih sposobnosti. Nedostatak ovih studija je u tome što su rađene u metanolu<sup>120,121</sup>. Među prelaznim metalima gvožđe se zbog svoje visoke reaktivnosti svrstava u najvažnije prooksidante lipidne peroksidacije. Feri katjoni (Fe<sup>3+</sup>) takođe proizvode radikale iz peroksida, ali je brzina je desetostruko manji od Fe<sup>2+</sup><sup>122</sup>.

Peron (*Perron*) i saradnici su pretpostavili da antioksidativna aktivnost katehola može da podrazumeva dva efekta: vezivanje Fe<sup>2+</sup> jona za katehole, sprečavajući ih da reaguju sa vodonik peroksidom i dovedu do Fentonove reakcije; ili da u prisustvu O<sub>2</sub> promovišu oksidaciju Fe<sup>2+</sup> jona u Fe<sup>3+</sup> jone, pri čemu nastaje Fe<sup>3+</sup>-katehol kompleks koji ne učestvuje u Fentonovoj reakciji. Na ovaj način se može sprečiti recikliranje Fe<sup>2+</sup> jona i inhibirati mehanizam redoks ciklusa, koji može dovesti do proizvodnje HO<sup>•</sup>. Pokazano je da oksidacija gvožđa u prisustvu katehola pripada reakciji prvog reda, što je u saglasnosti sa inhibicijom DNK oštećenja koja je posledica vezivanja Fe<sup>2+</sup> jona u prisustvu kateholnih jedinjenja koje sadrže gvožđe vezujući ostatak<sup>123</sup>. Ovo govori da je antioksidativna sposobnost katehola upravo vezana za njihov kapacitet vezivanja gvožđa.

Epi se razlikuje od proučavanih katehola po prirodi supstituisanog prstena, a stepen koordinacije i redoks osobine kompleksa upravo zavise od prirode kateholnog prstena, odnosno njegove supstituisanosti, koja je uslovljena elektrostatičkim, induktivnim, sternim interakcijama kao i hidrofobnim efektom. Interakcije Epi sa gvožđem se zato moraju posebno proučavati i posebno posmatrati u odnosu na literaturne podatke vezane za katehole<sup>12</sup>.

### 1.4.1 Fe<sup>3+</sup>-katehol kompleksi u sintezi biopolimera

Biopolimeri mogu predstavljati dobre modele za istraživanje međusobnih odnosa između strukture molekula i njegove sposobnosti umrežavanja. Posebno zanimljiva su lepljiva vlakna koja sintetišu školjke, a koja omogućavaju školjkama da se pričvrste za čvrste površine. Mehaničke i adhezivne osobine ovih biopolimera zavise od prisustva različitih intermolekulskih veza koje se stvaraju u prisustvu metala, disulfida i nekovalentnih interakcija u strukturi<sup>21</sup>. Pokazano je da kompleksi katehola sa Fe<sup>3+</sup> jonima u kutikuli školjki obezbeđuju efikasan mehanizam umrežavanja između metalnog jona i aminokiseline koja sadrži kateholnu grupu 3,4-dihidroksifenilalanin na

lancu mfp-1 proteina i na taj način stvaraju prirodni polimer<sup>22,23</sup>. Heksadentatni mononuklearni (tris-) Fe-dopa koordinacioni kompleks je predložen kao model koji formira poprečno umrežavanje i stvaranje polimera kod školjki. Formiranje bi-, kvadri- i heksadentatnih kompleksa se može indukovati i u sintetičkim materijalima podešavanjem pH vrednosti. Relativni odnosi tri koordinaciona stanja ukazuju da mono vrste dominiraju na  $\text{pH} < 5,6$ , bis vrste na  $5,6 < \text{pH} < 9,1$ , i tris vrste na  $\text{pH} > 9,1$ . Ovi rezultati su dobijeni UV/Vis apsorpcionom spektroskopijom i Ramanovom mikrospektroskopijom<sup>24</sup>. Uočena je linearna veza između redukcionog potencijala  $\text{Fe}^{3+}$ -katehol kompleksa i njihove pH nezavisne termodinamičke konstante stabilnosti. Na neutralnoj pH vrednosti vezivanje gvožđa u ovim jedinjenjima i u sintetičkim analogima se javlja primarno preko intermolekularnog biskateholnog koordinovanja<sup>124</sup>.  $\text{Fe}^{3+}$  joni pokazuju značajan uticaj na mehanička svojstva materijala. Merenja su pokazala da se nakon uklanjanja metala iz kutikule dvostruko smanjuje tvrdoća materijala, što ukazuje na značajan uticaj formiranja kompleksa na svojstva materijala. Drugim rečima, velika gustina ovih poprečno umreženih struktura je usko povezana sa tvrdoćom i velikom elastičnošću ovih polimera<sup>23</sup>.

Umrežavanje na osnovu višestrukih kompleksa metal-ligand, kao što su metal-katehol kompleksi, omogućava kovalentnu stabilnost sa nekovalentnom brzinom degradacije i formiranje mogućih unakrsnih mreža. Ovo je različito u odnosu na druge načine reverzibilnog umrežavanja zasnovanog na elektrostatičkim interakcijama, H-vezama ili hidrofobnim interakcijama<sup>24,125-127</sup>. U odsustvu mineralizacije ove interakcije obezbeđuju biološkim materijalima određen broj poželjnih mehanička svojstva, uključujući povećanu tvrdoću, adheziju, žilavost, sposobnost obnavljanja<sup>22,24</sup>.

Ukratko, proučavanje mehaničkih osobina metal-katehol koordinacije je od značaja u definisanju osobina specijalnih nemineralizovanih bioloških materijala. Jačina kompleksa zavisi od stanja koordinacije i vrste metala. Hemijska sredina znatno može uticati na stepen koordinacije, pa samim tim i na mehanička svojstva. Kohezivni integritet polimernih materijala zavisi od jačine i gustine njegovih molekularnih interakcija. Stoga je bitno razlikovati intermolekularno od intramolekularnog koordinovanja  $\text{Fe}^{3+}$  jona sa ligandom<sup>128</sup>. Ipak, ovi rezultati ne daju detaljne mehanizme formiranja biopolimera. Stoga je proučavanje mehanizma koordinacije Epi bitno za razumevanje mehanizama sinteze i razvoj biomimetičkih i sintetičkih adhezivnih polimera.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ove disertacije jeste *in vitro* opisivanje strukture Epi i njegovih kompleksa sa jonima  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  u uslovima koji su približni fiziološkim, kao i *ex vivo* opisivanje uticaja formiranja kompleksa Epi i  $\text{Fe}^{3+}$  jona na kapacitet Epi da interaguje sa adrenergičnim receptorima u kulturi ćelija. Doprinos ovog cilja se, u fiziološkom smislu, ogleda u razjašnjenju uloge Epi u (pato)fiziološkim stanjima metabolizma gvožđa i labilnog pula gvožđa, u definisanju uticaja gvožđa na ligand - Epi, kao i u hemijskom smislu pri sintezi kateholamin-bogatih polimera koji nastaju umrežavanjem pomoću koordinativnih veza između kateholnih bočnih grupa i  $\text{Fe}^{3+}$  jona.

U užem smislu ciljevi ove doktorske disertacije bili su:

- i. strukturna komparativna analiza konformacije Epi u vodi i organskom aprotičnom rastvaraču DMSO
- ii. strukturno opisivanje kompleksa Epi sa  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  jonima u uslovima bliskim fiziološkim, vodena sredina i pH 7,4, korišćenjem niza adekvatnih eksperimentalnih metoda
- iii. ispitivanje redoks reakcija Epi sa  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  jonima u vodenoj sredini na pH 7,4, u aerobnim i anaerobnim uslovima
- iv. ispitivanje efekata Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa na biološku aktivnost samog Epi preko njegovog delovanja na  $\beta$ -adrenergičke receptore.

### 3. MATERIJALI I METODE

U ovom poglavlju biće predstavljene metode i procedure koje su korišćene tokom izrade ove doktorske disertacije.

U izradi ove doktorske disertacije korišćene su hemikalije p.a. stepena čistoće: Epi (L-adrenalin, Fluka Biochemika, Buhs, Švajcarska),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Analytika, Prag, Češka Republika),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), Tris (Serva, Hajdelberg, Nemačka),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Carlo Erba Reagents, Milano, Italija), dimetil sulfoksid- $d_6$  tj. DMSO- $d_6$  (99,9% D atoma, Sigma-Aldrich), HCl (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika.);  $\text{D}_2\text{O}$  (deuterijum oksid sa 99,9% D atoma, Sigma-Aldrich).

#### 3.1 Nuklearna magnetna rezonanca (NMR)

Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*, *NMR*) je metoda koja se bazira na interakciji rezultantnog magnetnog momenta spina jezgara neke vrste atoma sa magnetnom komponentom elektromagnetnog zračenja iz radiofrekventne oblasti spektra. Magnetni moment jezgara je posledica postojanja nuklearnog spina i predstavlja fundamentalnu karakteristiku nekog naelektrisanog tela koje poseduje ugaoni moment. Rezultantni spin različit od nule imaju jezgra sa neparno-parnim, parno-neparnim i neparno-neparnim brojem nukleona (protona i neutrona). Takva su jezgra atoma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$  ili  $^{15}\text{N}$ , koja su najčešće proučavana ovom metodom<sup>129</sup>. U odsustvu magnetnog polja, sva jezgra tj. njihovi spinovi su raspoređeni podjednako u svim smerovima pa je njihov ukupan vektorski zbir jednak nuli. Kada se NMR aktivna jezgra izlože statičkom magnetnom polju (još se naziva i spoljašnje) od nekoliko T (Tesla) dolazi do polarizacije magnetnih momenata, koji se zatim raspoređuju u kvantno-mehanički dozvoljena stanja tačno određenih energija. Broj dozvoljenih spinskih stanja odnosno dozvoljenih orijentacija je dat jednačinom:

$$n = 2 \cdot I + 1$$

Jezgra sa spinskim brojem  $I = 1/2$  su najzastupljenija, imaju najveći značaj i za njih su moguće dve dozvoljene orijentacije: paralelna ( $m_i = +1/2$ ) i antiparalelna ( $m_i = -1/2$ )<sup>129</sup>.

Usled sprega magnetne i gravitacione sile nuklearni spinovi vrše precesiono kretanje oko pravca spoljašnjeg magnetnog polja frekvencijom  $\nu$ , koja se naziva Larmorova frekvencija i izražena je na sledeći način:

$$\nu = \mu \cdot \beta_N \cdot B_0 / (h \cdot I) \quad (3.1)$$

gde je  $\mu$  magnetni momenat jezgra,  $h$  Plankova konstanta,  $\beta_N$  magnetna konstanta jezgra,  $I$  spinski kvantni broj.

Magnetni moment se dalje izražava kao:

$$\mu = \gamma \cdot m_s \cdot h / 2 \cdot \pi \quad (3.2)$$

$m_s$  je magnetni spinski broj koji za spin  $I = 1/2$  ima vrednosti  $\pm 1/2$ . Žiromagnetni odnos ( $\gamma$ ) je konstanta proporcionalnosti karakteristična za svako jezgro i predstavlja odnos magnetnog i ugaonog momenta. Dat je jednačinom:

$$\gamma = 2 \cdot \pi \cdot \mu \cdot \beta_N / (h \cdot I) \quad (3.3)$$

Stoga jednačina (3.1) sada ima oblik:

$$\nu = \gamma \cdot B_0 / 2 \cdot \pi \quad (3.4)^{129,130}$$

Ključni element u mogućnosti primene ovakve vrste spektroskopije leži u činjenici da je zaposednutost nivoa sa pozitivnim i negativnim spinskim kvantnim brojem (za spin 1/2) različita. Treba reći da je razlika relativno mala, ali dovoljna za NMR fenomen. Kako energija ta dva stanja zavisi od pomenutog spinskog broja to će za jezgra različite orijentacije posedovati različitu energiju. Ona se izražava preko formule:

$$E = -\mu \cdot B_0 \quad (3.5)$$

Oдавde sledi da spinovi (jezgra) sa antiparalelnom orijentacijom ( $\beta$ ) imaju veću energiju od onih koji se orijentišu paralelno ( $\alpha$ ) u spoljašnjem magnetnom polju. Energetska razlika između ova dva nivoa data izrazom:

$$\Delta E = E_i^\beta - E_i^\alpha = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot B_0 \quad (3.6)$$

Energija jezgara sa različitim spinskim orijentacijama se može predstaviti na semiklasičan način kao broj jezgara koji se nalaze na određenom energetsom nivou. U ravnotežnom stanju, pri homogenom magnetnom polju, njihov broj je sličan ali ne i jednak, pa se shodno činjenici da se Fermi-Dirakovom statistikom predstavljaju stanja identičnih čestica sa polucelom spinom, broj jezgara sa različitim spinskom orijentacijom se može predstaviti Bolcmanovim zakonom. Tako se odnos „naseljenosti“ spinova na dva energetska nivoa može definisati kao:

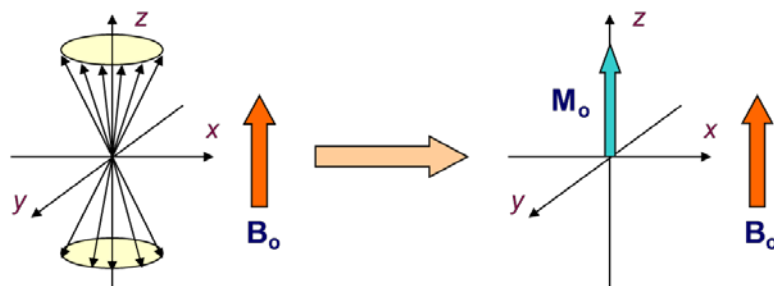
$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 + \frac{\Delta E}{kT} \quad (3.7) \text{ (Bolcmanov zakon)}$$

Kako je broj jezgara sa antiparalelnom orijentacijom manji (doduše za jako mali iznos od svega 64 na milion jezgara u prisustvu polja od 7,5 T) to težnja za uspostavljanjem jednakosti u naseljenosti može biti ispunjena apsorpcijom kvanta energije jednakog energetskej razlici između spinova koja omogućava da spinovi sa paralelnom orijentacijom pređu na viši energetski nivo. NMR spektroskopija detektuje signal koji potiče upravo od ovog malog viška. Kombinacijom jednačina (3.2) i (3.5) jasno je da je indukovana energetska razlika direktno zavisna od žiromagnetnog odnosa i spoljašnjeg magnetnog polja. Zato se jačim magnetnim poljem povećava energetska, a time i razlika u naseljenosti spinova na nivoima, što povećava osetljivost metode koja je naročito važna u detektovanju strukture i dinamike većih molekula. Ovakav efekat se eksperimentalno postiže primenom jačih magneta<sup>129</sup>.

Ipak, ništa od pomenutog nije dovoljno da bi se signal detektovao kao direktna posledica razlike u energiji među nivoima. On se u stvarnosti dobija kao posledica procesa relaksacije, odnosno vraćanja makroskopske magnetizacije u ravnotežni položaj. Makroskopska magnetizacija predstavlja vektorski zbir svih pojedinačnih magnetnih momenata jezgara istog tipa koji se nalaze u sistemu.

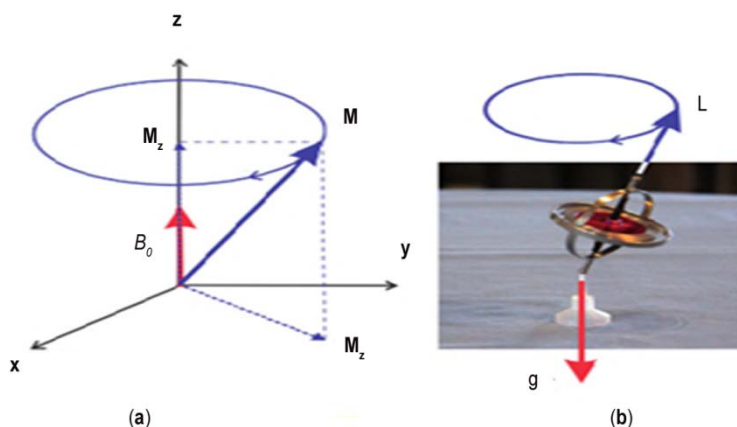
Za najjednostavniji sistem ( $I = 1/2$ ) pojedinačni magnetni momenti će zauzimati položaj tangenti na putanju kretanja vrha ovog vektora koji precesira oko ose spoljašnjeg magnetnog polja (Z osa), slika 3.1. Višak paralelno orijentisanih jezgara u ravnoteži određuje smer ukupne magnetizacije u sistemu. Normalna komponenta ovog vektora je longitudinalni vektor magnetizacije ( $\vec{M}_z$ ) nastao vektorskim zbirom normalnih komponenti svih magnetnih momenata jezgara u sistemu čiji se smer poklapa sa smerom spoljašnjeg magnetnog polja  $B_0$ . Paralelna komponenta magnetizacije, nastala vektorskim sabiranjem paralelnih komponenti pojedinačnih

magnetnih momenta, zove se transverzalni vektor magnetizacije ( $\vec{M}_{xy}$ ). U stanju ravnoteže longitudinalna magnetizacija je maksimalna, a transverzalna je jednaka nuli zbog ravnomerne raspoređenosti komponenti pojedinačnih magnetnih momenata u svim smerovima u xy ravni.



**Slika 3.1** Raspored vektora magnetnih momenata za sisteme  $I=1/2$  u spoljašnjem magnetnom polju (levo) i njihov algebarski zbir predstavljen rezultujućim vektorom magnetizacije ( $M_0$ ).

Sistem se izvodi iz ravnoteže otklanjanjem  $M_z$  od Z ose (slika 3.2). To se postiže primenom kratkih mikrotalasnih pulseva indukovanih dugim znatno slabijim, oscilujućim magnetnim poljem, čija frekvencija oscilovanja se poklapa sa Larmorovom frekvencijom. Kao posledica toga dolazi do smanjivanja longitudinalne, a povećavanja transverzalne magnetizacije. Tako pobuđeni spinski sistem vraća se u ravnotežno stanje procesima relaksacije <sup>129</sup>.



**Slika 3.2** (a) Larmorova precesija nuklearne magnetizacije u magnetnom polju (b) precesiono kretanje žiroskopa u gravitacionom polju koje je analogno Larmorovoj precesiji u magnetnom polju <sup>131</sup>.

Upravo se tokom tog procesa dobija signal koji detektuje promene u vrednosti transverzalne komponente magnetizacije,  $M_{xy}$ . Pošto je ovaj vektor maksimalan na početku relaksacije a minimalan na povratku u ravnotežu proces se zove raspad slobodne indukcije (*free induction decay*, FID). Ovaj signal se dobija postavljanjem u xy ravni detektorske zavojnice koja beleži promene napona preko struje izazvane promenljivim magnetnim poljem vektora magnetizacije koji se u vidu spirale vraća u ravnotežni položaj. Dobijeni signal zavisnosti intenziteta od frekvencije se Furijeovom transformacijom prevodi u konačan signal zavisnosti intenziteta signala od vremena.

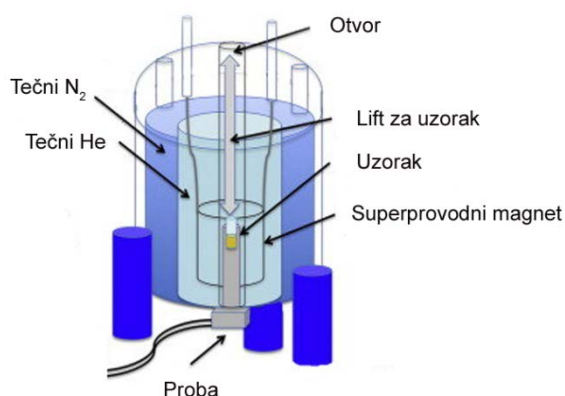
Informativnost ove metode se ogleda u činjenici da sva jezgra istog tipa ne daju isti signal u spektru, već da on zavisi od njihove hemijske i magnetne okoline. Relaksacija se odvija kroz spin-rešetka i spin-spin interakcije. Spin rešetka relaksacija predstavlja proces u kojem se višak energije predaje okolini, dok spin-spin relaksacija predstavlja izmenu energije između jezgara iste vrste koja se nalaze u različitim spinskim stanjima. Interpretacija signala u  $^1\text{H}$  NMR uključuje analizu pet osnovnih karakteristika: broja signala, hemijskog pomeranja ( $\delta$ -vrednost), konstante sprezanja ( $J$ ), integrala signala, i multipliciteta signala. Broj signala otkriva broj i tip jezgra koja se proučavaju. Hemijsko pomeranje je frekvenciono nezavisna mera koja pokazuje kako hemijska i magnetna okolina utiče na jezgra istog tipa u odnosu na standard i definisano je jednačinom:

$$\delta = (v_i - v_R)/v_0 \quad (3.8)$$

gde je  $\delta$  hemijsko pomeranje jezgra u ppm,  $v_i$  i  $v_R$  frekvencije signala ispitivanog jezgra i referentnog jedinjenja u MHz,  $v_0$  Larmorova frekvencija instrumenta u MHz.

Osim različitih položaja signala usled različite hemijske i magnetne okoline nekog jezgra, intenzitet i multipletnost signala igraju važnu ulogu u rasvetljavanju strukture nekog jedinjenja. Intenzitet je definisan brojem identičnih jezgara dok je multipletnost određen malim varijacijama magnetnog polja usled direktne (skalarnе) povezanosti jezgra sa jezgrom istog tipa, a različite okoline. Naime, kako je svako jezgro za sebe magnet ono ima magnetni moment koji je orijentisan paralelno ili antiparalelno u odnosu na spoljašnje magnetno polje. Stvarajući svoje malo magnetno polje jezgro pozitivno ili negativno utiče na magnetno polje koje oseća njegov sused, pa na taj način cepa njegov signal na dva jednaka signala minorno različitih hemijskih pomeranja. Konstanta sprežanja  $J$  je veličina koja se izražava u Hz i predstavlja rastojanje između susednih linija multipleta, a daje informaciju o blizini i jačini sprege između dva jezgra<sup>129</sup>.

Moderni NMR spektrometri koriste magnetno polje koje stvara superprovodni elektromagnet čiji su kalemovi locirani u unutrašnjem nosaču okruženom tečnim helijumom (slika 3.3). Precizna homogenost polja obezbeđuje se pomoću malih magneta tzv. „šim“ kalemova. Novi instrumenti sadrže jedinice za kontrolu temperature, za izmenu uzorka kao i koordinisanu radnu stanicu<sup>130</sup>.



**Slika 3.3** Superprovodni magnet u NMR spektrometru<sup>132</sup>.

NMR predstavlja jednu od glavnih metoda za dobijanje fizičkih, hemijskih, elektronskih i strukturalnih informacija o molekulu i/ili sistemu hemijskih reakcija. To je jedina tehnika koja može dati detaljne informacije o molekulima i njihovoj 3D strukturi i konformaciji<sup>133</sup>. Takođe, NMR spektroskopijom se mogu proučavati molekulске interakcije molekula u rastvoru<sup>134</sup>, jer NMR pruža brojne informacije o načinu formiranja intra- i intervodoničnih veza. Dužine veza, energija veza, frekvencije vibracija, gustina elektrona i druge spektroskopske osobine molekula se menjaju sa formiranjem vodoničnih veza. Hemijsko pomeranje protona prilikom stvaranja vodoničnih veza je veće od hemijskog pomeranja identičnih protona koji nisu vodonično vezani. Naime, elektroni kao naelektrisane čestice koje se kreću oko sebe stvaraju mikromagnetno polje koje se spreže sa spoljašnjim magnetnim poljem tako što se postavljaju antiparalelno u odnosu na njega čime smanjuju njegovu efektivnu vrednost. Što je veća gustina tih elektrona to je veći uticaj njihovog magnetnog polja na ukupno polje koje oseća ispitivano jezgro. U vodoničnoj vezi elektronegativniji atom odvlači elektrone iz elektronskog oblaka atoma vodonika, smanjujući njihov uticaj na efektivno magnetno polje koje oseća jezgro što za posledicu ima povećavanje magnetnog polja, a time i frekvencije i hemijskog pomeranja jezgra<sup>135,136</sup>. Samom promenom hemijskog pomeranja nije moguće razlikovati inter- i intramolekulsku vezu. Eksperimenti na



različitim temperaturama mogu dati takve informacije jer povećavanjem temperature se povećava energija potrebna za raskidanje neke veze, a prve koje su izložene takvom delovanju su intermolekularne vodonične veze. Isti efekat ima i uticaj razblaženja. Ove promene ne utiču na hemijsko pomeranje protona koji su uključeni u intramolekulske vodonične veze pošto oni slabije interaguju sa molekulima rastvarača<sup>129,136</sup>. U vodenim rastvorima dolazi do brze izmene najslabije vezanih protona molekula Epi sa molekulima vode. Ovaj problem se eksperimentalno rešava dodavanjem male količine D<sub>2</sub>O u uzorak, i na taj način signali koji potiču od grupa koje se lako izmenjuju sa vodom, XH signali, nestaju, dok ostali signali ostaju isti. U slučaju kada je izmena spora dodaje se malo kiselog katalizatora. Takođe postoji i drugi način dokazivanja ovih XH signala, i to razblaživanjem ili zagrevanjem uzorka gde će usled raskidanja H veza samo ovi signali biti pomereni prema višem polju<sup>129</sup>.

Molekulska konformacija/struktura Epi u vodi određena je intra i intermolekulskim vezama, uključujući i vodonične veze. Konformacija reguliše transport i vezivanje za receptore što direktno kontroliše biološki efekat Epi<sup>36,37</sup>. Iako eksperimentalnih podataka nema, brojne teorijske studije govore o konformaciji i vodoničnim vezama Epi u različitim rastvaračima. Poznavanje strukture molekula je veoma važno jer način koordinacije zavisi od prisustva vodoničnih veza kao i od stepena deprotonacije molekula. Ispitivana je struktura Epi u vodi kako bi se odredila kakva je struktura molekula koji učestvuje u koordinacionim i redoks interakcijama sa gvožđem. Ovo ispitivanje je relevantno iz ugla pH vrednosti, s obzirom da su pKa vrednosti Epi takve da je on isto protonovan u vodi i u puferu na pH 7,4. Međutim, ispitivanje strukture molekula u vodi, kao što je već naglašeno, samo po sebi predstavlja problem zbog izmena protona sa molekulima vode, pa se dominantni signal H<sub>2</sub>O mora prigušiti. Stoga je lakše strukturu opisati kroz komparaciju sa strukturom u aprotičnom rastvaraču – DMSO. Kako bi se eksperimentalno pokazala prava konformacija ovog biološki značajnog molekula, koji usled promene konformacije u zavisnosti od okruženja može izgubiti svoju funkciju, primenjen je niz NMR metoda: <sup>1</sup>H NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC i NOESY. Ovim metodama su detaljno ispitane i upoređene konformacije Epi u polarnom rastvaraču DMSO i u vodi.

### 3.1.1 <sup>1</sup>H NMR metoda

<sup>1</sup>H NMR korišćen je za identifikaciju protona čiji signali su razdvojeni u spektru. Tačan broj protona je utvrđen na osnovu poređenja sa površinom signala jednoznačno pripisanog određenom protonu. Primenjena je standardna pulsna sekvenca za supresiju vode.

### 3.1.2 2D NMR spektroskopija

Metode 2D NMR spektroskopije se vrlo često koriste u kombinaciji sa 1D NMR radi tačnog utvrđivanja strukture i dinamike ispitivanog molekula. Intenziteti signala su predstavljeni konturama koje su povezane sa dve frekventne ose. Na prvoj su vrednosti koje su dobijene klasičnim pobuđivanjem spinskog sistema, nakon čega magnetizacija vrši precesiono kretanje određen vremenski interval koji se menja i naziva se vreme mešanja. Nakon toga se detektuje signal na drugoj osi u zavisnosti od različitih vremena mešanja. Signal se ne dobija nakon prvog pobuđivanja sistema već tek na kraju u obliku 2D spektra sa osama zavisnim od početnog pobuđivanja magnetizacije i različitih vremena mešanja. U procesu mešanja dolazi do prenosa magnetizacije između jezgara koja su spregnuta. Spektar se pojavljuje u obliku kontura koje povezuju jezgra u interakciji. Detektovani signali su dijagonalni i nedijagonalni. Dijagonalni signali se ne uzimaju u obzir jer tokom mešanja nije došlo do promene frekvencije tj. transfera, dok nedijagonalni signali daju informacije o međusobnim interakcijama<sup>136</sup>.

### 3.1.2.1 COSY metoda

COSY metoda (*correlation spectroscopy*) je vrsta 2D NMR spektroskopije koja se koristi za identifikaciju protona na osnovu informacija o njihovom međusobnom skalarnom sprežanju, najčešće kroz dve ili tri hemijske veze. U COSY dolazi do homonuklearne interakcije skalarnim ili direktnim sprežanjem kroz veze. Intenzitet signala opada sa povećavanjem broja veza<sup>136</sup>. U ovom slučaju primenjena je *cosygpmpfqf* pulsna sekvenca.

### 3.1.2.2 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC metoda

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC metoda (*heteronuclear single quantum coherence*) predstavlja dvodimenzionalnu heteronuklearnu tehniku koja se koristi za identifikaciju azotovih atoma koji su direktno vezani za protone. Vrlo je pogodna u slučajevima kada usled hemijske izmene dolazi do gubitka informacija o protonu ili grupi kojoj pripada određeni proton. Ovo je metoda koja je naročito zastupljena u ispitivanju većih molekula ili kao deo jedne šire pulsne sekvence<sup>136</sup>. Primenjena je *hsqcetgp* pulsna sekvenca.

### 3.1.2.3 NOESY metoda

NOESY metoda (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*) zasniva se na prenosu magnetizacije kroz prostor tj. između prostorno bliskih spin-aktivnih jezgara usled dipolarne interakcije. Ova metoda objašnjena je nuklearnim Overhauserovim efektom (NOE efekat) koji je zasnovan na dipol-dipol interakciji kroz prostor. Naime, intenzitet nekog signala je određen razlikom u naseljenosti između energetske nivoa. Ako pretpostavimo da postoje dva jezgra istog tipa koja nisu direktno spregnuta, tada se primenom produkata operatora i algebarskim transformacijama dobija da brzina promene orijentacije nekog spina jednog jezgra zavisi ne samo od razlike u naseljenosti u ravnotežnom stanju toga spina već i spina drugog jezgra, kao i dvospinske razlike u naseljenosti u kojoj spinovi oba jezgra istovremeno imaju iste orijentacije. Drugim rečima, ponašanje magnetizacije jednog jezgra zavisi od toga šta se dešava sa drugim jezgrom. Ovaj proces se zove kros-relaksacija. Brzina odigravanja kros-relaksacije kao i razlika u naseljenosti drugog jezgra uzrokuju promenu u intenzitetu signala prvog jezgra u spektru. Ovaj fenomen se naziva NOE i leži u osnovi NOESY 2D spektroskopije. Brzina kros-relaksacije je parametar koji je definisan dipolarnom relaksacijom između dva jezgra, koja je strogo zavisna od prostornog rastojanja među njima. Stoga je NOE efekat moguće detektovati samo u slučaju ako se ova jezgra nalaze na rastojanjima do 4,5 Å, i taj podatak pomaže u određivanju 3D strukture ispitivanog uzorka<sup>129,136</sup>.

## 3.1.3 Eksperimentalni deo

Konformacija Epi u rastvoru određena je korišćenjem NMR spektroskopije. Svi NMR spektri, jednodimenzionalni ( $^1\text{H}$ ) i dvodimenzionalni (COSY, HSQC i NOESY), dobijeni su korišćenjem Bruker AVANCE III 500 spektrometra na frekvenciji od 500,26 MHz za  $^1\text{H}$  i 50,69 MHz za  $^{15}\text{N}$ . Kao referentni signal korišćen je signal  $^2\text{H}$ . Spektri su snimani pri temperaturi od 298 K, osim ako nije drugačije naznačeno.

Eksperimenti na različitim temperaturama su kontrolisani i nadgledani pomoću jedinice za kontrolu temperature. Grejanje i hlađenje uzorka je vršeno u koracima od 10 K, a spektri su snimani na stabilnoj temperaturi ( $\pm 0,1$  K). Zagrejani uzorci su snimani na temperaturama od 298 K do 388 K, što je označeno kao kritična temperatura ( $T_c$ ) i predstavlja temperaturu na kojoj je došlo do raspada Epi, dok je hlađenje uzoraka vršeno na temperaturama od 298 K do 278 K. Hemijska pomeranja ( $\delta$ ) su izražena u ppm, a konstante sprežanja ( $J$ ) u Hz. Intenziteti signala su dobijeni

integraljenjem i normalizovani su prema CH<sub>3</sub> grupi. Atom-atom rastojanja ( $r$ ) su računata korišćenjem intenziteta signala iz <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY spektra ( $I$ ) Epi u DMSO i jednačine  $I_1/I_2 = r_1^{-6}/r_2^{-6}$ , gde  $I_1$  i  $r_1$  predstavljaju vrednosti za H3-H4, koji su korišćeni kao referenca. Za rastojanje H3-H4 je usvojeno da iznosi 2,623 Å, a izračunata je korišćenjem standardne dužine H-C veze (1,1 Å) i C-C veze (1,523 Å) u prstenu, kao i ugla H-C-C veze od 120°.

Svakog dana je pravljen svež osnovni rastvor Epi koncentracije 10 mM. Epi je rastvaran u D<sub>2</sub>O (99,9%) ili vodi sa 10% D<sub>2</sub>O uz dodatak 20 mM hlorovodonične kiseline. Osnovni rastvor Epi (50 mM) u DMSO-*d*<sub>6</sub> je pripreman sa dodatkom 68 mM HCl (3 µL rastvora 35% HCl je dodavano uzorku od 500 µL; konačna koncentracija vode u štok rastvoru je iznosila 240 mM). U eksperimentima sa povećanim udelom vode u deuterisanom DMSO koncentracija Epi je iznosila 50 mM (za 0,6% vode), 47,4 mM (5,1% vode), 41,1 mM (17,4% vode), 34,9 mM (30,2% vode) i 25 mM (50% vode).

## 3.2 UV/Vis spektroskopija

Spektroskopije, uopšte, su metode koje proučavaju interakcije elektromagnetnog zračenja sa materijom. Spektroskopske metode mogu biti bazirane na različitim principima: emisije, apsorpcije, fluorescencije ili rasejavanja. Ove metode se koriste za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka <sup>137</sup>.

Kod UV/Vis spektroskopije uzorak apsorbuje elektromagnetno zračenje u oblasti između 200 nm i 800 nm zato što u toj oblasti dolazi do elektronskih prelaza u uzorku. Pomenuti opseg elektromagnetnog spektra deli se na dve oblasti: ultraljubičastu (200 nm do 400 nm) i vidljivu oblast (400 nm do 800 nm). Za pobuđivanje elektrona i njihov prelazak iz osnovnog u pobuđeno stanje potrebna je energija zračenja koja se nalazi između 600 kJ/mol i 150 kJ/mol. Ova vrsta spektroskopije se naziva i elektronska spektroskopija, jer elektroni apsorbuju ovo zračenje. Intenzitet apsorpcije kod UV/Vis spektroskopije definisan je Lamber-Berovim (*Lambert-Beer*) zakonom:

$$A = \log_{10}(I_0/I) = c \cdot d \cdot \varepsilon \quad (3.9)$$

gde je  $I_0$  intenzitet upadnog zraka,  $I$  intenzitet zraka po prolasku kroz uzorak,  $c$  koncentracija u mol/L,  $d$  dužina putanje zraka kroz uzorak u cm,  $\varepsilon$  molarna apsorptivnost,  $A$  apsorpcija <sup>129</sup>.

UV/Vis spektroskopija je korisna metoda za identifikaciju metal-ligand kompleksa zahvaljujući jedinstvenim  $d-d$  prelazima u njima, prenosu naelektrisanja i ligand baziranim prelazima za različite jone metala <sup>138</sup>. Formiranje koordinativnih veza dovodi do cepanja  $d$  orbitala metala na orbitale više energije i orbitale niže energije. Za većinu liganada, uključujući katehole, razlika u energiji odgovara talasnoj dužini vidljive oblasti UV/Vis spektra <sup>114</sup>. Saglasno sa tim, UV/Vis spektroskopija predstavlja metodu izbora za ispitivanje formiranja Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksa.

### 3.2.1 Eksperimentalni deo

UV/Vis apsorpcioni spektri su snimljeni pomoću 2501 PC Shimadzu spektrofotometra, koji sadrži jedinicu za temperaturnu kontrolu. Zapremina uzorka je bila 1 mL. Vreme skeniranja 50 s. Uzorci su sveže pripremani. Neposredno nakon pripreme vršeno je snimanje elektronskih apsorpcionih spektara u oblasti od 200 nm do 800 nm. Promene u spektru su praćene tokom 30 minuta, snimanjem spektra na svakih 5 minuta.

Interakcije Epi sa Fe<sup>3+</sup> i Fe<sup>2+</sup> jonima ispitivane su UV/Vis spektroskopijom, pri čemu je korišćen 0,2 mM Epi i različite koncentracije rastvora FeCl<sub>3</sub> (0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM i 0,4 mM) i FeSO<sub>4</sub> (0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM i 0,4 mM). Epi je rastvoren u 10 mM Tris puferu pH 7,4, nakon čega je držan na ledu i u mraku. Njegova stabilnost je proveravana svakih sat vremena. Zbog

oksidacije  $\text{Fe}^{2+}$  jona u  $\text{Fe}^{3+}$  jone na fiziološkoj pH vrednosti, osnovni rastvor gvožđa (40 mM) od koga su pravljena dalja razblaženja napravljen je u dejonizovanoj vodi koja je imala pH oko 5. Inkubacija i merenja su vršena u mraku i na 293 K. Uzorci su uvek pripremani u finalnoj zapremini od 1 mL u kiveti dimenzija 1 cm x 1 cm x 5 cm, nakon čega su snimani tokom 30 minuta.

Za eksperimente izvedene u anaerobnim uslovima, uzorci su pripremani u komori koja sadrži argon (Dry Box, Plas-Lab, Lansing, Mičigen, SAD) i pakovani u kivete koje su onda čvrsto zatvorene teflonskim čepom. Prethodno je komora dobro očišćena Ar i svi rastvori su barbutirani istim gasom da bi se uklonili tragovi  $\text{O}_2$  i na taj način sprečila oksidaciona lančana reakcija Epi. Epi je rastvoren u 100 mM Tris-u pH 7,4. Za ova merenja korišćene su sledeće koncentracije rastvora: 0,2 mM Epi, 0,2 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , 0,2 mM  $\text{Fe}^{3+}$ .

Kinetika formiranja Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa u aerobnim uslovima praćena je merenjem apsorbanca na 545 nm u sledećim sistemima: 0,2 mM/0,2 mM Epi/ $\text{Fe}^{2+}$ , i 0,2 mM/0,2 mM Epi/ $\text{Fe}^{3+}$ . Pored toga, praćena je oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  jona merenjem apsorbanca na 350 nm, jer predstavlja optimalnu talasnu dužinu na kojoj ne apsorbuju ni Epi ni Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleks. Brzine formiranja kompleksa i oksidacije  $\text{Fe}^{2+}$  jona utvrđene su eksponencijalnim fitovanjem i grafičkim proračunom brzine.

### 3.3 Elektronska paramagnetna rezonanca (EPR)

Elektronska paramagnetna rezonanca (EPR) je metoda koja se koristi za određivanje elektronske strukture molekula. Metoda se zasniva na merenju magnetizma nesparenih elektrona u spoljašnjem magnetnom polju. U ovoj vrsti spektroskopije magnetizam elektrona nastaje ukoliko su nespareni elektroni izloženi sledećim interakcijama: (i) interakciji sa statičkim magnetnim poljem gustine fluksa  $B$ ; (ii) interakciji sa termičkim okruženjem; i (iii) interakciji sa monohromatskim zračenjem čija je frekvencija  $\nu$  u mikrotalasnom opsegu. Ove tri interakcije se nazivaju Zemanova interakcija, spin-rešetka relaksacija i elektronska paramagnetna rezonanca, respektivno.

Zbog svojih kvantno-mehaničkih osobina nespareni elektron ima tačno dva energetska stabilna stanja pri Zemanovoj interakciji. Kada se nespareni elektron posmatra kao minijaturni šipkasti magnet ta dva energetska stabilna stanja odgovaraju paralelnoj i antiparalelnoj orijentaciji u spoljašnjem magnetnom polju. U odsustvu spoljašnjeg magnetnog polja tj. u „nultom“ magnetnom polju ova dva stanja su degenerisana. Kada se primeni spoljašnje magnetno polje elektron ima najnižu energiju pri antiparalelnoj orijentaciji tj. u osnovnom stanju. Da bi nespareni elektron prešao iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje potrebno je da apsorbuje energiju  $h \cdot \nu$  koja je tačno jednaka Zemanovoj energetska razlici između energetska stabilnih stanja  $h \cdot \nu = g_e \cdot \beta \cdot B$ , gde su  $h$  i  $\beta$  fundamentalne konstante, a  $g_e = 2,00232$  bezdimenziona konstanta proporcionalnosti.

Dakle važi sledeće:  $g_e = (h/\beta) \cdot (\nu/B)$  odnosno  $2,00232 = 0,714484 \cdot \nu[\text{MHz}]/B[\text{Gaus}]$ . Za 9,5 GHz, tj. najčešće korišćenu frekvenciju izvora mikrotalasnog zračenja u EPR spektroskopiji, rezonantna gustina fluksa  $B$  za nesparene elektrone iznosi 0,33899 T. Ova vrednost gustine fluksa se može postići korišćenjem elektromagneta čije karakteristike nisu zahtevne.

Kada je nespareni elektron vezan za molekul on orbitira oko jednog ili više pozitivno naelektrisanih jezgara, pa će stoga biti pod uticajem unutrašnjeg magnetnog polja molekula. Ukoliko se takav elektron izloži spoljašnjem magnetnom polju, usled unutrašnjeg magnetnog polja molekula dolazi do promene  $g$ -vrednosti tj. konstante proporcionalnosti:  $h \cdot \nu = (g_e + \Delta g) \cdot \beta \cdot B_0$  tj.  $h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot B_0$ . Promena  $g$ -vrednosti nosi hemijsku informaciju o molekulskoj strukturi. Ukoliko se primenjuje fiksna frekvencija mikrotalasnog zračenja, nespareni elektron koji je vezan za molekul će zbog promene  $g$ -vrednosti imati rezonantnu apsorpciju mikrotalasa pri drugačijoj vrednosti  $B$  u odnosu na nespareni elektron koji nije vezan za molekul.

Zavisnost apsorpcije mikrotalasa od spoljašnjeg magnetnog polja predstavlja spektar elektronske paramagnetne rezonance tj. EPR spektar. EPR spektar se dodatno usložnjava zbog

sledećih uticaja: (i) Zemanove energije, tj.  $g\beta B$ , koja je funkcija orijentisanosti nesferičnog molekula u spoljašnjem magnetnom polju, pa praktično mogu postojati  $g$ -vrednosti za sve tri ose trodimenzionalnog prostora tj.  $g_x$ ,  $g_y$  i  $g_z$  vrednosti; (ii) interakcije posmatranog elektrona sa drugim elektronima u molekulu ili okolnim molekulima; (iii) interakcije posmatranog elektrona sa namagnetisanim jezgrima u molekulu. Ovi uticaji se nazivaju  $g$ -anizotropija, interakcija nultog polja i hiperfina interakcija, respektivno. Svi ovi uticaji zapravo predstavljaju hemijske informacije koje se mogu videti na EPR spektru <sup>139</sup>.

Detekcija EPR spektra je moguća jedino ukoliko se mikrotalasna radijacija može apsorbovati usled postojanja konačne razlike u naseljenosti uzorka nesparenim elektronima u osnovnom i nesparenim elektronima u pobuđenom energetskom stanju, što je definisano Bolcmanovom raspodelom <sup>140</sup>.

Princip rada EPR spektrometra opisan je u sledećem delu. Mikrotaladni most je izvor mikrotalasa na fiksnoj frekvenciji i pri odabranoj snazi. Frekvencija mikrotalasa predstavlja parametar koji je podesiv u ograničenom opsegu frekvencija. Kao izvor mikrotalasa se koristi Ganova dioda. Ukoliko je potrebno napraviti EPR spektre pri različitim frekvencijama onda se mora koristiti širok opseg različitih izvora mikrotalasa. Mikrotalasi se vode do komore za uzorke pomoću talasovoda. Komora za uzorke je deo uređaja u kome se uzorak ozračuje mikrotaladnom energijom. Zatim se komora za uzorke stavlja normalno na magnetno polje  $B_0$  čiji se parametri mogu kontrolisano menjati. Magnetno polje  $B_0$  se generiše pomoću elektromagneta i treba da bude što preciznije i što homogenije. Osim glavnog magnetnog polja u komori se superponira i slabije, ali oscilirajuće magnetno polje, koje se stvara i kontrolisano menja pomoću modulacionih namotaja. Signal iz komore je modulisan frekvencijom oscilirajućeg magnetnog polja. Ono što se detektuje predstavlja prvi izvod EPR spektra. Za izvođenje EPR eksperimenta najbolje bi bilo primeniti fiksno magnetno polje, a varirati frekvenciju mikrotalasa. Međutim, izvori mikrotalasa imaju frekvenciju podesivu samo u relativno uskom opsegu. Zato se frekvencija mikrotalasa drži konstantnom, a varira se magnetno polje u opsegu u kome se očekuje apsorpcija mikrotalasa. Pri apsorpciji mikrotalasa detektuju se promene intenziteta reflektovane mikrotaladne energije. Dobijeni signal se amplifikuje, snima i skladišti za dalju obradu <sup>141</sup>.

### **3.3.1 EPR spektroskopija na niskim temperaturama**

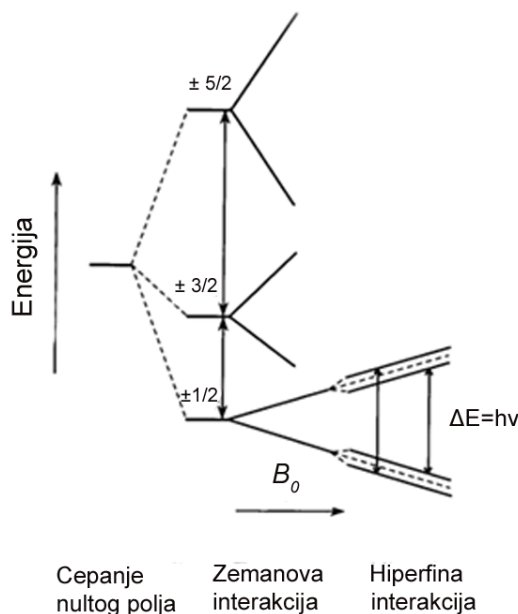
Ova metoda se najčešće koristi kod proučavanja prelaznih metala. Sa snižavanjem apsolutne temperature uzorka dolazi i do smanjenja brzine spin-rešetka relaksacije, što za posledicu ima produžavanje poluživota elektrona u pobuđenom stanju, što čini da se mogu detektovati vrste koje se brzo relaksiraju. Međutim, poboljšanje rezolucije EPR spektra sa snižavanjem temperature je ograničeno temperaturno-nezavisnim procesom koji se naziva nehomogeno širenje. Naime, molekuli za koje se vezuju posmatrani elektroni imaju statističku raspodelu konformacija u uzorku. Svaki molekul ima malčice drugačiju 3D strukturu, stoga i drugačiju  $g$ -vrednost, pa dolazi do kontinualnog širenja linija EPR spektra. Tečni azot i tečni helijum se najčešće koriste kao sredstva za hlađenje <sup>140</sup>.

### **3.3.2 Magnetne osobine gvožđa**

Za biološke sisteme su relevantna dva oksidaciona stanja gvožđa:  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ . Neparan broj nesparenih elektrona poseduju  $Fe^{3+}$  joni tako da se oni lako mogu proučavati EPR metodom na niskim temperaturama. Detekcija  $Fe^{2+}$  moguća je posebnom metodom EPR-a (EPR paralelni modus). Na EPR spektar najveći uticaj ima spinsko stanje gvožđa.  $d$ -Elektroni, od kojih svaki ima spin  $S = 1/2$ , raspoređeni su duž pet orbitala. Za gvožđe elektroni dolaze iz 3d i 4s orbitale, ima ih 5, i raspoređuju se u pet 3d orbitala, ali im je na raspolaganju i 4s orbitala. Zbog elektrostatičkog odbijanja postoji tendencija da zauzmu različite orbitale i na taj način formiraju visokospinsko

stanje, tako bi za  $\text{Fe}^{3+}$  svaki od pet elektrona zauzimao drugačije orbitale. U tom slučaju ukupni spin iznosi  $S = 5/2$ . Za  $\text{Fe}^{2+}$  jone, dva od šest elektrona su uparena, dajući ukupni spin  $S = 2$ . Međutim, interakcije sa ligandnim poljem dovode do cepanja d nivoa i u slučaju da je ligandno polje dovoljno jako elektroni će zauzeti nivoe niže energije. U tom slučaju  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  joni su niskospinski i imaju ukupan spin  $S = 1/2$  i  $S = 0$ , respektivno.

Cepanje ligandnog polja zavisi od vrste liganda i njihove geometrije. Gvožđe čija je geometrija tetraedarska uvek je visokospinsko, za razliku od oktaedarske geometrije u kojoj gvožđe može biti visokospinsko i niskospinsko u zavisnosti od prirode aksijalnih liganda.  $\text{Fe}^{3+}$  jon može imati tri spinska stanja,  $S = \pm 1/2$ ,  $S = \pm 3/2$  i  $S = \pm 5/2$ , u zavisnosti od nivoa cepanja nultog polja i temperature, slika 3.4<sup>142</sup>.



**Slika 3.4** Ilustracija efekta cepanja energetskih nivoa pod uticajem magnetnog polja nesparenog elektrona kod visokospinskog  $\text{Fe}^{3+}$ . Hiperfine interakcije su mnogo manje (10 MHz) u poređenju sa Zemanovom interakcijom (9 GHz kod X opsega) ili cepanjem nultog polja (300 GHz kod  $\text{Fe}^{3+}$  proteina)<sup>142</sup>.

### 3.3.3 EPR metoda sa spinskim hvatačem

Slobodni radikali koji su kratkoživeće vrste (vreme poluživota ispod 10 s) se ne mogu direktno detektovati EPR spektroskopijom zbog vremenskog ograničenja metode. U ovakve slobodne radikale spada većina biološki relevantnih radikala, kao što su  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , i dr. Ipak, oni se mogu detektovati primenom spinskih hvatača (*spin traps*) koji reaguju sa kratkoživećim radikalom i daju spinski adukt – dugoživeću paramagnetnu vrstu čija struktura i EPR spektar zavise od radikala sa kojim je spinski hvatač reagovao. Lako se mogu detektovati pomoću EPR metode sa spinskim hvatačem, pri čemu nastaju različiti spinski adukti koji se mogu razlikovati zbog velike osetljivosti metode. Količina spinskih adukta zavisi od koncentracije specifičnih radikala u sistemu i proporcionalna je intenzitetu signala. DEPMPO je među najboljim spinskim hvatačima za *in vitro* detekciju O-, N-, S- i C-centriranih slobodnih radikala, zahvaljujući kompleksnom i informativnom spektru i dovoljnoj dužini života spinskih adukta<sup>143</sup>.

### 3.3.4 Eksperimentalni deo

Eksperimentalna merenja na sobnoj temperaturi vršena su na Varian E104-A EPR spektrometru, sa X-opsegom (9,53 GHz) i sledećim podešavanjima: amplitudna modulacija,

0,2 mT; frekventna modulacija, 100 kHz; snaga mikrotalasa, 20 mW; vremenska konstanta, 32 ms; vreme skeniranja, 2 minuta. Snimanja su vršena nakon 5 minuta inkubacije. Konstantni nivo O<sub>2</sub> u uzorcima postignut je njihovim pakovanjem u gas-propusne teflonske kapilare duge 10 cm (Zeus Industries, Raritan, Nju Džerzi, SAD).

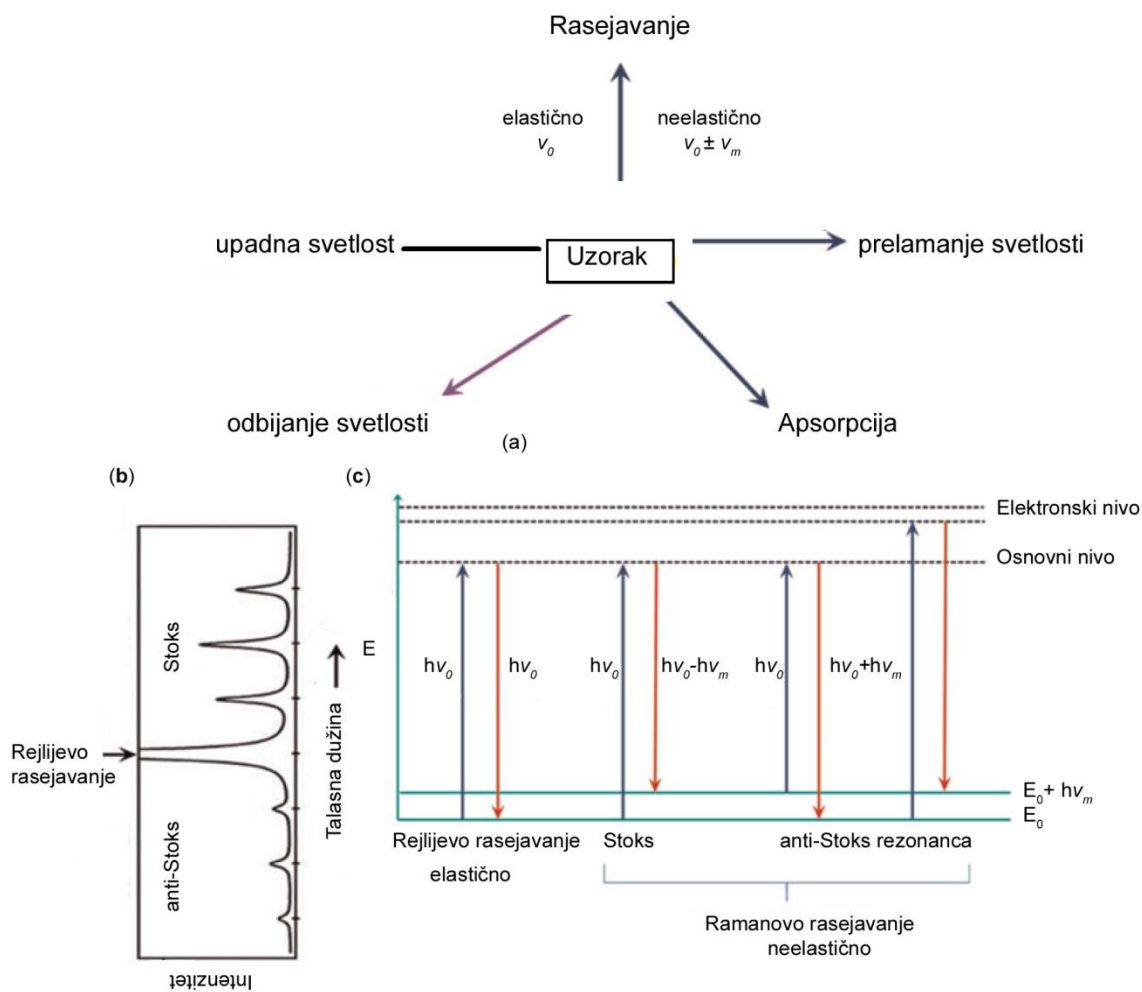
Eksperimenti korišćenjem EPR metode spregnute sa spinskim hvatačem rađeni su sa DEPMPO spinskim hvatačem (Enzo Life Sciences, Farmingdejl, Nju Jork, SAD) finalne koncentracije 5 mM. Hidroksil radikal je generisan u Fentonovoj reakciji: Fe<sup>2+</sup> (0,4 mM) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,2 mM). Zapremina finalnih uzoraka iznosila je 60 μL. Spektri su dobijeni nakon 5 minuta inkubacije uzoraka.

Intenzitet signala DEPMPO spin-adukta sa HO<sup>•</sup> radikalom određen je preko spektralne simulacije pomoću programa WINEPR SimFonia (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Darmštadt, Nemačka). Za određivanje signala DEPMPO/OH korišćeni su sledeći parametri simulacije:  $a_N = 1,40$  mT,  $a_H = 1,32$  mT,  $a_{H\gamma} = 0,03$  mT (3 H),  $a_P = 4,73$  mT; a za određivanje signala DEPMPO/C:  $a_N = 1,44$  mT,  $a_H = 2,15$  mT,  $a_P = 4,63$  mT.

Niskotemperaturni EPR spektar Fe<sup>3+</sup> jona je praćen na Bruker Elexsys II E540 sa X opsegom pri 9,4 GHz. Merenja na 100 K su rađena korišćenjem Bruker N2 Temperature Controller ER4131VT. Merenja na 20 K su izvršena korišćenjem Oxford Instruments ESR900 helium cryostat. Korišćeni su sledeći eksperimentalni parametri: snaga mikrotalasa, 3,2 mW; vreme skeniranja, 80 s; amplitudna modulacija, 0,5 mT; frekventna modulacija, 100 kHz; broj akumulacija, 4 (na 100 K) i broj akumulacija 2 (na 20 K). Na obe temperature signal amplitude u odnosu na snagu je izrađen da bi se odredila maksimalna vrednost snage. Primenjena je približno polovina maksimalne snage kako bi se izbegla saturacija. Svi spektri su korigovani u odnosu na baznu liniju. Uzorci su spremeni u finalnoj zapremini od 200 μL i smeštani u kvarcne kivete (Wilma-Lab Glass, Vajnland, Nju Džerzi, SAD) nakon 1 minuta inkubacionog perioda (Fe<sup>2+</sup>) ili 15 minuta inkubacionog perioda (Fe<sup>3+</sup>), a nakon toga brzo zamrzavani u hladnom izopentanu, i zatim u hladnom tečnom azotu.

### 3.4 Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija je jedna od dve vrste elektronske spektroskopije kojom se ispituje struktura molekula na osnovu karakteristika prelaza između vibracionih nivoa osnovnog elektronskog stanja molekula<sup>144</sup>. Sam princip Ramanove spektroskopije je baziran na promeni polarizabilnosti atoma i grupa molekula koji se ispituju. Kada se molekul nađe u električnom polju tada ono uzrokuje deformaciju rasporeda naelektrisanja u elektronskom oblaku molekula što indukuje pojavu ili promenu dipolnog momenta koja je proporcionalna jačini električnog polja i konstanti, koja se zove polarizabilnost. Polarizabilnost je fizička veličina koja ima dimenzije zapremine i numerički je vezana za veličinu molekula, a reflektuje stepen mogućnosti deformacije elektronskog oblaka u odnosu na jezgro nekog atoma. To je anizotropna veličina tako da je pomeranje elektrona u odnosu na jezgro pod dejstvom polja lakše u pojedinim pravcima. Ova deformacija je takođe veća ukoliko se pravac polja poklapa sa pravcem indukovanog dipolnog momenta, a najmanja je kada je vektor dipolnog momenta normalan na pravac električnog polja. Kako su molekuli koji se ispituju izloženi monohromatskom zračenju, električna komponenta elektromagnetnog talasa indukuje oscilujući dipol sa dipolnim momentom koji se u vremenu menja prema sinusnom zakonu. Prema zakonima klasične elektrodinamike taj oscilujući dipol emituje zračenje iste frekvencije Rejljevo (*Rayleigh*) ili zračenje nešto niže (Stoksovo) tj. nešto više frekvencije (anti-Stoksovo rasejanje). Ramanovi spektri nastaju kao posledica apsorpcije zračenja tj. kao Stoksove linije, za šta obrazloženje daje kvantna mehanika, slika 3.5<sup>145,146</sup>.



**Slika 3.5** Principi Ramanove spektroskopije. (a) Mehanizam rasejavanja; (b) Rejljevo, Stoksovo i anti-Stoksovo rasejavanje u Ramanovom spektru; energije prelaza u Ramanovom spektru <sup>146</sup>.

Naime, sa kvantnog stanovišta jezgro u atomu se u osnovnom stanju može naći na nekom od vibracionih nivoa čije energije su tačno određene. Prilikom interakcije sa monohromatskim zračenjem energija koju apsorbuje molekul menja njegovu unutrašnju energiju i reda je veličine energetske razlike vibracionih nivoa. Veći deo energije upadnog talasa se reflektuje kao odbojni zrak što uzrokuje promenu frekvencije odbojnog zraka za deo koji odgovara energetskej razlici između vibracionih nivoa. Emitovanjem zračenja koji odgovara toj razlici jezgro ponovo biva spremno da prihvati deo zračenja kroz interakciju sa električnom komponentom elektromagnetnog zračenja. Prema klasičnoj elektrodinamici intenzitet apsorpcije i emisije tj. Stoksovog i anti-Stoksovog zračenja je isti, međutim, prema kvantnomehantičkim zakonima da bi došlo do emisije zračenja molekul mora biti na nekom od pobuđenih vibracionih nivoa. Kako je prema Bolcmanovoj raspodeli veća verovatnoća da se molekul nađe na osnovnom vibracionom nivou to je i proces apsorpcije verovatniji a samim tim i pojava Stoksovih linija u spektru <sup>145</sup>.

Za pobuđivanje sistema se koriste laserski izvori svetlosti iz vidljivog spektra zračenja, a kako je razlika među vibracionim nivoima jezgara reda veličine do  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , to je i detektovani signal iz oblasti vidljivog dela spektra elektromagnetnog zračenja. Informacije vezane za strukturu ispitivanog molekula dobijaju se u vidu razlike u talasnim dužinama upadnog i odbojnog zračenja i predstavljaju se u talasnim brojevima kao Ramanovo pomeranje <sup>145</sup>.

Stoga se Ramanovi spektri mogu pratiti u opsegu od  $4000 \text{ cm}^{-1}$  do  $10 \text{ cm}^{-1}$ . Organski molekuli obično vibriraju u oblasti od  $4000 \text{ cm}^{-1}$  do  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Čest problem u primeni Ramanove spektroskopije predstavlja slab intenzitet traka Raman-aktivnih jedinjenja. Jedno od najčešćih rešenja je upotreba lasera talasne dužine slične onoj na kojoj se dešavaju apsorpcioni prelazi



molekula koji se ispituju čime se dobija rezonantno pojačavanje intenziteta linija za oko 100 puta. Ova vrsta Ramanove spektroskopije zove se Rezonantna Ramanova spektroskopija. Princip pojačavanja intenziteta pojedinih signala se zasniva na Frank-Kondonovom principu. Zbog jako male mase elektrona u odnosu na jezgro, elektronski prelazi se dešavaju za dva reda veličine brže te se u tom procesu jezgra mogu smatrati kao nepomična. Stoga se prelaz vrši sa osnovnog nivoa vibracionog stanja elektronskog osnovnog stanja na pobuđeni vibracioni nivo pobuđenog elektronskog stanja. Prelaz će se izvršiti na onaj vibracioni nivo čija se talasna funkcija poklapa sa talasnom funkcijom osnovnog nivoa u blizini, po principu vertikalnosti tj. bez promene položaja jezgra. U tom procesu međutim dolazi do promene konformacije molekula<sup>145</sup>. Pokazano je da postoji tesna korelacija između deformacije molekula prelaskom na pobuđeni nivo i tipa vibracije Ramanovih traka<sup>147</sup>. Ovaj efekat potiče od uticaja parametra koji figurira u izrazu za tenzor polarizabilnosti kao funkcija položaja potencijalnih minimuma osnovnog i pobuđenog elektronskog stanja tokom vertikalnog prelaza između vibracionih nivoa. Hemijske i strukturne informacije biološki značajnih jedinjenja kao što su metaloporfirini, kateholi, karetonidi i dr. se mogu detaljno ispitivati ovom metodom.

Spektrofotometar namenjen za Ramanovu spektroskopiju se sastoji od četiri osnovne komponente: izvora laserske svetlosti, fiber-optičke Ramanove sonde, spektrografa i CCD (*charge-coupled device*) senzora. Uzorak se osvetljava laserskim snopom talasnih dužina vidljivog opsega (Vis) ili talasnih dužina blisko infracrvenog (NIR) područja. Optička konvergencija zraka se dobija korišćenjem sočiva i analizira spektrofotometrom radi dobijanja Ramanovog spektra uzorka. Ramanovi spektrometri mogu biti dispergovani ili nedispergovani. Dispergovani spektrofotometri koriste prizmu ili rešetku, dok nedispergovani koriste interferometar kao što je Mihaelsonov interferometar u Furijeovoj transformaciji<sup>146</sup>.

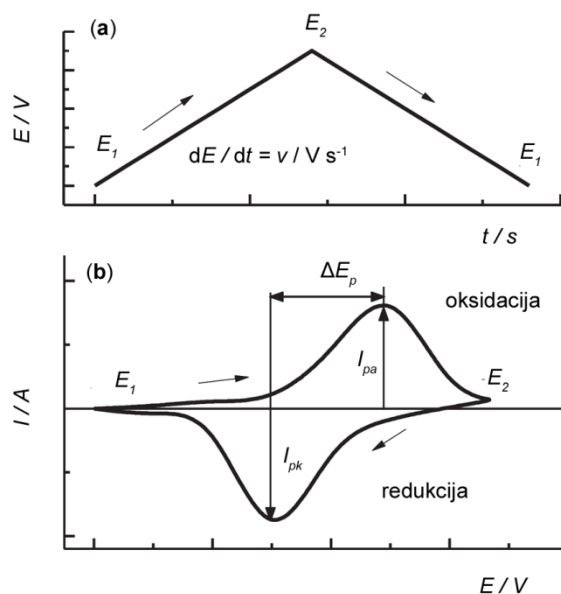
Najčešće se koristi laser talasne dužine 532 nm. Takođe se radi izbegavanja autofluorescencije koriste laseri većih talasnih dužina, npr. 785 nm. Korišćenje lasera kraćih talasnih dužina (opsega vidljive svetlosti) je takođe prednost, osvetljavajući uzorak svetlošću jačeg intenziteta, stvarajući veći i moćniji signal Ramanove spektroskopije u kraćem periodu vremena<sup>145</sup>.

### 3.4.1 Eksperimentalni deo

Ramanovi spektri su dobijeni korišćenjem DXR Raman mikroskopa (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD). Alikvoti od 5  $\mu$ L rastvora su stavljani na ploče od kalcijum fluorida i fokusirani pod mikroskopom. Korišćeno je uvećanje objektiva od 50 puta. Za snimanje spektra je korišćen laser od 532 nm, sa konstantnom snagom osvetljenja od 10 mW. Ova talasna dužina odgovara energijama elektronskih prelaza jedinjenja Epi i  $\text{Fe}^{3+}$  jona, što omogućava veći intenzitet i bolji odnos signal-šum neophodan za detektovanje slabijih linija u spektru. To se naročito odnosi na trake nastale vibracijama atoma direktnih učesnika veze između  $\text{Fe}^{3+}$  jona i Epi. Vreme snimanja je 30 s, sa 10 ponavljanja. Prečnik laserskog zraka iznosio je 1  $\mu$ m. Rasejana svetlost je analizirana pomoću spektrografa gustine 900 linija po mm, korišćenjem proreza od 50  $\mu$ m kao spektrografskog otvora. U slučaju visoke fluorescencije automatsko gašenje fluorescencije je vršeno pomoću OMNIC softvera (Thermo Fisher Scientific). Osnovni rastvor Epi (0,2 mM) napravljen je u 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  puferu, pH 7,4. Rastvor je čuvan na ledu i u mraku. 100 mM rastvor  $\text{FeCl}_3$  napravljen je u dejonizovanoj vodi i korišćen za odgovarajuća razblaženja. Snimani su sledeći odnosi Epi i  $\text{Fe}^{3+}$ : 0,2 mM/0,2 mM Epi/ $\text{Fe}^{3+}$ ; 0,2 mM/0,1 mM Epi/ $\text{Fe}^{3+}$ ; 0,2 mM/0,05 mM Epi/ $\text{Fe}^{3+}$ . Eksperimenti su rađeni na 293 K.

### 3.5 Ciklična voltometrija

Ciklična voltometrija (CV) je elektrohemijska tehnika koja se često koristi za istraživanje redukcionih i oksidacionih procesa raznih molekulskih vrsta. Ova tehnika se koristi u proučavanju hemijskih reakcija koje su inicirane transferom elektrona<sup>148</sup>. CV podrazumeva primenu potencijala trouglastog talasnog oblika na uzorak, slika 3.6. Na početku talasnog oblika, potencijal se menja linearno sa protokom vremena, izazivajući oksidaciju ili redukciju hemijske vrste u trenutku kada potencijal dostigne dovoljno negativnu odnosno pozitivnu amplitudu. Oksidacija ili redukcija se odvijaju na površini elektrode i rezultuju električnom strujom kroz elektrodu. Za vreme primene potencijala meri se električna struja na elektrodi koja je proporcionalna količini hemijske vrste koja učestvuje u redukciji ili oksidaciji. Oksidacija redoks-aktivne hemijske vrste se dešava na površini elektrode izazivajući oksidacionu tj. anodnu struju ( $i_{pa}$ ) čiji trenutak nastanka se može uočiti kada struja elektrode od koje je oduzeta struja pozadinskih procesa dobije nenultu amplitudu. Oksidacione struje se pretražuju skeniranjem od nižih ka višim potencijalima. Sa daljim linearnim porastom potencijala, iznad srednjeg potencijala ( $E_{1/2}$ ) redoks aktivne hemijske vrste, oksidacija postaje termodinamički povoljnija i amplituda oksidacione struje nastavlja da raste sve dok oksidativni proces ne postane ograničen nedovoljnom brzinom difuzije redoks hemijske vrste ka površini elektrode. Usled pomenutog ograničenja nastaje pad amplitude oksidacione struje. Katodna struja  $i_c$  nastaje kada se potencijal primeni u negativnom pravcu dovodeći do redukcije na  $E_{pc}$  potencijalu. Nakon dostizanja maksimalne vrednosti, potencijal se snižava linearno do početne vrednosti potencijala. Menjanjem brzine promene potencijala  $v$ , tj. brzine skeniranja, i posmatranjem razlika u odzivu struje elektrode, može se izučavati i kinetika redoks procesa<sup>149</sup>.



**Slika 3.6** Princip CV; a) šematski prikaz cikličnog voltograma; b) izlazni signal za difuziono kontrolisane reakcije<sup>150</sup>.

Ako redoks sistem ostaje u ravnoteži tokom skeniranja potencijala, elektrohemijska reakcija je reverzibilna. Kod reverzibilnih reakcija difuzioni koeficijent za oksidovanu i za redukovanu formu hemijske vrste je isti. Drugim rečima, površinske koncentracije oksidovane forme i redukovane forme hemijske vrste treba da su u saglasnosti sa Nernstovom jednačinom. U elektrohemiji kod reverzibilnih procesa transfer elektrona nije ograničen brzinom i u ovim procesima brzina reakcije je dovoljno velika tako da se održava jednaka koncentracija oksidovane i redukovane forme.

Koncentracija  $C_{ox}$  i  $C_{red}$  je data Nernstovom jednačinom:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{ox}}{C_{red}} \quad (3.10)$$

gde je  $n$  broj transferovanih elektrona,  $F$  Faradejeva konstanta,  $R$  gasna konstanta,  $T$  temperatura.

Ako je difuzija u sistemu kontrolisana onda Fikov (*Fick*) zakon difuzije važi za oksidaciju i redukciju. Pod ovim uslovima, jačina struje je data Randle-Ševčik (*Randles-Sevcik*) jednačinom:

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_O^{1/2} \cdot C_O \cdot v^{1/2} \quad (3.11)$$

gde je  $n$  stehiometrijski broj elektrona uključen u reakciju,  $A$  površina elektrode u  $\text{cm}^2$ ,  $D_O$  difuzioni koeficijent oksidujuće forme izražen u  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $C_O$  koncentracija oksidujuće forme izražena u  $\text{mol/cm}^3$ ,  $v$  brzina skeniranja u  $\text{Vs}^{-1}$ .

U slučaju kada redoks reakcije nisu reverzibilne situacija je drugačija. To se dešava kada su hemijske reakcije spregnute ili kada se javlja adsorpcija reaktanata ili produkata. Ireverzibilni procesi su spori zbog spore izmene elektrona ili spore hemijske reakcije na površini elektrode. Za ireverzibilne procese jačina struje je data jednačinom:

$$i_p = 2,99 \cdot 10^5 \cdot n(\alpha \cdot n)^{1/2} \cdot A \cdot D_O^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C_O \quad (3.12)$$

$$(\alpha \cdot n_a) = 47,7 / (E_p - E_{p/2}) \quad (3.13)$$

Vrednost  $E_p$  predstavlja razliku između potencijala koji odgovaraju anodnom i katodnom maksimumu struje i iznosi 59 mV/n. To je veličina koja određuje reverzibilnost ili ireverzibilnost reakcije. Za računanje konstante brzine transfera elektrona koristi se Nikolsonova (*Nicholson*) jednačina.

Pored reverzibilnih i ireverzibilnih procesa postoje i kvazi-reverzibilni procesi. Ovi procesi su kontrolisani i difuzijom i prenosom elektrona, i dešavaju se kada je brzina prenosa elektrona u odnosu na kretanja elektroaktivne supstance nedovoljna da bi se održala Nernstova ravnoteža na površini elektrode<sup>151</sup>.

Aparatura za izvođenje CV sastoji se od potenciostata konvencionalnog tipa, povezanog sa tri elektrode (radnom, referentnom i pomoćnom elektrodom) koje su uronjene u rastvor za ispitivanje. Potenciostat nameće i održava potencijal između radne i referentne elektrode, dok u isto vreme meri struju na radnoj elektrodi. Naelektrisanje se kreće između radne i pomoćne elektrode. Detektor je povezan sa računarom i kao rezultat nastaje ciklični voltamogram koji predstavlja zavisnost struje od potencijala.

Izmerena struja tokom ovog procesa je često normalizovana na površinu elektrode i predstavljena kao gustina struje. Maksimum izmerene struje se beleži na maksimumu koji je karakterističan za datu reakciju. Širina i visina signala mogu zavisiti od brzine skeniranja, koncentracije elektrolita i primenjene elektrode<sup>152,153</sup>.

Ova elektrohemijaska tehnika našla je široku primenu za karakterizaciju metalnih kompleksa u rastvoru. Ciklična voltometrija poseduje sposobnost da brzo daje značajne informacije o termodinamici redoks procesa i kinetici heterogenih reakcija prenosa elektrona<sup>154</sup>. S obzirom da formiranje kompleksa uključuje prenos elektrona, razumevanje prirode metal-ligand interakcija je omogućeno ovom metodom. Korisne informacije moguće je dobiti čak i pri niskim koncentracijama liganda. Takođe omogućeno je i dobijanje konstante formiranja kompleksa<sup>155</sup>. Na redoks ponašanje kompleksa katehola i gvožđa može uticati promena pH, supstituenata, koncentracije i brzine skeniranja<sup>156</sup>.

### 3.5.1 Eksperimentalni deo

Voltametrijska merenja su vršena korišćenjem potenciostata/galvanostata CHI 760b (CH Instruments, Ostin, Teksas, SAD). Elektrohemijaska ćelija sadržala je borom dopiranu dijamantsku (BDD) radnu elektrodu obloženu sa poli-etar-etar ketonskim slojem sa unutrašnjim prečnikom od 3 mm, specifičnom otpornošću 0,075  $\Omega\text{cm}$ , i nivoom dopiranja bora od 1000 ppm (radna elektroda); Ag/AgCl (3 M KCl) (referentna elektroda); i Pt žice (pomoćne elektrode). Rastvoru Epi (0,2 mM) dodavane su odgovarajuće količine FeCl<sub>3</sub> (0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM) i spektar je odmah nakon toga sniman. Reakcija je praćena tokom 30 minuta snimanjem spektra na svakih 5 minuta. Ukupna zapremina uzorka iznosila je 3 mL. Spektri su snimani u opsegu od -1 V do 1 V.

Voltametrijska merenja u anaerobnim uslovima vršena su korišćenjem potenciostata/galvanostata PalmSens4 (PalmSens BV, Houten, Holandija). Korišćene su iste elektrode kao i u prethodnom postupku: BDD radna elektroda (radna elektroda), Ag/AgCl (3 M KCl) (referentna elektroda), i Pt žice (pomoćne elektrode). Sva merenja su vršena u komori koja sadrži azot (N<sub>2</sub> Dry Box). Komora je prethodno dobro isprana azotom. Epi je rastvoren u 10 mM Tris puferu, pH 7,4. Rastvoru Epi (0,2 mM) dodavane su odgovarajuća količina FeSO<sub>4</sub> (0,2 mM) i spektar je odmah nakon toga sniman.

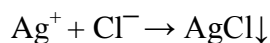
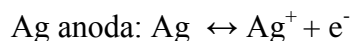
## 3.6 Oksimetrija i statički ORP

Merenje potrošnje kiseonika u reakciji Epi i gvožđa vršeno je pomoću Klarkove (Clark) elektrode. Klarkova elektroda se sastoji od anode i Pt katode. Pt katoda je prekrivena polupropusnom membranom što onemogućuje reakciju Pt katode sa drugim molekulima iz rastvora, dok O<sub>2</sub> slobodno difunduje. Šematski prikaz Klarkove elektrode dat je na slici 3.7. Elektrohemijaska reakcija stvara malu struju koja zahteva spoljašnju primenu konstantnog napona od oko 0,6 V. Anodni sistem najčešće koristi Ag i kao elektrolit KCl ili KOH da bi se obezbedio konstantni potencijal sa nerastvornim AgCl ili Ag<sub>2</sub>O.

Kiseonik se redukuje (troši) na površini plemenitog metala odnosno na katodi. U slučaju kada je KCl elektrolit, reakcija je sledeća:



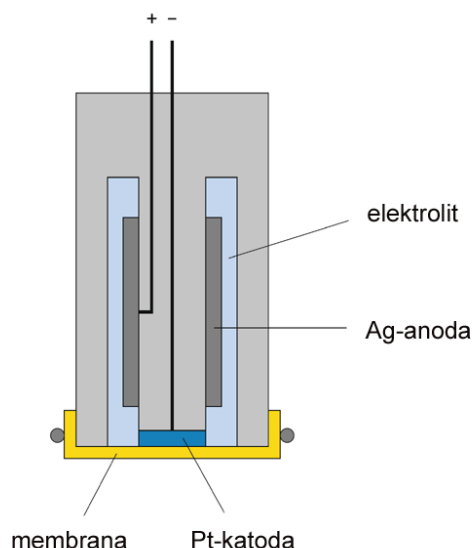
U ovoj reakciji kiseonik reaguje sa dva molekula vode i uzima četiri elektrona stvarajući na taj način 4 hidroksidna jona. Nastali OH<sup>-</sup> joni se kreću i reaguju sa Ag/AgCl anodom uzrokujući dvostepenu reakciju oksidacije:



Da bi se dobio linearni odgovor O<sub>2</sub> koncentracije, sistem funkcioniše u opsegu difuzijom-ograničenih električnih struja  $I_D$ . Stoga je  $I_D$  data jednačinom:

$$I_D = z \cdot F \cdot c \cdot D \cdot A / \delta \quad (3.14)$$

gde je  $z$  broj elektrona koji učestvuju u reakciji,  $F$  Faradejeva konstanta ( $9,64859 \cdot 10^4$  C/mol),  $c$  koncentracija O<sub>2</sub> u rastvoru,  $D$  difuziona konstanta O<sub>2</sub> u polupropusnoj membrani,  $A$  površina katode,  $\delta$  debljina difuzionog sloja. Osetljivost sistema određena je odnosom  $D \cdot A / \delta$ , dok difuzioni koeficijent zavisi od temperature<sup>157</sup>.



**Slika 3.7** Klarkova elektroda <sup>157</sup>.

### 3.6.1 Eksperimentalno deo

Za određivanje interakcija Epi i njegovih kompleksa sa gvožđem sa molekulskim kiseonikom korišćena je Klarkova kiseonična elektroda (Hansatech Instruments, Kings Lin, Velika Britanija), koja je povezana sa računarskim programom Logger Pro 3 (Vernier, Biverton, Oregon, SAD). Eksperimenti su rađeni u zatvorenoj komori, na konstantnoj temperaturi od 293 K, zaštićeni od svetla. Osnovni rastvori  $\text{FeCl}_3$  ili  $\text{FeSO}_4$  (40 mM) pravljeni su u dejonizovanoj vodi i od njih su kasnije pravljeni odgovarajuća razblaženja. Epi je rastvoren u 10 mM Tris-u, pH 7,4. Rastvor Epi 0,2 mM je praćen dva do pet minuta pre dodatka odgovarajućih količina  $\text{Fe}^{2+}$  (0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM) da bi se uspostavila bazna linija i nulta brzina promene  $\text{O}_2$ . Promene u smanjenju koncentracije kiseonika su praćene pet minuta, nakon čega je sistemima dodavano 100 IU katalaze (CAT). Uzorci su spremni u zapremini od 1,5 mL.

Redoks potencijal je određivan pomoću InLab Redox Micro redoks elektrode povezane sa Seven Compact S210 pH-metrom i računarskim programom LabX software (Mettler-Toledo International, Kolambus, Ohajo, SAD). Merenja su vršena u anaerobnim uslovima, u komori koja sadrži azot (Dry Box, Plas-Lab). Korišćene su iste koncentracije reaktanata kao u prethodnom eksperimentu.

## 3.7 Imunoblot

Molekuli razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom mogu da interaguju sa drugim molekulima kao što su antitela, lektini itd. Molekuli se prebacuju na polivinil-difluoridnu (PVDF) membranu pri čemu se zadržava rezolucija razdvajanja. Ovom metodom se povećava izloženost, kao i koncentracija molekula na površini membrane obezbeđujući veću osetljivost određenih reakcija <sup>158</sup>.

### 3.7.1 SDS poliakrilamidna elektroforeza

Ova biohemijska tehnika koristi se za razdvajanje proteina u denaturišućim uslovima. Molekuli natrijum-dodecilsulfata (SDS) vezuju se za polipeptidni lanac i dovode do denaturacije proteina. Ovi molekuli nose negativno naelektrisanje koje rezultira u njihovom međusobnom odbijanju, što dovodi do promene 3D strukture odnosno konformacije proteina u izduženu

polipeptidnu formu. Redukujuća sredstva kao što je  $\beta$ -merkaptoetanol mogu raskinuti kovalentne disulfidne veze i na taj način dovesti do narušavanja strukture proteina. Razdvajanje molekula se vrši na osnovu mase<sup>158</sup>.

### 3.7.2 Eksperimentalni deo

Uzorci CST su dobijeni iz Klinike za neurologiju i Klinike za neurohirurgiju, Kliničkog centra Srbije. Svi pacijenti dali su pismeno odobrenje o korišćenju svojih CST uzoraka u medicinske svrhe kao i u ovom istraživanju. Tokom informisanja, regrutovanja, savetovanja pacijenata kao i prikupljanja i rukovanja uzorcima poštovani su međunarodno priznati etički standardi (Helsinška deklaracija iz 1964., revidirana 1975., 1983. i 1989.). Institucionalno odobrenje za istraživanje potvrdila je i Etička komisija Kliničkog centra Srbije u skladu sa međunarodnim preporukama.

Prema standardnoj proceduri, CST uzorci su prikupljeni postupkom koji obuhvata lumbalnu punkciju u svrhu rutinskih medicinskih analiza, čemu je prethodio noćni odmor i gladovanje pacijenata. U ovoj studiji su korišćeni ostaci uzoraka prikupljenih u kliničke svrhe. Prvih 2 mL svakog uzorka je odbacivano da bi se sprečila kontaminacija krvlju. U polipropilenske epruvete sakupljeno je oko 10 mL CST. Prilikom vizuelnog pregleda uzorci CST su bili bistri i nisu sadržali tragove krvi.

Svi uzorci su pripremljeni u komori za anaerobne uslove, pod atmosferom Ar. Pripremljeni su sledeći uzorci CST: 1) CST; 2) CST + 0,2 mM Epi; 3) CST + 0,2 mM  $\text{Fe}^{2+}$ ; 4) CST + 0,2 mM/0,2 mM Epi/ $\text{Fe}^{3+}$  kompleks; 5) CST+ 0,2 mM/0,2 mM Epi/ $\text{Fe}^{2+}$ . Početni rastvor CST pripremljen je na sledeći način: 2 mL liofilizovane CST je rastvoreno u 500  $\mu\text{L}$  barbutirane vode, pH rastvora je podešen na 7,4 dodatkom 13  $\mu\text{L}$ , 1 M HCl. U 100  $\mu\text{L}$  rastvora CST pH 7,4 dodate su odgovarajuće količine Epi i  $\text{Fe}^{2+}$  ili  $\text{Fe}^{3+}$  jona. Uzorci su inkubirani 15 minuta i njima je dodato po 10  $\mu\text{M}$  biotin-jodacetoamida. Nakon dodatka biotin-jodacetoamida uzorci su termostatirani 1 h na 37 °C, i zatim je u njih dodato 50  $\mu\text{L}$  SDS-PUZ pufera za uzorke. Prokuvani su 5 minuta na 100 °C i kao takvi su pripremljeni za SDS poliakrilamidnu elektroforezu (SDS-PAGE). Oni su zatim ostavljeni na -20 °C za dalju imunoblot analizu.

SDS-PAGE elektroforeza urađena je prema standardnoj proceduri<sup>152</sup>. Eksperimenti su rađeni na Mini-PROTEAN II vertikalnom elektroforetskom sistemu (Bio-Rad, Minhen, Nemačka) na 10% poliakrilamidnom gelu. Na gel je nanošeno 20  $\mu\text{L}$  uzorka.

Nakon završene SDS-PAGE gel je stavljen u pufer za blot - Tris-Gly, pH 8,30 sa 20% (v/v) metanolom i spakovan u tzv. sendvič. Zatim je urađen mokri elektotransfer proteina sa gela na PVDF membranu (Bio Rad, Herkjuliz, SAD), preko noći na 4 °C pomoću Mini Trans-Blot transfer sistema (Bio-Rad Laboratories, Herkjuliz, SAD). Efikasnost transfera proteina na membranu proverena je bojenjem membrane sa Ponceau S. Boja je zatim uklonjena ispiranjem membrane sa vodom. Nespecifično vezivanje antitela za membranu onemogućeno je blokiranjem iste sa 5% goveđim serum-albuminom (Serva, Hajdelberg, Nemačka) rastvorenim u PBS-u. Membrane su zatim ispirane PBS-om i inkubirane 90 minuta sekundarnim antitelom Avidin-HRP (eBioscience, Thermo Fischer Scientific, Misisoga, Kanada) sa razblaženjem od 1:5000 puta. Membrane su nakon inkubiranja ispirane 4 puta po 5 minuta puferom za ispiranje TBS (PBS + 0,1% Tween 20).

Detekcija traka urađena je metodom hemiluminiscencije na sledeći način: pomešano je 2 mL luminola sa 1  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ovim rastvorom prelivena je membrana i inkubirana 2 minuta. Nakon inkubacije sa supstratom membrane, koja se nalazila u kaseti za slikanje, u mračnoj sobi je vršeno eksponiranje filma u zavisnosti od jačine signala proteina.

### 3.8 Metoda nametnute voltaže na deliću membrane u konfiguraciji cela ćelija (*whole cell patch clamp*)

Ova metoda predstavlja elektrofiziološku metodu koja se koristi za precizno snimanje struja na individualnim izolovanim živim ćelijama. Primenom ove tehnike moguće je ispitati fiziološku ulogu grupe jonskih kanala ili individualnih jonskih kanala u ćelijskoj membrani, prvenstveno zahvaljujući dobijanju informacije o provodljivosti (konduktansi) jonskih kanala i njihovom kinetičkom ponašanju.

Metoda se zasniva na tome da se deo membrane u električnom smislu izoluje od spoljašnjeg rastvora i da se snima struja koja teče kroz pomenuti deo membrane. Ovo se postiže pritiskanjem staklene pipete na površinu ćelije i primenom blage sukucije. Pipeta se dobro očisti (npr. poliranjem vatrom) i ispunji odgovarajućim rastvorom elektrolita u koji je uronjena elektroda pojačivača. Još jedna elektroda pojačivača se uranja u spoljašnji rastvor i koristi se za podešavanje komandnog potencijala pa time posredno i jačine struje. Membranski potencijal se menja nezavisno od jačine struje kroz jonske kanale. Merenjem membranskog potencijala i poređenjem sa jačinom struje dolazi se do zaključaka o električnoj provodljivosti (konduktivnosti) membrane<sup>159</sup>.

#### 3.8.1 Eksperimentalni deo

Metod nametnute voltaže na celim ćelijama omogućio je da se prati aktivnost jonskih kanala i jonskih struja u njima u prisustvu Epi kao i Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksa. S obzirom da u prisustvu O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> joni brzo oksiduju u Fe<sup>3+</sup> jone, u ovim eksperimentima bilo je nemoguće pratiti efekat Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleksa na adrenergičke receptore. Merenja su vršena na C6 ćelijskoj liniji astrocitoma pacova koji na svojoj površini konstitutivno ekspimiraju β-adrenergičke receptore<sup>160</sup>. C6 ćelije su gajene u standardnim uslovima (na 37 °C, u 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> vlažnoj atmosferi) u medijumu RPMI 1640 (GE Healthcare Life Sciences, Frajburg, Nemačka), koji je obogaćen sa 10% fetalnim goveđim serumom (FBS, Gibco, Voltam, Masačusets, SAD) i 1% penicilinom / streptomycinom (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD). Pre početka eksperimenata ćelije su dostigle konfluentnost od 80%. Ćelije su zatim tretirane sa 0,1% rastvorom tripsin-EDTA radi odvajanja, posejane u staklene Petri kutije (Ø15 mm) sa gustinom od 10<sup>4</sup> po mL, i inkubirane 24 sata. Ćelije su zatim prenete u komoru za snimanje i eksperimenti su nastavljeni u vanćelijskom rastvoru pH 7,4, koji sadrži 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM glukozu. Tokom eksperimenta korišćene su pipete (od 4 MΩ do 7 MΩ) ispunjene rastvorom koji odgovara unutarćelijskoj tečnosti. Rastvor je sadržao 144 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH 7,2, podešen sa KOH). Za snimanja metodom nametnute voltaže na deliću membrane korišćen je Tecella Pico 2 pojačivač sa TecellaLab softverom (Tecella, Futhil Ranč, Kalifornija, SAD). Signali su sakupljeni na 10 kHz, filtrirani na 5 kHz i analizirani korišćenjem pClamp softvera (Molecular Devices, San Hoze, Kalifornija, SAD). Kapacitivnost ćelije i redna otpornost su merene direktno sa pojačivača. Gornja granica za rednu otpornost iznosila je 20 MΩ. Ćelije su tretirane sa 0,02 mM Epi, kao i Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksom (0,02 mM/0,02 mM Epi/Fe<sup>3+</sup>). Kao odgovor registrovane su jonske struje sa cele membrane C6 ćelija glioblastoma. Promene su praćene u opsegu membranskog potencijala od -110 mV do +90 mV u koracima od 20 mV. Analizirane su stabilne struje. Gustina struje je dobijena deljenjem amplitude struje sa kapacitivnošću membrane. Gustina struje za svaku pojedinačnu ćeliju je normalizovana na maksimalnu gustinu kontrolne struje (koja se dobija pri +90 mV).

### 3.9 Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata urađena je pomoću neparametrijskog dvosmernog Man-Vitnijevog testa ( $P < 0,05$ ) i odgovarajuće krive fitovanja u računarskom programu STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, SAD). Valjanost fitovanja proverena je sa  $R^2$ , koji odgovara stepenima slobode. Svi eksperimenti su urađeni u tri ponavljanja.

Poređenjem dve grupe podataka, dobijene u eksperimentima na ćelijama, pomoću uparenog t-testa sa dvostranom raspodelom,  $p < 0,05$ , dobijena je statistički značajna razlika. Podaci su analizirani i prikazani pomoću SigmaPlot softvera.

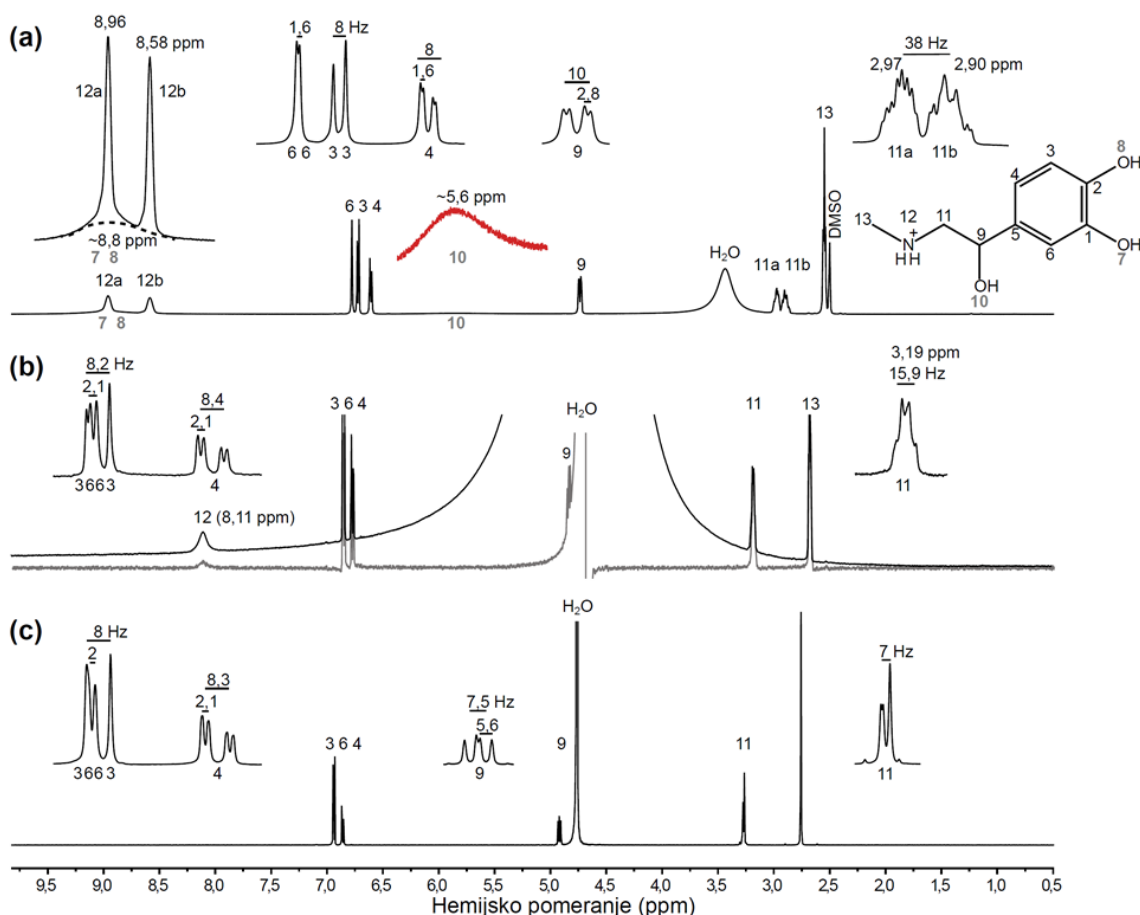


## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Određivanje strukture epinefrina u vodi i dimetil sulfoksidu

#### 4.1.1 Određivanje strukture epinefrina u vodi i dimetil sulfoksidu primenom $^1\text{H}$ NMR i $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY metode

$^1\text{H}$  NMR spektar Epi u DMSO i vodi uz asignaciju signala prikazani su na slici 4.1.



**Slika 4.1**  $^1\text{H}$  NMR spektri Epi u različitim rastvaračima. (a) 50 mM Epi u deuterisanom DMSO (pH = 5,5; finalna koncentracija  $\text{H}_2\text{O}$  = 240 mM). 5,6 ppm - signal OH grupa. Intenziteti integrala:  $\delta \sim 8,8$  signal - dva protona;  $\delta \sim 5,6$  signal - jedan proton; (b) 10 mM Epi u  $\text{H}_2\text{O}$  sa 10%  $\text{D}_2\text{O}$  (pH = 3,3). Crna linija - bez saturacije signala  $\text{H}_2\text{O}$ .  $\text{NH}_2$  signal pokazuje integral koji odgovara intenzitetu dva protona. Siva linija - sa saturacijom signala vode; (c) 10 mM Epi u  $\text{D}_2\text{O}$  (pH = 3,3). Kao dodaci su prikazani signali od interesa. Prikazana je i struktura Epi sa asignacijom signala.

Iako je asignacija signala  $^1\text{H}$  NMR spektra Epi dobro poznata <sup>161</sup>, postoje brojne razlike u spektru zavisno od rastvarača. Na slici 4.1a prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar Epi u DMSO. Protoni  $\text{NH}_2$  grupe obrazuju dva odvojena signala u DMSO, što govori o tome da su dva protona izložena različitim efektivnim magnetnim poljima. Da se dva protona u  $\text{NH}_2$  grupi u Epi u DMSO razlikuju, potvrđeno je i sa  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY i  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC metodama (prilog 1).

Prethodna istraživanja strukture niza benzil i fenil amino analoga rifampicina, za čiju sintezu su korišćeni benzilamini koji sadrže protonovanu amino grupu u DMSO, takođe pokazuju postojanje dva signala sa sličnim vrednostima hemijskog pomeranja ( $\delta$ ), što je pripisano formiranju vodoničnih veza <sup>162</sup>. Takođe, na slici 4.1a se uočavaju dva vrlo široka signala koja potiču od hidrosilnih grupa. Signal na  $\delta \sim 8,8$  ppm potiče od protona OH grupa na kateholnom prstenu, dok signal na  $\delta \sim 5,6$  ppm potiče od protona OH grupe na bočnom lancu. Ovo je u skladu sa činjenicom da se signali protona koji su pozicionirani na aromatičnim hidrosilnim grupama nalaze na većim  $\delta$  vrednostima u odnosu na signale koji potiču od alifatičnih OH grupa <sup>163</sup>. Sa druge strane, na slici 4.1b i 4.1c prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar Epi u  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{D}_2\text{O}$  gde se primećuje da dolazi do brze izmene protona iz hidrosilne grupe sa protonima iz vode, tako da se ovi signali ne uočavaju u datim rastvaračima. Ovakav rezultat ukazuje da OH grupe u vodi ne mogu biti H donori za intramolekulsku vodoničnu vezu.

Druga glavna razlika između spektra Epi u DMSO i vodi, primećena je kod signala protona metilenske grupe. Protoni na poziciji 11 u DMSO pokazuju dva odvojena kompleksna multipliteta (H11a,b), koji nastaju zbog hemijske neekvivalentnosti protona na prohiralnom centru (C11). Ovi protoni se u spektru snimanom u vodi pojavljuju u obliku dva dubleta (*dd*). Uočava se da neekvivalentnost protona H11 utiče na signal H9 protona. Tako se u DMSO javlja u vidu *dd* signala, dok se u vodi javlja kao triplet usled sprežavanja dva identična protona na C11. U vodi je signal H9 protona nevidljiv jer je preklapljen širokim signalom vode, što je i pokazano na slici 4.1b. Međutim ovaj signal se uočava kada se saturiše signal vode kao i u  $\text{D}_2\text{O}$  (slika 4.1c). Zbog izmene protona deuterijumom signal  $\text{NH}_2$  u  $\text{D}_2\text{O}$  ima manji intenzitet.

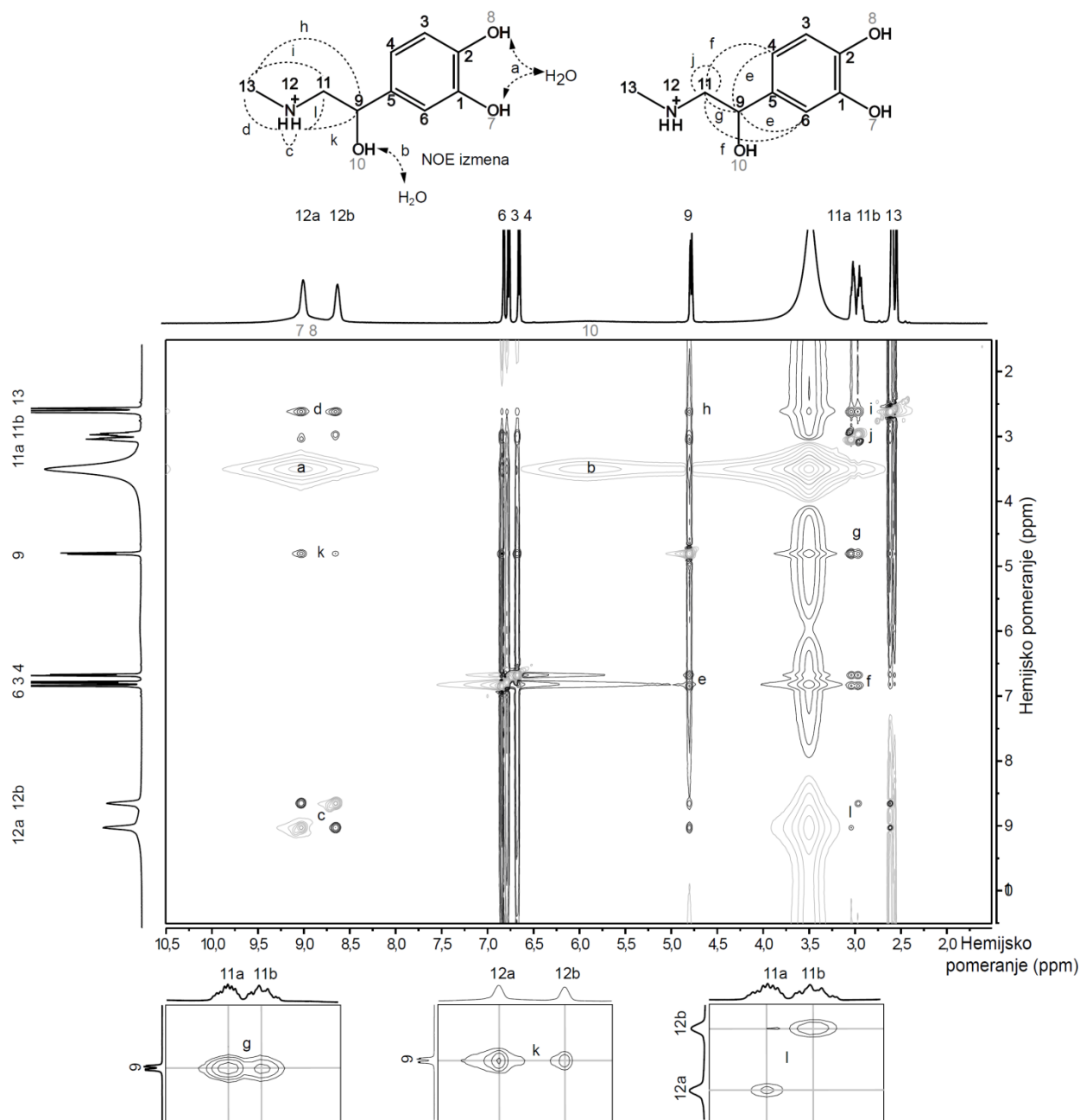
Poređenjem pozicije H12 protona u DMSO uočava se da signal H12a rezonuje na nešto višem polju (*downfield*) u odnosu na signal H12b protona. Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da je H12a proton iz amino grupe uključen u formiranju vodonične veze. Amino grupa Epi u vodi pokazuje samo jedan signal čiji je intenzitet jednak intenzitetu dva protona (slika 4.1b). Supresija  $\text{H}_2\text{O}$  signala dovodi do smanjenja intenziteta  $\text{NH}_2$  signala. Ovo je najverovatnije povezano sa izmenom protona sa vodom.

Brza izmena utiče na deprotonovanje molekula, mada to zavisi i od jačine vodonične veze odgovarajućeg protona sa rastvaračem. Otuda, DMSO otežava deprotonovanje zato što nema (ili ima jako spore) izmene protona, a jake vodonične veze sa DMSO to dodatno otežavaju.

**Tabela 4.1** Hemijsko pomeranje u ppm (multipliciteti;  $J$  u Hz)  $^1\text{H}$  NMR spektar Epi u različitim rastvaračima. Multipliciteti:  $d$  – dublet;  $dd$  – dublet dubleta;  $m$  - multiplet;  $t$  - triplet;  $\delta$  - širok signal;  $s$  - singlet. \*Podaci su dobijeni iz spektra sa saturacijom vode.

Pozicija	DMSO	H <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O
12	H12a 8,96 ( $\delta$ ) H12b 8,58 ( $\delta$ )	8,11( $\delta$ )	–
7, 8 (OH)	~ 8,8 ( $\delta$ )	–	–
6	6,78 ( $d$ ; 1,6)	6,86 ( $d$ ; 2,1)	6,95 ( $d$ ; 2,0)
3	6,72 ( $d$ ; 8,0)	6,85 ( $d$ ; 8,2)	6,94 ( $d$ ; 8,0)
4	6,61 ( $dd$ ; 8,0; 1,6)	6,77 ( $dd$ ; 8,4; 2,1)	6,89 ( $dd$ ; 8,3; 2,1)
10 (OH)	~ 5,6 ( $\delta$ )	–	–
9	4,73 ( $dd$ ; 10,2; 2,9)	4,84 ( $t$ ; 6,5)*	4,92 ( $t$ ; 6,5)
11	H11a 2,97 ( $m$ ) H11b 2,90 ( $m$ )	3,19( $dd$ ; 15,9; 6,2)	3,27 ( $dd$ ; 7,0; 2,0)
13	2,55 ( $t$ ; 5,4)	2,68 ( $t$ ; 5,0)	2,76 ( $s$ )

U tabeli 4.1 prikazano je da su signali svih C-vezanih protona pomereni prema nižem polju (*upfield*) u DMSO, u poređenju sa vodom kao rastvaračem. H11 proton pokazuje najizraženije promene u hemijskom pomeranju. Za razliku od njega H6 proton trpi najmanje promene. Na osnovu ovih informacija moglo bi se reći da na C11 poziciju najviše utiče rastvarač u kojem je snimljen spektar, dok je položaj signala C6 gotovo identičan u spektrima snimljenim u DMSO i vodi. Promena u hemijskom pomeranju signala H11 protona može biti povezana sa formiranjem intramolekulske veze sa H10 protonom i smanjenjem elektronske gustine na tim atomima. Različite promene u hemijskim pomeranjima rezultiraju u različitim relativnim pozicijama signala H3 i H6 protona u DMSO i vodi.

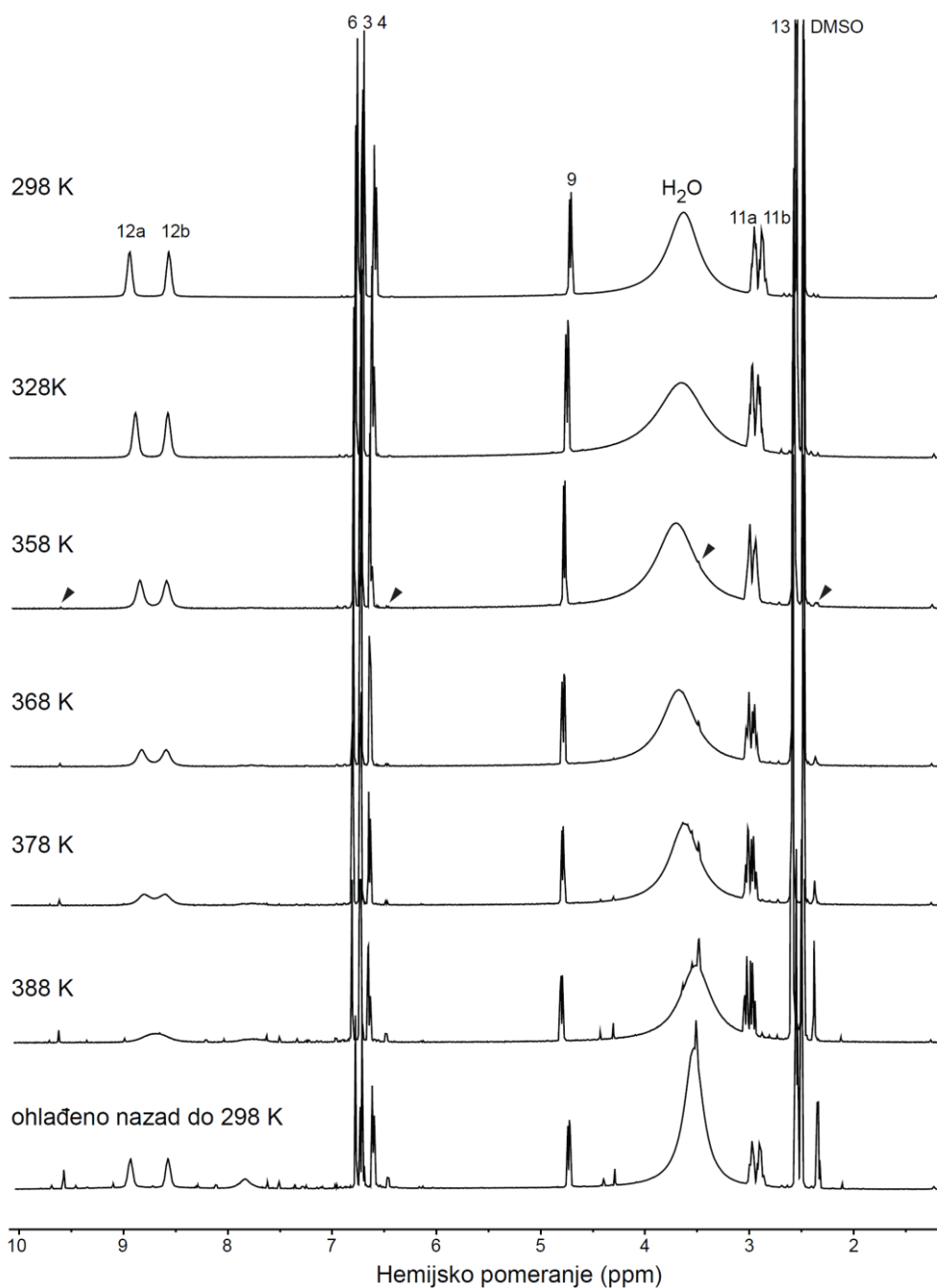


**Slika 4.2**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektar Epi u DMSO. Struktura Epi sa prikazanim interakcijama. Jak NOE efekat: c-k; Slab NOE efekat: g (povezano sa H11b signalom) i l; NOE izmene (siva linija): a i b; [Epi] = 50 mM.

U cilju daljeg ispitivanja strukture Epi u DMSO snimljen je  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektar što je prikazano na slici 4.2. Različit NOE koji je dobijen za signale H12a i H12b protona u  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektru Epi u DMSO, potvrđuje da su dva protona u  $\text{NH}_2$  hemijski i magnetno neekvivalentni. Takođe je potvrđeno da su H11 protoni diastereotopni. Posmatrajući  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spektar može se uočiti da NOE efekat ukazuje na sledeće: (i) H12a je bliže H9 u odnosu na H12b; (ii) H11a je bliže sa H9 u poređenju sa H11b; (iii) H11b ima NOE korelaciju sa H12b, dok H11a pokazuje NOE korelaciju sa H12a; (iv) oba H11 protona su bliže sa H6 nego sa H4.

Redosled protona prema rastojanju od molekula rastvarača je  $\text{H6} < \text{H3} \leq \text{H9} < \text{H4}$ . Udaljenost od molekula rastvarača zavisi od blizine hidroksilnih grupa (H6, H3, i H9 imaju OH grupe u blizini; H4 ima najudaljeniju OH grupu).

### 4.1.2 Karakterizacija vodoničnih veza epinefrina u vodi i dimetil sulfoksidu pomoću efekta temperature

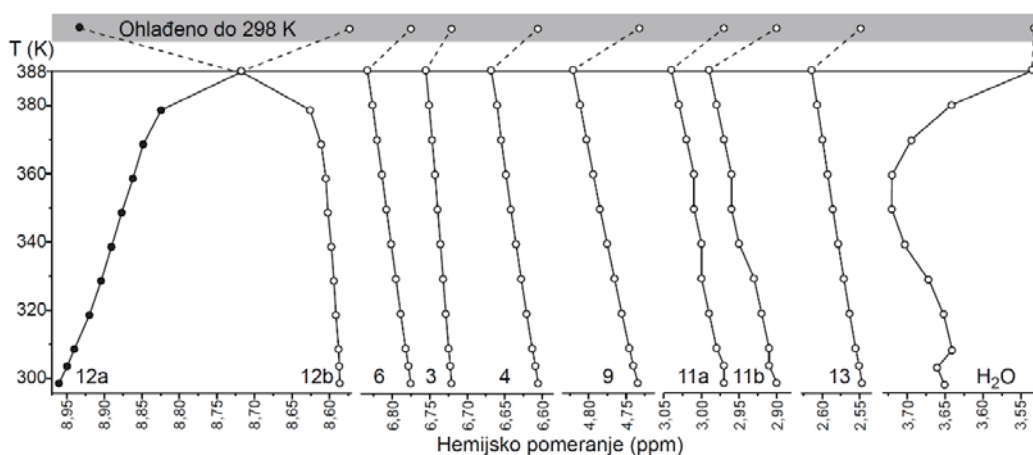


**Slika 4.3**  $^1\text{H}$  NMR spektar Epi u deuterisanom DMSO na različitim T. Uzorci su postepeno zagrevani od 298 K do 388 K u koracima od po 10 K (nisu prikazani svi spektri) i zatim ohlađeni nazad do 298 K. Rastvaranje Epi (10 mM), 3  $\mu\text{L}$  35% HCl dodato u 500  $\mu\text{L}$  uzorka (finalna koncentracija HCl = 67,8 mM; finalna koncentracija H<sub>2</sub>O = 240 mM; pH = 5,5).

Efekat povećanja temperature (T) na  $^1\text{H}$  NMR spektar je analiziran da bi se odredio karakter vodoničnih veza koje Epi formira u DMSO (slika 4.3). Generalno je pokazano da je na visokim temperaturama podložnije raskidanje intermolekulskih vodoničnih veza u poređenju sa intramolekulskim vezama<sup>164</sup>. Spektar Epi u deuterisanom DMSO pokazuje da su svi signali izuzev signala koji potiče od H12a protona blago pomereni prema višim frekvencijama sa povećanjem temperature. Takođe se primećuje da je signal H12a protona pomeren ka nižim frekvencijama i da pokazuje najizraženije promene u hemijskom pomeranju, što je jasnije prikazano na slici 4.4. Postoji generalno pravilo koje govori o tome da se formiranje vodonične veze manifestuje kao

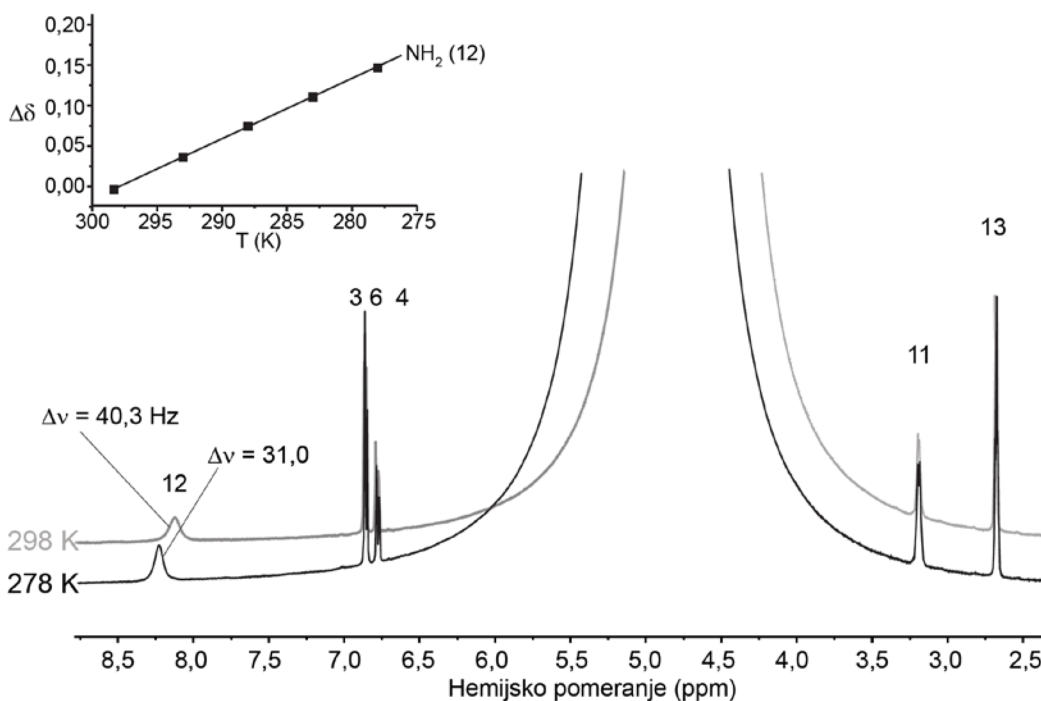
pomeranje prema višim frekvencijama H signala koji učestvuje u vezi. Literaturni podaci potvrđuju sličan efekat temperature na hemijsko pomeranje kod amidnih protona u proteinima. Sa povećanjem temperature dolazi do slabljenja vodonične veze zbog uticaja elektronegativnijeg atoma. Kao posledica toga, signal je manje pomeren prema višim hemijskim pomeranjima tj. pokazuje relativno pomeranje prema nižem polju <sup>164-166</sup>. Hemijsko pomeranje amidnih protona je povezano sa dužinom vodonične veze i obrnuto je proporcionalno trećem stepenu rastojanja od akceptora vodonične veze <sup>167</sup>. Temperaturni koeficijent izračunat za linearni opseg od 298 K do 378 K za H12a iznosi  $\Delta\delta\text{H}12a/\Delta T = -1,7$  ppb/K. Za ostale signale  $\Delta\delta\text{H}/\Delta T$  vrednost je pozitivna i iznosi od 0,07 ppb/K do 1 ppb/K. Prethodna istraživanja su pokazala da za amidne grupe  $\Delta\delta\text{H}/\Delta T$  vrednosti opsega od  $-1$  ppb/K do  $-4$  ppb/K odgovaraju vodoničnim vezama sa verovatnoćom koja prelazi 90% <sup>164</sup>. Povećanje temperature omogućava lakše rotaciono kretanje oko C11-N veze čiji je konačni rezultat raskidanje HN-H12a...O-H10 veze i spajanje H12a i H12b signala na  $T_c = 388$  K. Kod H11a i H11b nije uočeno spajanje signala. Na  $T \geq T_c$  signal H11 protona pokazuje oblik dva *dd* sa geminalnom konstantom sprežanja od  $J = 12,6$  Hz i vicinalno sprežanje sa konstantama od 3,5 Hz (H11a) i 9,4 Hz (H11b) sa H9. Očigledno je da kompleksni oblik H11 multipliteta na sobnoj temperaturi, koji je nemoguće analizirati, delimično potiče od vicinalnog sprežanja H11 protona sa H12 protonom. Takođe je uočeno da se signal tripleta koji potiče od CH<sub>3</sub> protona spaja u singlet. Složeni multipliteti koji potiču od H11 i H13 pokazuju jednostavniji oblik na 358 K (slika 4.3). Hemijsko pomeranje neekvivalentnih protona na C11 nije povezano sa prisustvom intramolekulske vodonične veze koja se formira između NH<sub>2</sub> i OH. Neophodno je napomenuti da se prvi znaci ireverzibilnog raspadanja Epi, tj. dodatni signali u NMR spektru koji pripadaju Epi derivatima, dobijaju na mnogo manjim temperaturama (358 K) od  $T_c$ . Uočeni efekat je reverzibilan sa hlađenjem uzorka do početne temperature (298 K). Ovakav rezultat ukazuje na prisustvo jake intramolekulske vodonične veze u Epi, što je u skladu sa  $\Delta\delta\text{H}12a/\Delta T$  vrednošću. Manje  $\Delta\delta/\Delta T$  apsolutne vrednosti u rasponu od  $-1$  ppb/K do  $-4$  ppb/K ukazuju na jaku intramolekulsku vezu <sup>164</sup>.

Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodnim teorijskim studijama koje su rađene na Epi. Proračuni urađeni u ovim istraživanjima ukazuju da je intramolekulska vodonična veza, koja uključuje amino grupu kao H-donor i OH grupu kao H-akceptor, jaka i da pokazuje delimično kovalentan karakter <sup>168</sup>. Takođe su pokazali da je intramolekulska vodonična veza u Epi jača od vodonične veze koja uključuje hidrosilnu grupu kao H-donor.



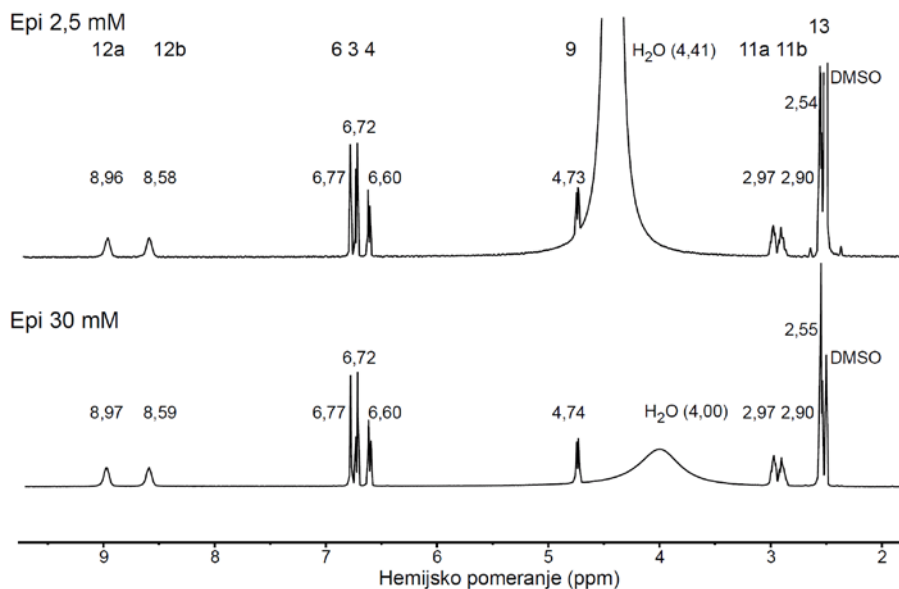
**Slika 4.4** Efekta promene temperature na hemijsko pomeranje <sup>1</sup>H NMR signala Epi i vode u deuterisanom DMSO.

Sa povećanjem temperature dolazi do različitog ponašanja signala vode u DMSO (slika 4.4). U opsegu od 298 K do 318 K se ne uočavaju promene u hemijskom pomeranju. Međutim, sa povećanjem temperature i ulaskom u opseg od 318 K do 348 K, signal se pomera prema višim frekvencijama, dok je u opsegu od 358 K do 388 K signal pomeren prema nižim frekvencijama. Za razliku od signala Epi u <sup>1</sup>H NMR spektru, promene signala H<sub>2</sub>O nisu reverzibilne. Ovakav rezultat ukazuje da molekul Epi nije okružen molekulima vode koji su prisutni u DMSO.



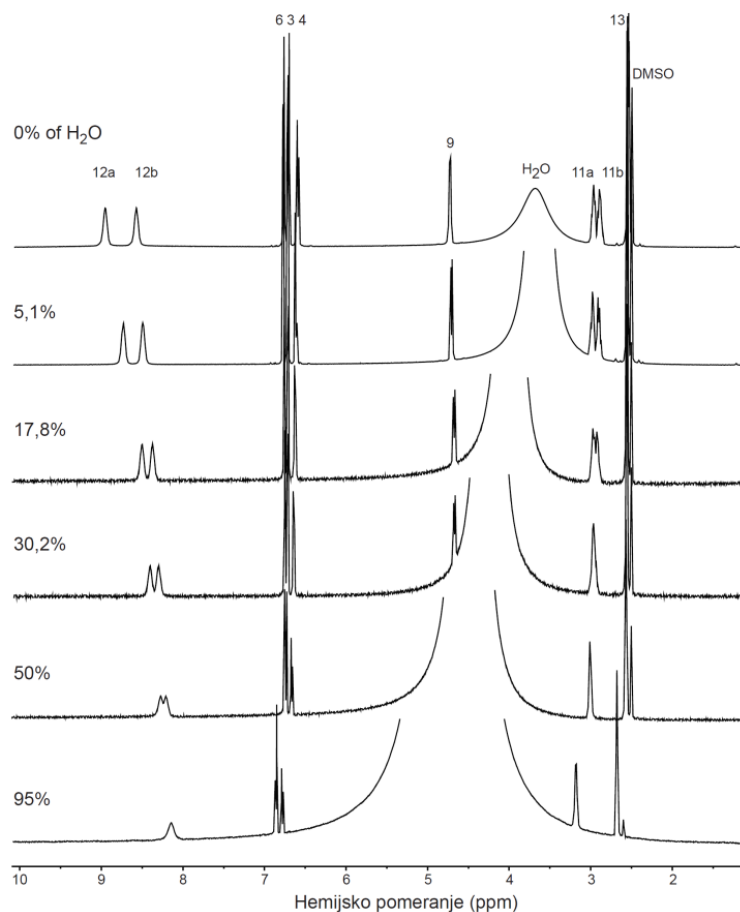
**Slika 4.5** Promene u  $^1\text{H}$  NMR spektru Epi (10 mM) u 10%  $\text{D}_2\text{O}$  sa smanjenjem temperature. U gornjem levom uglu je prikazana analiza promena u hemijskom pomeranju sa promenom temperature.

U daljim eksperimentima Epi je izložen smanjenju temperature sa 298 K do 278 K (slika 4.5). Promena u hemijskom pomeranju pokazuje linearan pad prema višim frekvencijama sa smanjenjem temperature. Nije se pojavila dodatna linija za  $\text{NH}_2$ , ukazujući da Epi ne formira jaku intermolekulsku vodoničnu vezu sa vodom. Epi u vodi ne formira jake intermolekulske veze, odnosno ne nosi sa sobom vezane molekule vode koji bi mogli da utiču na kapacitet za druge reakcije.



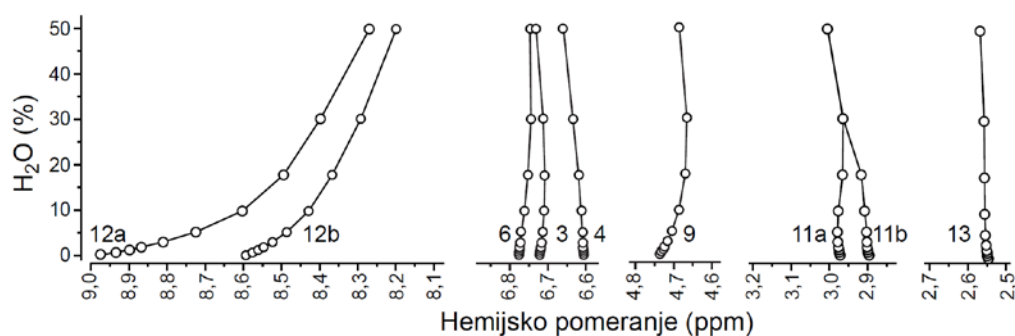
**Slika 4.6**  $^1\text{H}$  NMR spektar dve različite koncentracije Epi u DMSO.

Takođe je analiziran efekat dve različite koncentracije Epi, 2,5 mM i 30 mM, na NMR spektar. Promene povezane sa koncentracijom u spektru su zajednički indikator intermolekulskih vodoničnih veza u smislu veza između dva Epi molekula. Rezultati prikazani na slici 4.6 pokazuju da hemijsko pomeranje, širina linija i konstanta sprezanja ostaju nepromenjene u širokom opsegu koncentracija. Ovo potvrđuje da ne dolazi do formiranja dimera Epi u DMSO.



**Slika 4.7** Promene u  $^1\text{H}$  NMR spektru Epi sa povećanjem količine  $\text{H}_2\text{O}$  u deuterisanom DMSO.

Na slici 4.7 prikazan je efekat povećanja udela vode u uzorku Epi inicijalno pripremljenog u DMSO. Sa povećanjem udela/koncentracije vode u uzorku dolazi do postepenih promena u hemijskom pomeranju i izgledu NMR signala. Koncentracija Epi u ovim eksperimentima nije bila konstantna već je varirala od 25 mM do 50 mM. Za razliku od ovih rezultata, promene u koncentraciji Epi u DMSO nisu imale efekta na hemijsko pomeranje i konstantu sprezanja  $J$ , što je i pokazano na slici 4.6.



**Slika 4.8** Promene u hemijskim pomeranjima Epi u  $^1\text{H}$  NMR signalima sa povećanjem količine  $\text{H}_2\text{O}$  u deuterisanom DMSO; [Epi]: 50 mM (za 0,6%  $\text{H}_2\text{O}$ ), 47,4 mM (5,1%  $\text{H}_2\text{O}$ ), 41,1 mM (17,4%  $\text{H}_2\text{O}$ ), 34,9 mM (30,2%  $\text{H}_2\text{O}$ ) i 25 mM (50%  $\text{H}_2\text{O}$ ).

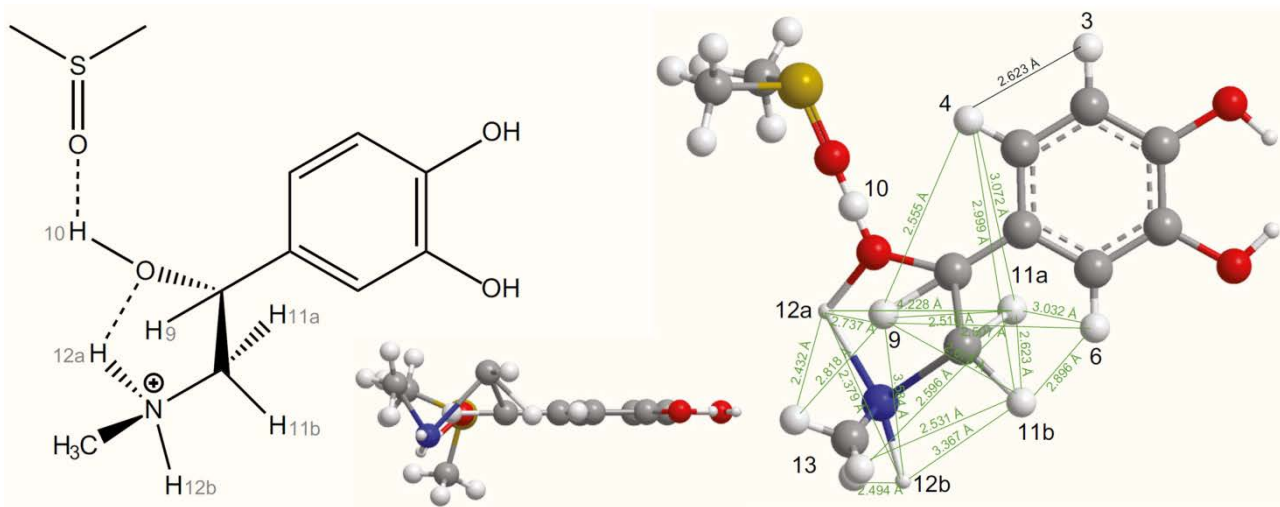
Na slici 4.8 prikazane su kvantifikovane promene u hemijskim pomeranjima Epi sa povećanjem količine vode u deuterisanom DMSO. H4, H11a, i H11b pokazuju promene u hemijskim pomeranjima ka višim vrednostima sa povećanjem količine  $\text{H}_2\text{O}$  u DMSO rastvoru, dok H12a i H12b, kao i H9, pokazuju pomeranje ka nižim vrednostima. H11a i H11b signali su se spojili u prisustvu znatno manje količine  $\text{H}_2\text{O}$  (~30%) u odnosu na H12a i H12b signale



(>50% H<sub>2</sub>O u rastvoru). Hemijsko pomeranje neekvivalentnih protona na C11 je mnogo osetljivije na interakciju Epi sa DMSO od protona na C12. U osnovi, geminalne grupe u prohiralnom centru hiralnog jedinjenja su diastereotopne. Diastereotopni protoni se detektuju u spektru sa različitim hemijskim pomeranjima. Cepanje signala može biti pod uticajem liganda <sup>169</sup>. Delimično pozitivno naelektrisanje hidrosilne grupe koja je vodoničnom vezom vezana sa NH<sub>2</sub> može biti smanjeno kroz formiranje dodatne intermolekulske vodonične veze sa DMSO. Prethodna istraživanja zasnovana na teoriji funkcionalne gustine (*Density functional theory*, DFT) predložila su da Epi i DMSO mogu da formiraju stabilan kompleks sa jakim račvastim vodoničnim vezama HN-H12a...O-H10...O=S, koje pokazuju delimičan kovalentni karakter <sup>167</sup>. Dodatno, u skladu sa teorijskim istraživanjima zasnovanim na simulacijama, vodonična veza sa DMSO je jača od HN-H12a...OH <sup>167</sup>. Ovo je u skladu sa različitim vrednostima Tc za H11a i H11b, i H12a i H12b (slika 4.3). Treba napomenuti da gubitak u  $\delta$  H11 dovodi do promena kod H9 signala od *dd* do tripleta što bi značilo da hemijsko pomeranje neekvivalentnih protona, koji se uklanjaju zamenom rastvarača, može biti objašnjeno formiranjem vodonične veze O-H10...O=S.

### 4.1.3 3D model epinefrina u dimetil sulfoksidu

Na slici 4.9 predstavljen je 3D model Epi u DMSO koji sadrži rastojanja među atomima prikazanim u angstromima (0,1 nm). U DMSO, molekul Epi sadrži dodatni petočlani prsten koji obuhvata HNH12a...O-H10 intramolekulsku vezu i zauzima konformaciju koja podseća na „škorpiju“, gde kateholni prsten predstavlja telo, a bočni lanac zakrivljeni rep. Prema razlikama u <sup>1</sup>H NMR signalima protona na ključnim pozicijama (gde protoni u vodi na N12 poziciji pokazuju jedan signal, dok u DMSO se jasno vide dva signala, i protoni na poziciji C11 u vodi daju *dd*, a u DMSO dva odvojena kompleksa multipliteta, koja potiču od neekvivalentnih protona prohiralne CH<sub>2</sub> grupe) struktura Epi u vodi je značajno različita od one u DMSO. Za ovo je odgovoran efekat rastvarača na formiranje vodoničnih veza. Računarske simulacije interakcija protonovanog Epi sa vodom ukazuju na dva tipa vodoničnih veza u visoko stabilnim konformacijama: (i) vodonična veza između amino grupe i H<sub>2</sub>O kao H donora <sup>37</sup>, (ii) račvaste vodonične veze sa H<sub>2</sub>O kao H donomom za hidrosilnu grupu i H akceptorom za amino grupu <sup>170</sup>. U ranijim istraživanjima izračunato je da dodavanje jednog molekula H<sub>2</sub>O Epi može uzrokovati raskidanje HN-H...OH veze sa bočnim lancem i dovesti do formiranja dve vodonične veze sa vodom <sup>170</sup>. Uvek postoji nivo kooperacije u formiranju intra- i intermolekulskih vodoničnih veza <sup>171</sup>, tako da efekat promene rastvarača na jednoj poziciji ima uticaj na celi molekul.



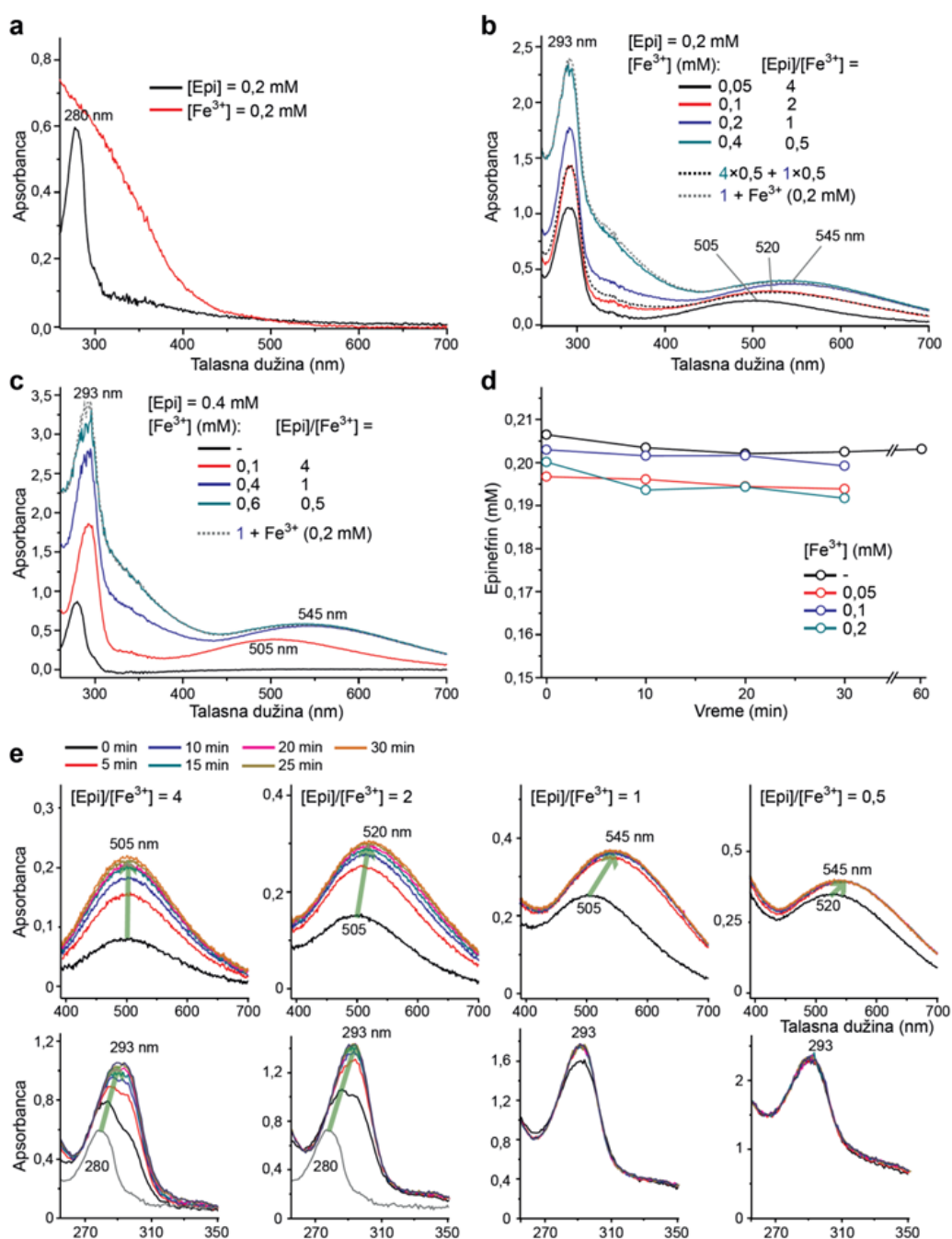
**Slika 4.9** Pretpostavljena 3D struktura Epi u DMSO; levo - strukturna formula epinefrina (vodonične veze su prikazane isprekidanom linijom); desno - „štap i lopta“ model Epi iz dve perspektive. Rastojanja među atomima prikazana su u angstromima (0,1 nm).

Vodonične veze povezane sa vodom nisu kompatibilne sa 3D strukturom Epi koja je dobijena u DMSO, što se može objasniti dobijenim razlikama u  $^1\text{H}$  NMR spektru. S obzirom da se struktura Epi u vodi značajno razlikuje u odnosu na DMSO, tj. Epi u vodi nema intramolekulske vodonične veze i ne formira jake vodonične veze sa molekulima vode, protoni na OH i  $\text{NH}_2$  grupama se brzo razmenjuju sa vodom. Sve ovo ukazuje na nerigidnu odnosno relaksiranu strukturu Epi koja nije ograničena jakim intra- i intermolekulskim vodoničnim vezama. U tom smislu, Epi je slobodan i dostupan za formiranje koordinacionih veza. Vodonično vezivanje i konformacija Epi mnogo zavisi od promene okruženja. U poređenju sa biološki relevantnom vodenom sredinom DMSO može izazvati značajne promene u konformaciji Epi, naročito utičući na vodonične veze <sup>172</sup>. Vodonična veza ne samo da značajno određuje strukturu biomolekula u rastvoru, ona značajno utiče i na stabilizaciju prelaznog stanja, kao i na specifičnost vezivanja liganda. Iz tog razloga je veoma bitna uloga rastvarača <sup>173</sup>. Proučavanje različitih interakcija kateholamina u organskim rastvaračima može značajno da utiče na biološku relevantnost tih rezultata. Sa druge strane, poznavanje konformacije Epi u DMSO je bitno za razumevanje načina vezivanja preko vodoničnih veza u kateholaminima kao i za razumevanje interakcija kateholamina sa drugim organskim molekulima. DMSO može biti dobra model struktura za metionin sulfoksid kao i oksidovane metioninske ostatke u proteinima. Treba pomenuti i da adrenergički receptori sadrže izložene metioninske ostatke tako da metioninska oksidacija može učestvovati u regulaciji razgradnje kateholamina <sup>174,175</sup>.

## 4.2 Interakcija epinefrina sa $\text{Fe}^{3+}$ jonima

### 4.2.1 Strukturna analiza epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa primenom UV/Vis spektroskopije

Na slici 4.10. prikazani su UV/Vis spektri Epi sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima. U 10 mM Tris puferu na pH 7,4 nije došlo do autooksidacije samog Epi. Karakterističan spektar Epi koji pokazuje maksimum na 280 nm ostao je nepromenjen tokom 60 minuta snimanja (slika 4.10a). Nakon inkubacije Epi sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima na većim talasnim dužinama dolazi do pojave novih traka koje se mogu pripisati obojenim Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksima (slika 4.10b).



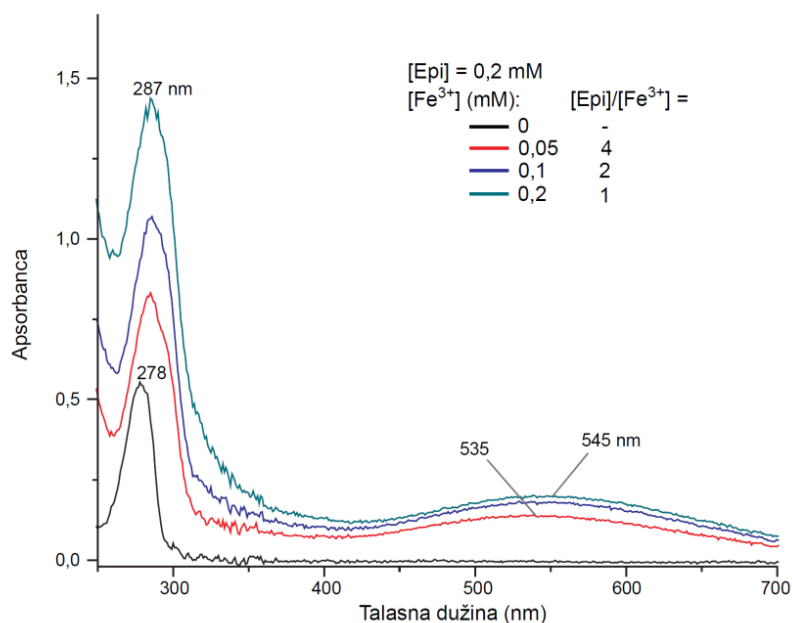
**Slika 4.10** UV/Vis spektari Epi i  $\text{Fe}^{3+}$  jona u 10 mM Tris puferu, pH 7,4; (a) 0,2 mM Epi i 0,2 mM  $\text{Fe}^{3+}$ ; (b) 0,2 mM Epi u prisustvu 0,05 mM  $\text{Fe}^{3+}$ ; 0,1 mM  $\text{Fe}^{3+}$ ; 0,2 mM  $\text{Fe}^{3+}$  ili 0,4 mM  $\text{Fe}^{3+}$  (inkubacija od 30

minuta). Isprekidane linije predstavljaju sumu eksperimentalnih spektara za različite koncentracione odnose,  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 4$  i  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$  (podeljeno sa 2, crna linija) i  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$  i  $[Fe^{3+}] = 0,2$  mM (bleda linija); (c) 0,4 mM Epi u prisustvu 0,1 mM  $Fe^{3+}$ ; 0,4 mM  $Fe^{3+}$  ili 0,6 mM  $Fe^{3+}$  (inkubacija od 30 minuta). Isprekidane linije predstavljaju sumu eksperimentalnih spektara za  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$  i slobodne  $[Fe^{3+}] = 0,2$  mM; (d) Stabilnost Epi u prisustvu  $Fe^{3+}$  određena HPLC metodom; (e) Promene u UV/Vis spektru za različite  $[Epi]/[Fe^{3+}]$  odnose tokom inkubacionog perioda od 30 minuta. U svim sistemima  $[Epi] = 0,2$  mM. Radi jasnoće opsezi (400 nm - 700 nm) i (260 nm - 350 nm) su prikazani odvojeno (zelena linija prikazuje apsorpciju samog Epi).

Da bi se ispitala stehiometrija kompleksa ispitano je nekoliko  $[Epi]/[Fe^{3+}]$  koncentracionih odnosa (4; 2; 1 i 0,5).  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 4$  pokazuje široku traku sa  $\lambda_{max} = 505$  nm, koja se pri  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$  pomera do  $\lambda_{max} = 545$  nm. Sa daljim smanjenjem  $[Epi]/[Fe^{3+}]$ , tj. povećanjem koncentracije  $Fe^{3+}$  jona, ne dolazi do promene apsorpcionog maksimuma i intenziteta trake. Spektar  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 0,5$  odgovara zbiru eksperimentalnih spektara slobodnog  $[Fe^{3+}] = 0,2$  mM i  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$ , što ukazuje da je najmanja stehiometrija 1, odnosno da se za jedan molekul Epi vezuje jedan jon  $Fe^{3+}$ . Takođe spektar  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 2$  sistema odgovara zbiru spektara za  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 4$  i  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$ , što je prikazano na slici 4.10b. Slični rezultati su dobijeni za sisteme sa duplo većom koncentracijom Epi ( $[Epi] = 0,4$  mM). Na 545 nm apsorbanca  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$  sistema je 2 puta veća za  $[Epi] = 0,4$  u odnosu na  $[Epi] = 0,2$  mM.

Ovi rezultati ukazuju da za dati odnos koncentracija dolazi do formiranja istog kompleksa nezavisno od koncentracije Epi, i prikazani su na slici 4.10c. HPLC rezultati pokazuju da  $Fe^{3+}$  joni ne dovode do vidljive degradacije Epi (slika 4.10d). Praćenjem apsorpcionih spektara tokom vremena pokazano je da za  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 4$  sistem apsorbanca na 505 nm postepeno raste tokom 15 minuta snimanja, dok se na nižim  $[Epi]/[Fe^{3+}]$  odnosima apsorpcioni maksimum pomera, u toku 5 minuta, sa 505 nm na 520 nm ili 545 nm (slika 4.10e). Ovi rezultati su pokazali da na fiziološkoj vrednosti pH 7,4 ne dolazi do autooksidacije samog Epi, što je u suprotnosti sa ranijim studijama koji pokazuju da dugom inkubacijom Epi u multikomponentnim puferima dolazi do spontane autooksidacije Epi<sup>10,176</sup>. Duga inkubacija u ovim puferima dovodi do razgradnje Epi usled prisustva tragova metala, kao što je  $Cu^{2+}$  koji zbog svojih redoks osobina indukuje brzu degradaciju Epi. Iako studije ističu da na fiziološkom pH dolazi do autooksidacije Epi<sup>2,177,178</sup>, kinetička istraživanja koja su u fosfatnom puferu sprovedli Čei (*Chaix*) i saradnici pokazala su da ovaj mehanizam autooksidacije ne važi. Oksidacija Epi zavisi od formiranja kompleksa Epi-metal ( $Cu$ ,  $Ni$  ili  $Mn$ ). Pri čemu stepen oksidacije zavisi od pH vrednosti kao i od vrste metalnog jona<sup>34</sup>. Redoks potencijal semihinon/Epi para pri pH = 7 je mnogo veći u odnosu na redoks potencijal  $O_2/O_2^{\bullet-}$  para<sup>12</sup>. Prema tome, Epi ne može direktno redukovati  $O_2$  na fiziološkoj pH vrednosti. S druge strane, deprotonovani Epi je podložan autooksidaciji, ali to je relevantno samo pri visokim pH vrednostima jer  $pK_{a1}$  vrednost za Epi iznosi 8,6<sup>32</sup>.

Kompleksu 3:1 prethodilo je formiranje 1:1 kompleksa na niskom  $[Epi]/[Fe^{3+}]$ . Dakle, traka na 505 nm nije povezana sa formiranjem hinona ili nekih drugih proizvoda. Dodatno, na 480 nm nije dobijena traka koja je karakteristična za adrenohrom, glavni proizvod oksidacije Epi. Ovi rezultati ukazuju da Epi u prisustvu  $Fe^{3+}$  jona gradi stabilne komplekse i da  $Fe^{3+}$  joni ne indukuju razgradnju Epi, što nije u skladu sa nekim literaturnim podacima, koji govore o oksidaciji Epi u prisustvu  $Fe^{3+}$  jona. Međutim ovi eksperimenti su rađeni u drugačijim eksperimentalnim uslovima, na primer u jako kiseljoj sredini<sup>19,20</sup>. Takođe, i eksperimenti koji su vršeni u multikomponentnim puferima doveli su do razgradnje Epi u prisustvu  $Fe^{3+}$  jona, verovatno zbog prisustva tragova  $Cu^{2+}$  jona u različitim solima<sup>10</sup>.

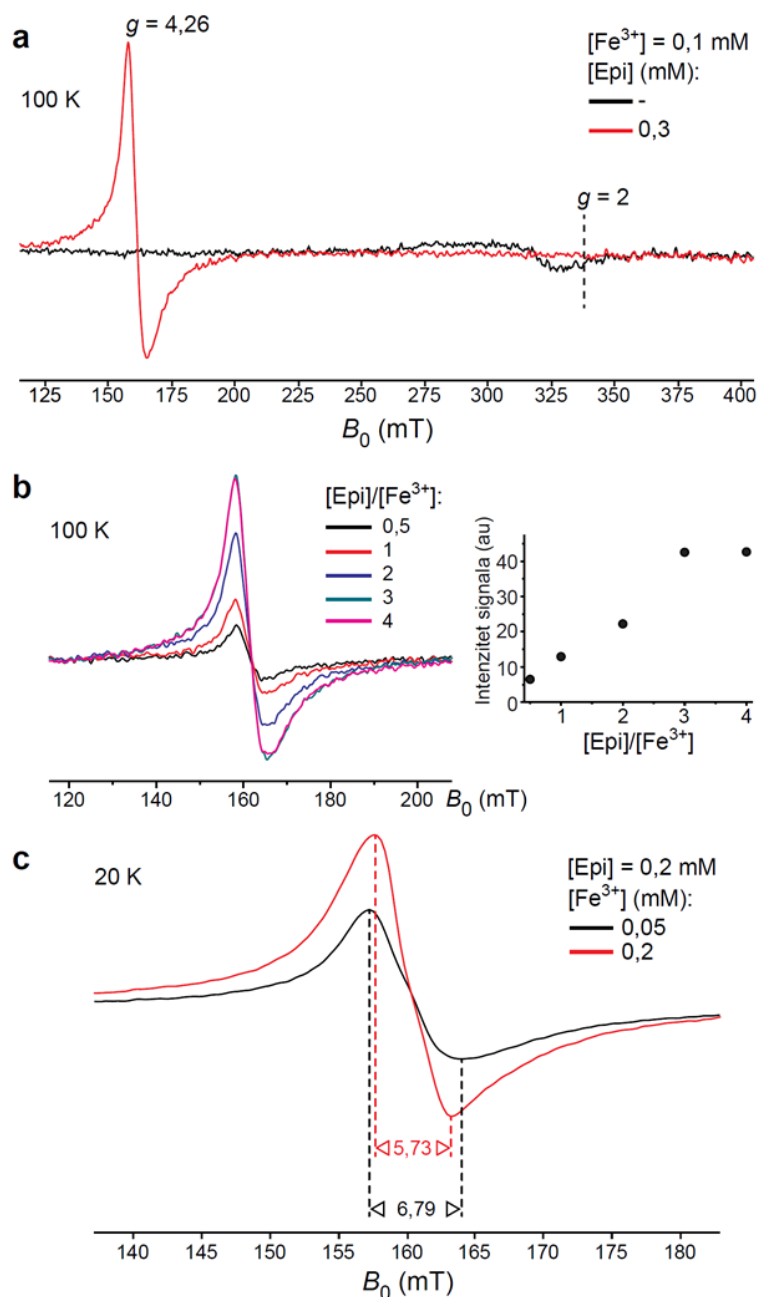


**Slika 4.11** UV/Vis spektri Epi i Fe<sup>3+</sup> jona u 10 mM kalijum-fosfatnom puferu, pH 7,4.

Na slici 4.11. prikazani su UV/Vis spektri Epi sa Fe<sup>3+</sup> jonima u 10 mM kalijum-fosfatnom puferu. U poređenju sa Tris puferom, inkubacijom Epi sa Fe<sup>3+</sup> jonima u fosfatnom puferu nastaje isti kompleks i pri velikim kao i pri malim [Epi]/[Fe<sup>3+</sup>] odnosima koji pokazuje  $\lambda_{\max} = 545$  nm, što je verovatno povezano sa visokim afinitetom fosfata za Fe<sup>3+</sup> jone. Spektar je sniman tokom 15 minuta inkubacije Epi sa Fe<sup>3+</sup> jonima i nije se menjao tokom 60 minuta. Drugim rečima u fosfatnom puferu na pH 7,4 Epi sa Fe<sup>3+</sup> jonima gradi 1:1 kompleks.

#### 4.2.2 Strukturna analiza epinefrin-Fe<sup>3+</sup> kompleksa primenom EPR spektroskopije

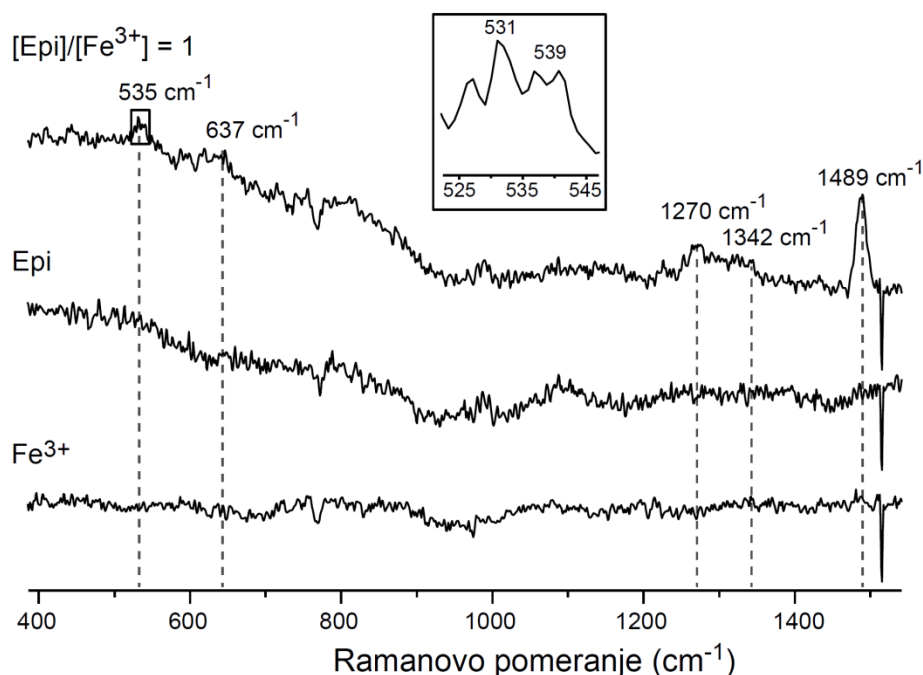
Da bi se odredio ukupni kvantni spinski broj, odnosno magnetne osobine Fe<sup>3+</sup> jona u Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksima, korišćena je EPR spektroskopija na niskim temperaturama. 100 K EPR spektar za 0,1 mM Fe<sup>3+</sup> u 10 mM Tris puferu, prikazan na slici 4.12a, pokazuje slab signal niskospinskog Fe<sup>3+</sup> jona ( $S = 1/2$ ) čija je  $g$ -vrednost oko 2. U prisustvu Epi nastaje jak signal ( $g = 4,26$ ), koji potiče od visokospinskih Fe<sup>3+</sup> jona ( $S = 5/2$ ) u okruženju sa ortorombičnom simetrijom. Takođe je ovom metodom određivan i maksimalan broj molekula Epi koji je moguće vezati za jedan Fe<sup>3+</sup> jon. Ovi rezultati su prikazani na slici 4.12b. U ovim eksperimentima koncentracija Epi je povećavana od 0,05 mM do 0,4 mM, dok je koncentracija Fe<sup>3+</sup> jona držana konstantnom (0,1 mM). Dvostruki integral signala visokospinskog Fe<sup>3+</sup> raste sa povećanjem [Epi] dostižući maksimalnu vrednost na [Epi]/[Fe<sup>3+</sup>]=3. Ovim je potvrđeno da je maksimalna stehiometrija Epi:Fe<sup>3+</sup> = 3:1. Ovo takođe ukazuje da su oba kompleksa i 3:1 i 1:1 visokospinski kompleksi. Širina signala na 100 K ( $g = 4,26$ ) za sve ispitivane odnose je manja od 7,4 mT. S obzirom da je širina linije EPR spektra temperaturno zavisna veličina, a da bi se dobilo više informacija o simetriji kompleksa, snimani su i spektri na nižoj temperaturi (20 K), što je i prikazano na slici 4.10c.



**Slika 4.12** EPR spektri Fe<sup>3+</sup> jona u 10 mM Tris puferu, pH 7,4, snimljeni na niskim temperaturama. **(a)** 100 K EPR spektar Fe<sup>3+</sup> jona u odsustvu ili prisustvu Epi; **(b)** 100 K EPR spektar (levo) i intenzitet Fe<sup>3+</sup> signala,  $g = 4,26$  (desno) za različite [Epi]/[Fe<sup>3+</sup>] odnose; [Fe<sup>3+</sup>] = 0,1 mM u svim uzorcima; **(c)** 20 K EPR spektar 0,067 mM i 0,2 mM Fe<sup>3+</sup> jona u prisustvu 0,2 mM Epi. Širine linija su prikazane u mT. Svi uzorci su zamrzavani nakon 15 minuta inkubacije na 293 K.

Na 20 K, dobijene su razlike u širini linije signala ( $g = 4,26$ ) između [Epi]/[Fe<sup>3+</sup>] = 3 i [Epi]/[Fe<sup>3+</sup>] = 1. Signal Fe<sup>3+</sup> jona je širi na nižoj koncentraciji Fe<sup>3+</sup> jona (0,067 mM; [Epi]/[Fe<sup>3+</sup>] = 3) nego na višoj (0,2 mM Fe<sup>3+</sup>; [Epi]/[Fe<sup>3+</sup>] = 1) za 1,1 mT. Međutim, intenzitet signala 0,067 mM Fe<sup>3+</sup> je ~1,6 puta manji od 0,2 mM Fe<sup>3+</sup>, iako je koncentracija gvožđa bila 3 puta manja. Ovo ukazuje na različitu simetriju kompleksa 3:1 i 1:1, kao i da kompleks 3:1 pokazuje veću anizotropiju, a ne može se pripisati paramagnetnim svojstvima samog gvožđa. Rezultati su u skladu sa prethodnim proučavanjima interakcija kateholamin-bogatih peptida sa Fe<sup>3+</sup> jonima, koja su vršena metodom niskotemperaturne EPR spektroskopije<sup>179</sup>.

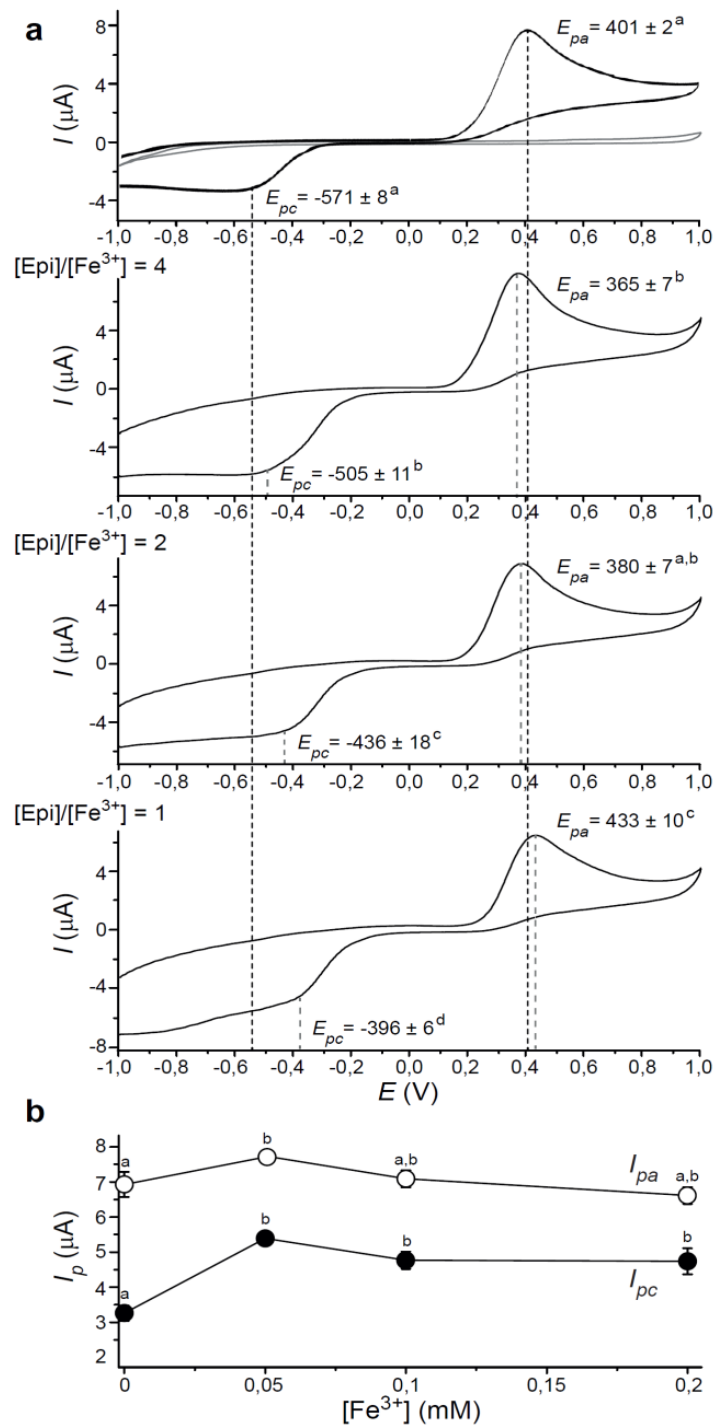
### 4.2.3 Strukturna analiza epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa primenom Ramanove spektroskopije



**Slika 4.13** Ramanovi spektri 0,2 mM Epi sa ili bez 0,2 mM  $\text{Fe}^{3+}$ , u 10 mM fosfatnom puferu, pH 7,4. Poređenja radi prikazan je spektar 0,2 mM  $\text{Fe}^{3+}$  jona. Spektri su snimljeni nakon 15 minuta inkubacije, korišćenjem lasera čija je ekscitacija na 532 nm.

Vezivanje  $\text{Fe}^{3+}$  jona za Epi proučavano je korišćenjem Ramanove spektroskopije, što je prikazano na slici 4.13. Amidna grupa koja potiče od Tris pufera pokazuje traku u Ramanovom spektru u oblasti koja je od interesa za proučavanje interakcija Epi i  $\text{Fe}^{3+}$  jona. Zbog toga su ovi eksperimenti rađeni u 10 mM fosfatnom puferu, pH 7,4. Formiranje kompleksa u fosfatnom puferu je praćeno i potvrđeno i UV/Vis spektroskopijom; spektri su prikazani na slici 4.11. Ramanov spektar Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa pokazuje trake na 535  $\text{cm}^{-1}$ , 637  $\text{cm}^{-1}$ , 1270  $\text{cm}^{-1}$ , 1342  $\text{cm}^{-1}$  i 1489  $\text{cm}^{-1}$  što je prikazano na slici 4.13. Pozicija traka odgovara prethodno prikazanim Ramanovim spektrima  $\text{Fe}^{3+}$ -kateholaminskih biopolimera i metalo-organskih mreža (*metal-organic frameworks*)<sup>22,180</sup>. U odsustvu  $\text{Fe}^{3+}$  jona ove trake su zanemarljivo male. Literaturni podaci pokazuju da interakcija kateholaminskih ostataka u biopolimerima sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima drastično povećava amplitudu Ramanovih traka<sup>22,181</sup>. Pojava traka u prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  jona može se povezati sa činjenicom da je ekscitacija lasera na talasnoj dužini od 532 nm blizu elektronskog prelaza Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa ( $\lambda_{\text{max}} = 545$  nm), dok je daleko od apsorpcije samog Epi ( $\lambda_{\text{max}} = 280$  nm). U prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  jona dolazi do rasta signala na 1489  $\text{cm}^{-1}$  što se može pripisati vibraciji kateholnog prstena<sup>22,180</sup>. Drugi značajni signali javljaju se na: 1342  $\text{cm}^{-1}$ , C-H savijanje; 1270  $\text{cm}^{-1}$ , C-O istezanje; 637  $\text{cm}^{-1}$ , Fe-O istezanje; ~535  $\text{cm}^{-1}$ , savijanje/istezanje kompleksa<sup>22,181</sup>. Traka, koja se javlja na ~535  $\text{cm}^{-1}$  i sastoji se od dve trake, rezultat je vezivanja  $\text{Fe}^{3+}$  jona za dva neznatno različita O atoma kateholnog prstena bidentatnog kompleksa<sup>24,182</sup>. Ranija kristalografska istraživanja su pokazala da traka na 637  $\text{cm}^{-1}$  najverovatnije potiče od savijanja kateholnog prstena sa O- $\text{Fe}^{3+}$ -O<sup>183</sup>. Takođe je pokazano i da centralne trake na 1270  $\text{cm}^{-1}$  i 1342  $\text{cm}^{-1}$  u prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  jona potiču od savijanja Fe-O veze<sup>180</sup>.

#### 4.2.4 Redoks analiza epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa primenom ciklične voltametrije

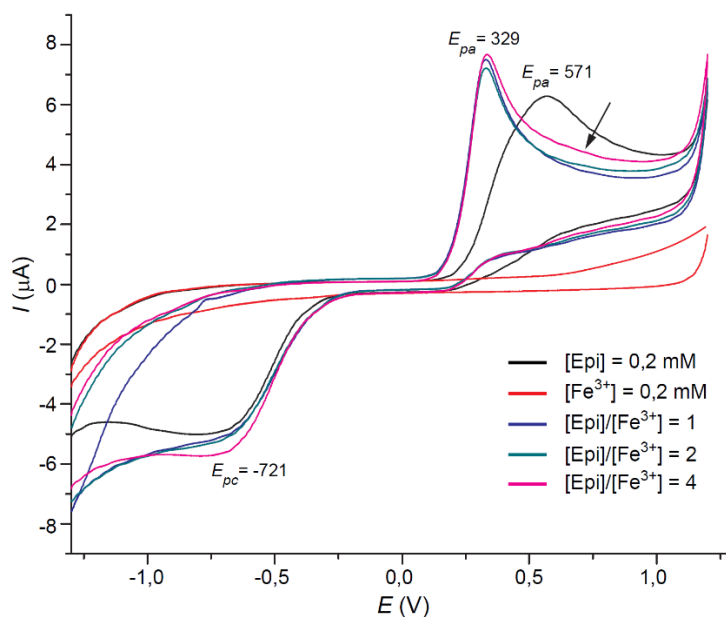


**Slika 4.14** Ciklični voltamogrami 0,2 mM Epi u 10 mM Tris puferu, pH 7,4, sa ili bez prisustva  $\text{Fe}^{3+}$  jona u različitim koncentracijama, dobijeni korišćenjem BDD radne elektrode. (a) Od vrha prema dnu: Epi (tamna linija) i  $\text{Fe}^{3+}$  (0,2 mM; svetla linija), i  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 4; 2$  i 1. Pozicije signala oksidacionog/anodnog ( $E_{pa}$ ) i redukcionog/katodnog ( $E_{pc}$ ) potencijala su označene isprekidanim linijama (tamno – sistem bez gvožđa; svetlo – ostali sistemi).  $E_{pa}$  i  $E_{pc}$  su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm \text{SE}$  (mV); (b) Srednje vrednosti ( $\pm \text{SE}$ ) maksimalnih vrednosti anodnih ( $I_{pa}$ ; beli krugovi) i katodnih ( $I_{pc}$ ; crni krugovi) struja u cikličnom voltamogramu Epi sa različitim  $[\text{Fe}^{3+}]$ . Brzina skeniranja iznosila je 0,1 V/s.  $E_{pa}$  i  $E_{pc}$ ,  $I_{pa}$  i  $I_{pc}$  pokazuju statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ).

Ciklična voltametrija je primenjena da se ispita efekat  $\text{Fe}^{3+}$  jona na redoks osobine epinefrina (slika 4.14). Ciklični voltamogram Epi- $\text{Fe}^{3+}$  sistema pokazuje da je redoks aktivnost vezana za ligand (slika 4.14a), s obzirom da  $\text{Fe}^{3+}$  jon nema signal koji bi se detektovao. Ovo je u



skladu sa teorijskim podacima prikazanim na slici 1.5, da na fiziološkom pH dolazi do formiranja amorfnog  $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa sa  $\text{OH}^-$  jonima. U prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  jona dolazi do promena u oksidacionom ponašanju Epi. Rezultati pokazuju da se pri odnosima  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 4$  i  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 1$   $E_{pa}$  pomera prema negativnim vrednostima  $E$ , odnosno pozitivnim vrednostima  $E$  u odnosu na sami Epi.  $E_{pa}$  i  $I_{pa}$  vrednosti za  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 2$  odnos nalaze se između vrednosti za druga dva odnosa. Ovaj rezultat je u skladu sa UV/Vis spektroskopijom, slika 4.10. Pri bržim i sporijim brzinama skeniranja su dobijene slične vrednosti  $E_{pa}$  za Epi i različite koncentracione odnose  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}]$  (prilog 2). Literaturni podaci pokazuju da signal koji potiče od oksidacije Epi odgovara  $E_{pa} \sim 400$  mV, a da signal koji potiče od redukcije oksidujućih produkata odgovara  $E_{pc} \sim -570$  mV<sup>184</sup>. Odnos oksidujuće i redukujuće struje je značajno veći od 1 (slika 4.14b), što ukazuje da je prenos elektrona ireverzibilan proces. Ovo se može objasniti nestabilnošću i polimerizacijom oksidacionih produkata Epi<sup>185</sup>. Iz tog razloga su analizirane anodne struje. Na ovoj slici prikazana je i linearna zavisnost  $I_{pa}$  i  $I_{pc}$  od kvadratnog korena brzine skeniranja što govori o tome da struje uglavnom zavise od dva parametra: brzine kojom redoks vrste mogu da difunduju do površine elektrode ( $D$ ) i konstante brzine prenosa elektrona ( $k_s$ ). Ostale interakcije, kao što je adsorpcija, su zanemarljive<sup>186</sup>. Vrednosti  $D$  i  $k_s$  su izračunate korišćenjem Randl-Ševčik jednačine i Nikolson-Šejn (*Nicholson Shain*) metode<sup>187,188</sup>. Pri koncentracionom odnosu  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 4$  difuzija prema anodi je brža, dok je pri odnosu  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 1$  difuzija sporija u odnosu na sam Epi. Ovo se može objasniti formiranjem različitih kompleksa Epi sa gvožđem. Prenos elektrona sa Epi do anode je posebno izražen kod  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 1$  (prilog 2), što može biti povezano sa delokalizacijom aromatičnih  $\pi$  elektrona u prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  jona.



**Slika 4.15** Ciklični voltamogram Epi u odsustvu ili prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  jona u 10 mM kalijum-fosfatnom puferu, pH 7,4, dobijen korišćenjem BDD radne elektrode; Predstavljene su oksidacioni/anodni ( $E_{pa}$ ) i redukcionni/katodni ( $E_{pc}$ ) potencijali; Brzina skeniranja je iznosila 0,1 V/s.

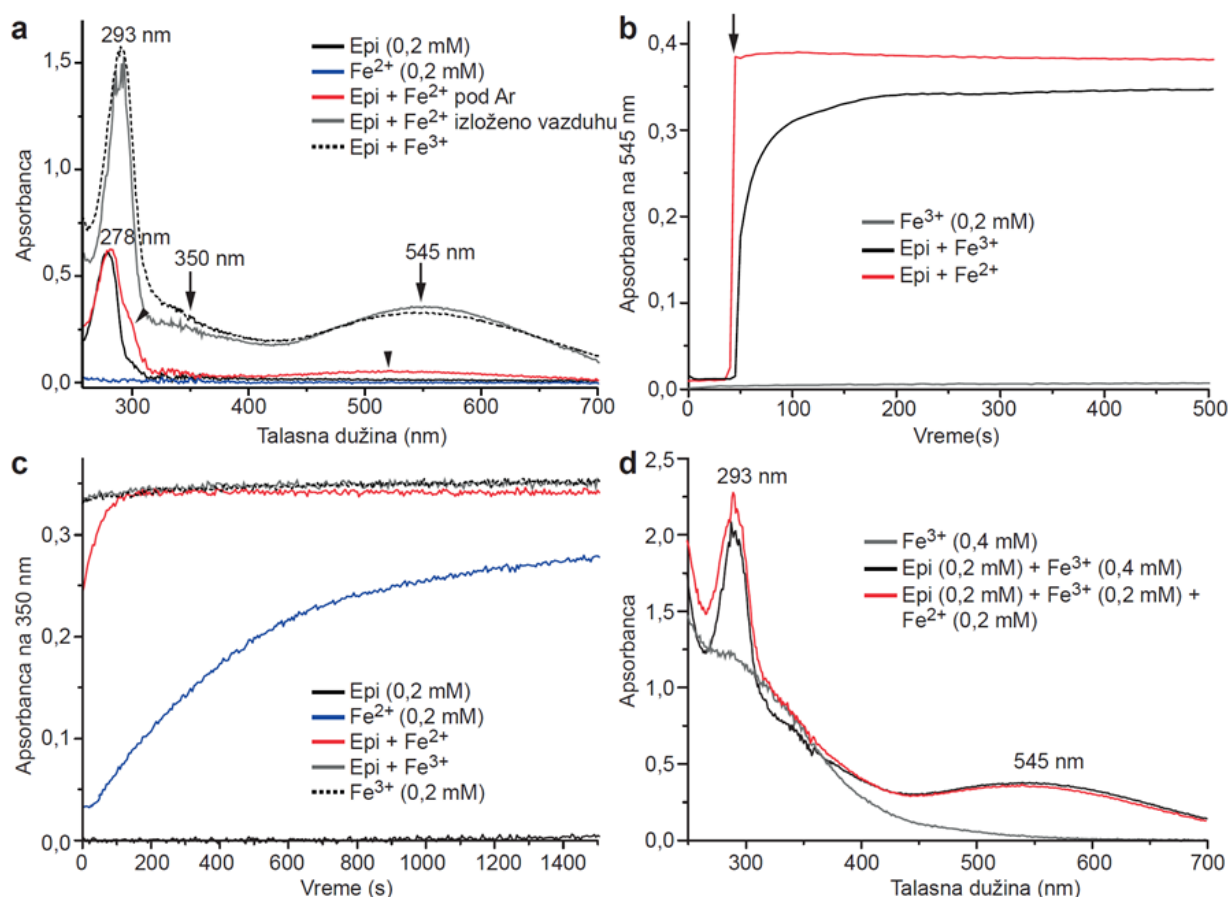
Takođe je ispitana interakcija Epi sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima u fosfatnom puferu. Ovi rezultati su prikazani na slici 4.15. Rezultati pokazuju da se formira isti kompleks pri višim kao i pri nižim  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}]$  odnosima. Oni su u skladu sa rezultatima dobijenim UV/Vis spektroskopijom u fosfatnom puferu, slika 4.11. Kompleks pokazuje nižu  $E_{pa}$  vrednost u odnosu na slobodni Epi.

Elektrohemijski podaci pokazuju da  $\text{Fe}^{3+}$  joni ne utiču drastično na redoks osobine Epi u Tris puferu, dok je Epi u 1:1 kompleksu u fosfatnom puferu podložniji oksidaciji od slobodnog Epi. Rezultati dobijeni cikličnom voltametrijom pokazuju da  $\text{Fe}^{3+}$  joni ne promovišu u značajnoj meri oksidaciju Epi. Zato je Epi stabilan u prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  jona, što je i potvrđeno HPLC i UV/Vis metodama.

## 4.3 Interakcija epinefrina sa $\text{Fe}^{2+}$ jonima

### 4.3.1 Kompleks epinefrina i $\text{Fe}^{2+}$ i kinetika formiranja epinefrin- $\text{Fe}^{3+}$ kompleksa polazeći od $\text{Fe}^{2+}$ jona

U anaerobnim uslovima molekul Epi u prisustvu jona  $\text{Fe}^{2+}$  ne dovodi do promene u UV/Vis spektru, što bi ukazivalo da Epi sa  $\text{Fe}^{2+}$  jonima gradi bezbojni kompleks (slika 4.16a). Ranije je pokazano da kateholi u prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$  jona grade protonovan 1:1 kompleks<sup>189</sup>. Takođe, pokazano je da pri visokim koncentracijama DA u prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$  jona nastaje bezbojni mono kompleks DA- $\text{Fe}^{2+}$  koji se u prisustvu  $\text{O}_2$  konvertuje do stabilnijeg DA<sub>2</sub>- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa. Direktna interakcija između DA i  $\text{Fe}^{2+}$  dovodi do stvaranja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tako da kompleksiranjem  $\text{Fe}^{2+}$  jona dopamin ima zaštitnu ulogu sprečavajući  $\text{Fe}^{2+}$  jone da reaguju sa stvorenim  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>190</sup>.

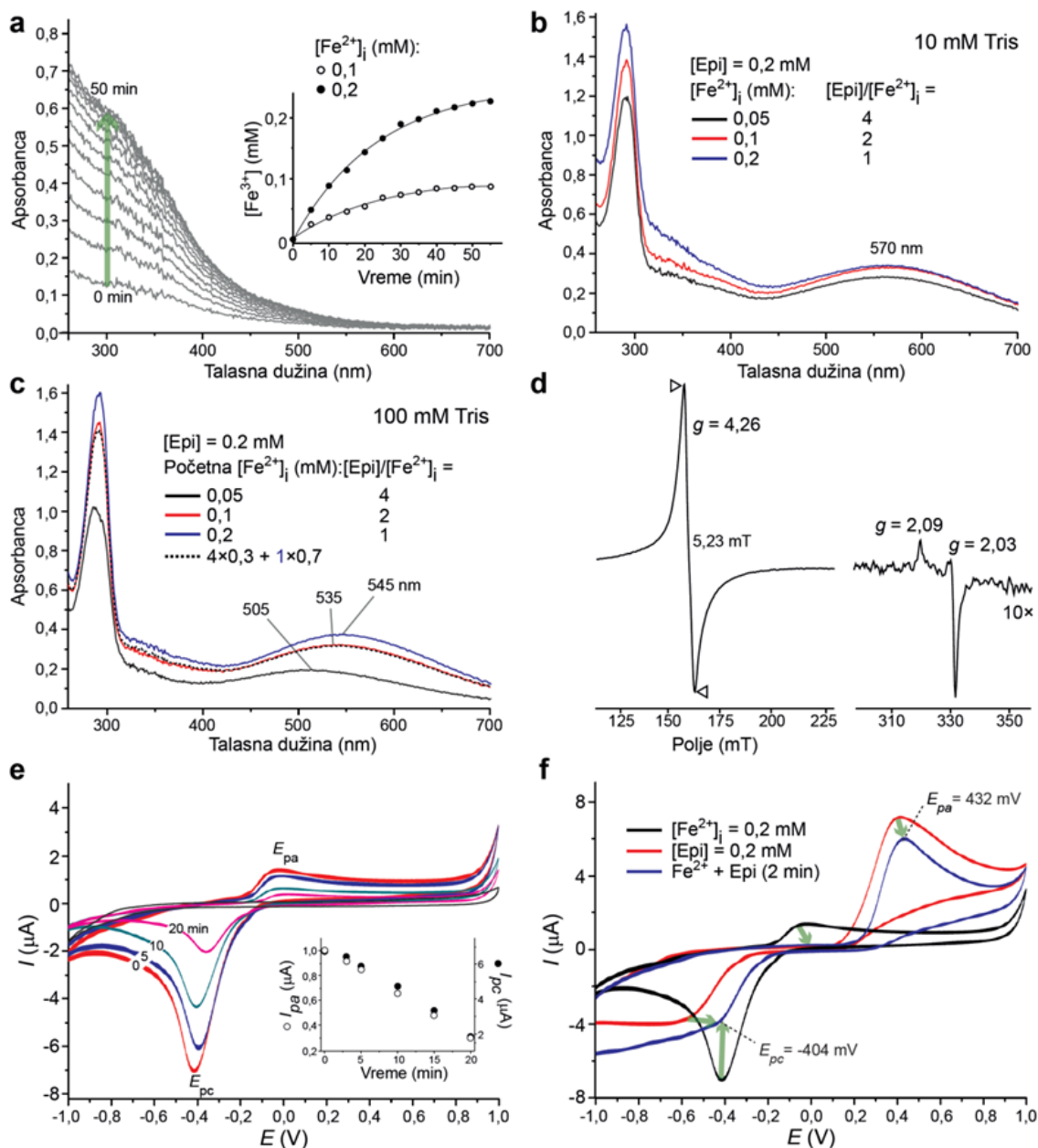


**Slika 4.16** UV/Vis spektar Epi u prisustvu ili odsustvu  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  jona u 100 mM Tris pufereu, pH 7,4; (a) UV/Vis spektar Epi (0,2 mM) u prisustvu i odsustvu  $\text{Fe}^{2+}$  jona (0,2 mM); Svi uzorci su pripremljeni u striktnim anaerobnim uslovima pod atmosferom argona i pakovani u kivete koje su onda čvrsto zatvorene teflonskim čepom; Epi/ $\text{Fe}^{2+}$  sistem je zatim otvaranjem kivete bio izložen  $\text{O}_2$  (prikazani spektar je snimljen nakon 10 minuta inkubacije na vazduhu); Isprekidane linije – referentni spektar Epi/ $\text{Fe}^{3+}$  sistema (0,2 mM/0,2 mM); Vrhovi strelica – trake koje nastaju zbog tragova kiseonika što dovodi do oksidacije  $\text{Fe}^{2+}$  jona i formiranja Epi- $\text{Fe}^{3+}$ ; Strelice – trake od interesa za kinetičku analizu: apsorpcioni maksimum za  $\text{Fe}^{3+}$  – 350 nm; apsorpcioni maksimum za Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleks – 545 nm; (b) Promena apsorbanca na 545 nm Epi/ $\text{Fe}^{2+}$  (0,2 mM/0,2 mM) i Epi/ $\text{Fe}^{3+}$  (0,2 mM/0,2 mM) sistem; (c) Promena apsorbanca 350 nm u različitim sistemima sa  $\text{Fe}^{2+}$  ili  $\text{Fe}^{3+}$  jonima (0,2 mM), sa ili bez Epi (0,2 mM); (d) Spektar Epi (0,2 mM) +  $\text{Fe}^{3+}$  (0,4 mM) (nakon 15 minuta inkubacije) upoređen sa spektrom Epi (0,2 mM) +  $\text{Fe}^{3+}$  (0,2 mM) +  $\text{Fe}^{2+}$  (0,2 mM) nakon 30 minuta inkubacije.

U prisustvu O<sub>2</sub> dobijen je UV/Vis spektar koji odgovara Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksu sa 1:1 stehiometrijskim odnosom. Ovaj rezultat pokazao je da dolazi do oksidacije Fe<sup>2+</sup> jona u Fe<sup>3+</sup> jon. Kinetika formiranja Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksa u Epi/Fe<sup>2+</sup> i Epi/Fe<sup>3+</sup> sistemima, kao i oksidacija Fe<sup>2+</sup> jona u prisustvu i odsustvu Epi, analizirana je praćenjem promena apsorbanca na 545 nm i 350 nm. ApSORPCIONI maksimum na 545 nm odgovara Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksu, dok apSORPCIONI maksimum na 350 nm odgovara Fe<sup>3+</sup> jonima. Ovi maksimumi pokazuju najmanje preklapanja između sebe te su najbolji za praćenje navedenih procesa. Na slici 4.16b pokazano je da se Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleks mnogo brže formira kada se krene sa Epi/Fe<sup>2+</sup> sistemom u odnosu na Epi/Fe<sup>3+</sup> sistem. Brzine formiranja kompleksa dobijene eksponencijalnim fitovanjem iznose  $50 \times 10^{-5} \text{ mM s}^{-1}$  za sistem Epi/Fe<sup>2+</sup> i  $2 \times 10^{-5} \text{ mM s}^{-1}$  za sistem Epi/Fe<sup>3+</sup>. Ovakav rezultat ukazuje da molekul Epi ima veći afinitet prema Fe<sup>2+</sup> jonima u poređenju sa Fe<sup>3+</sup> jonima, kao i da Fe<sup>2+</sup> joni u Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleksu podležu brznoj oksidaciji u prisustvu O<sub>2</sub>. Ovaj rezultat je potvrđen praćenjem kinetike oksidacije Fe<sup>2+</sup> jona (slika 4.16c). Oksidacija Fe<sup>2+</sup> jona je promovisana čak i u prisustvu Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksa (slika 4.16d), čime se dodatno potvrđuje visok afinitet Epi prema Fe<sup>2+</sup> jonima u odnosu na Fe<sup>3+</sup> jone.

### 4.3.2 *Epinefrin-Fe<sup>2+</sup> interakcija u aerobnim uslovima*

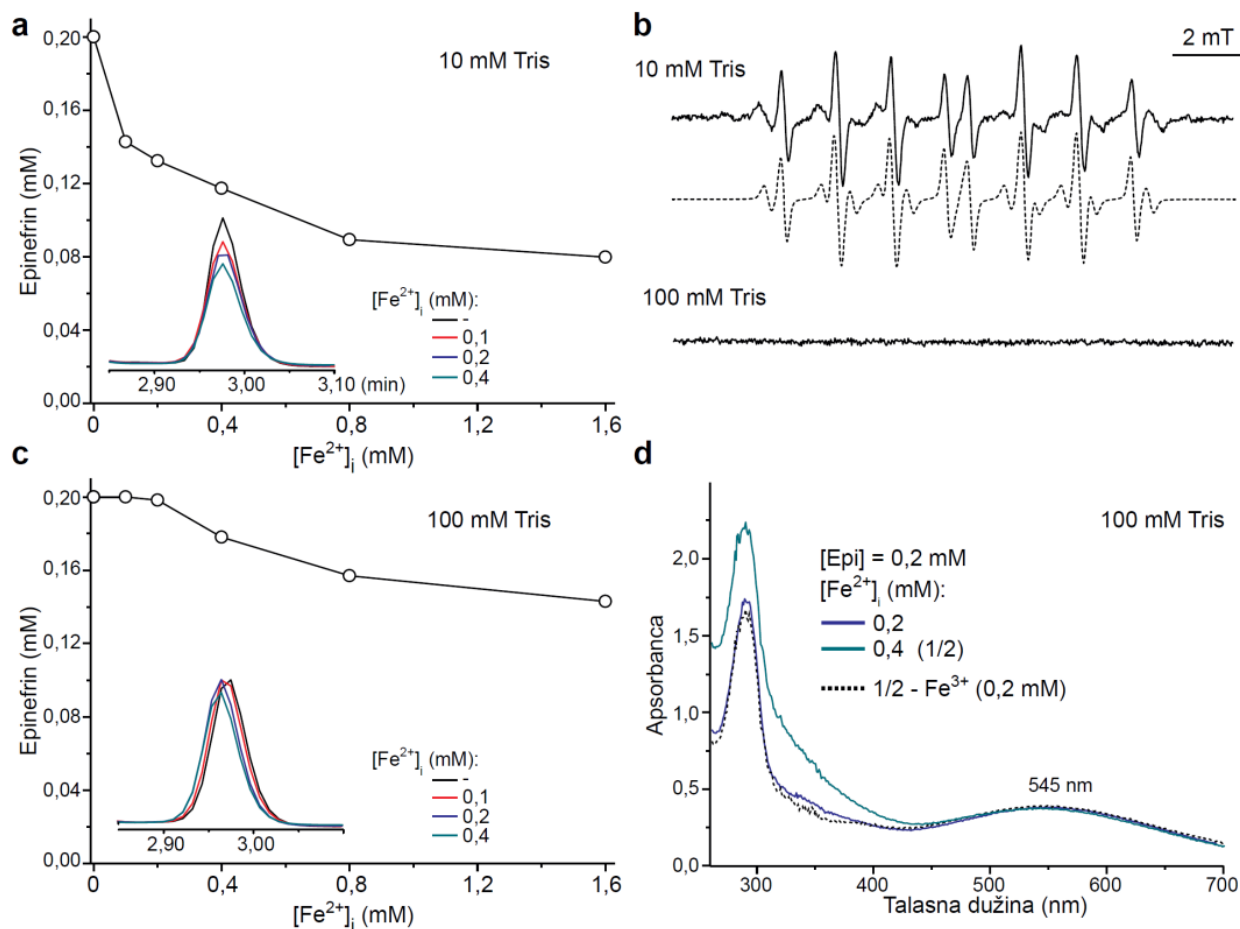
Na slici 4.17 prikazane su redoks interakcije Epi u prisustvu Fe<sup>2+</sup> jona. Oksidacija Fe<sup>2+</sup> jona do Fe<sup>3+</sup> jona, na pH 7,4, je značajno olakšana u prisustvu Epi (slike 4.17a i 4.17b). Slika 4.17a pokazuje da je oksidacija Fe<sup>2+</sup> jona u Tris puferu postepen proces u kome se plato dostiže nakon oko 30 minuta. Sa druge strane, u prisustvu Epi i O<sub>2</sub> dolazi do gotovo trenutnog formiranja Fe<sup>3+</sup> kompleksa po dodavanju Fe<sup>2+</sup> jona u rastvor Epi. U toku prvog minuta po dodavanju različitih početnih koncentracija Fe<sup>2+</sup> jona ([Fe<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) pojavljuje se široka traka na  $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$ . Traka na 570 nm dobijena je i ranije u Epi/Fe<sup>2+</sup> sistemima rađenim na pH 6, nižim vrednostima od fiziološke pH vrednosti, i pripisana je formiranju Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksa, što je praćeno oksidacijom Fe<sup>2+</sup> jona<sup>107,191</sup>. Međutim, očigledno pomeranje maksimuma apsorpcije u poređenju sa Epi/Fe<sup>3+</sup> sistemima prikazanim na slici 4.10 ukazuje da traka na 570 nm možda nastaje od nekih drugih vrsta, npr. proizvoda razgradnje Epi ili kompleksa koje Fe<sup>3+</sup> joni formiraju sa takvim proizvodima. Pod ovim uslovima Epi katalizujuća oksidacija Fe<sup>2+</sup> jona daje apSORPCIONE trake koje su karakteristične za Epi-Fe<sup>3+</sup> komplekse, i to: 505 nm za odnos [Epi]/[Fe<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 4 odnos i 545 nm za odnos [Epi]/[Fe<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 1 (slika 4.17c). Spektar za [Epi]/[Fe<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 2 predstavlja sumu spektara dobijenih u sistemima za ova dva molarna odnosa. Ovi rezultati potvrđuju konstataciju da je pomeranje maksimuma na 570 nm povezano sa razgradnjom samog Epi. Takođe, ovo ukazuje da Epi nije direktni reaktant u Fe<sup>2+</sup> oksidaciji već da deluje kao katalizator.



**Slika 4.17** Redoks interakcije 0,2 mM Epi sa  $\text{Fe}^{2+}$  jonima na pH 7,4; (a) UV/Vis spektar oksidacije 0,2 mM  $\text{Fe}^{2+}$  jona do  $\text{Fe}^{3+}$  jona u 10 mM Tris puferu; Dodatak: Nastajanje  $\text{Fe}^{3+}$  jona tokom spontane oksidacije 0,1 mM i 0,2 mM  $\text{Fe}^{2+}$  jona.  $[\text{Fe}^{3+}]$  je izračunata pomoću apsorbance na 300 nm i  $\text{FeCl}_3$  kalibracione krive. Eksponencijalna interpolacija ( $R^2 > 0,990$ ); (b) UV/Vis spektar Epi/ $\text{Fe}^{2+}$  sistema nakon inkubacije od 1 minuta u 10 mM Tris puferu; (c) UV/Vis spektar Epi/ $\text{Fe}^{2+}$  sistema nakon inkubacije od 1 minuta u 100 mM Tris puferu; (d) 20 K EPR spektar  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{2+}]_i = 2$  sistema u 10 mM Tris puferu nakon inkubacije od 1 minuta.  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  predstavlja početnu (inicijalnu) koncentraciju  $\text{Fe}^{2+}$  jona u rastvoru. Deo spektra pomnožen sa 10 (desno); (e) Vremenski zavisne promene cikličnog voltamograma i maksimalne struje ( $I_{pa}$  i  $I_{pc}$ )  $[\text{Fe}^{2+}]_i = 0,2$  mM u 10 mM Tris puferu dobijenih pomoću BDD radne elektrode; crna linija – ciklični voltamogram  $\text{Fe}^{3+}$  jona (0,2 mM); (f) Promene (označene strelicama) anodnih i katodnih potencijala ( $E$ ) i struja ( $I$ ) za  $\text{Fe}^{2+}$  jone i Epi u  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{2+}]_i = 2$  sistemu.

Brza oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  jona u prisustvu Epi je dodatno pokazana pomoću niskotemperaturnog EPR-a i CV.  $\text{Fe}^{2+}$  jon je nevidljiv u uslovima primenjenim ovde (perpendikularni modalitet rada EPR-a). Nakon dodatka Epi dobija se jak signal visokospinskog  $\text{Fe}^{3+}$  jona (slika 4.17d). Dodatno, linije koje su karakteristične za organski radikal, potvrđuju da je deo Epi razgrađen u 10 mM Trisu<sup>192</sup>. U sistemu sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima nije dobijen takav signal.

Dalje, ciklični voltamogram  $\text{Fe}^{2+}$  jona u Tris puferu pokazuje relativno sporo vremenski zavisno smanjenje  $I_{pa}$  i  $I_{pc}$  u odsustvu Epi (slika 4.17e). Ovo ukazuje na oksidaciju  $\text{Fe}^{2+}$  jona do  $\text{Fe}^{3+}$  jona koji su slabo rastvorni (formiraju slabo rastvorne komplekse sa  $\text{OH}^-$  jonima), i time postaju CV-neaktivni. U prisustvu Epi dolazi do brzih promena što je prikazano na slici 4.17f. Signali koji potiču od  $\text{Fe}^{2+}$  jona su smanjeni i ciklični voltamogram dobija oblik sa  $E_{pa}$  i  $I_{pa}$  vrednostima koji je analogan voltamogramima dobijenom za sistem koji sadrži  $\text{Fe}^{3+}$  jone ( $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 1$ ; slika 4.14a).

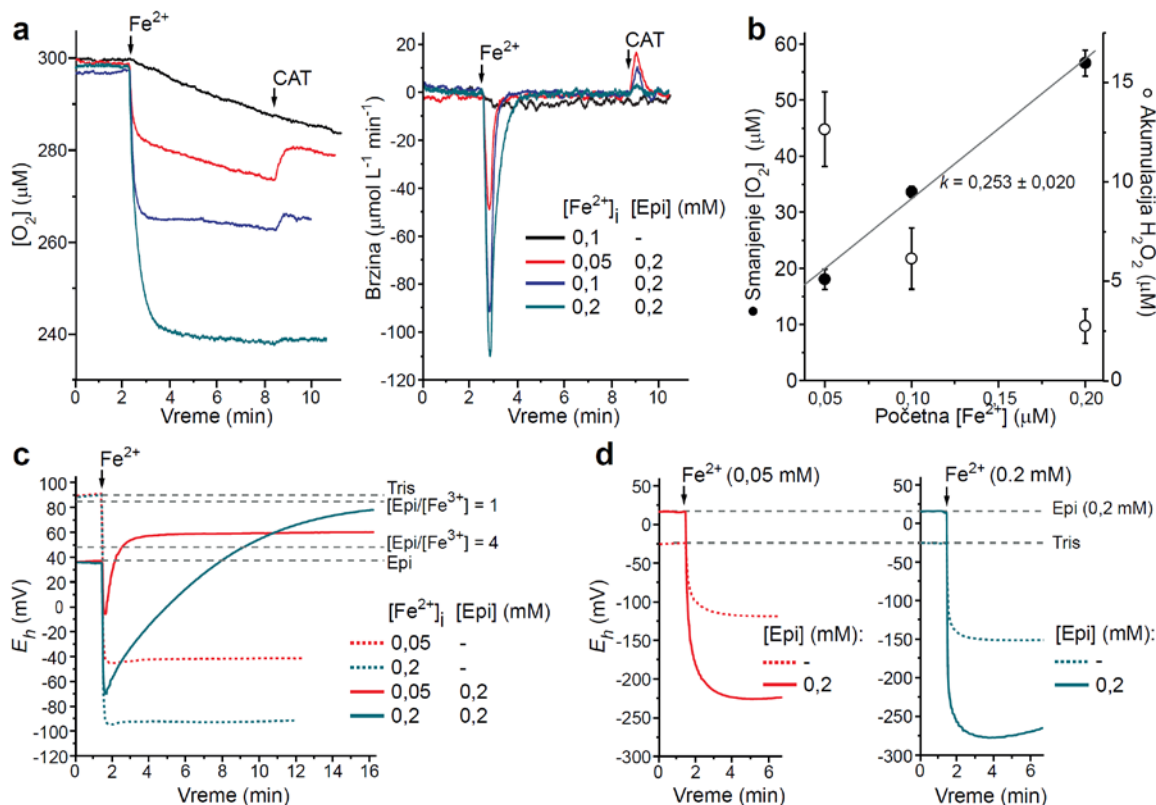


**Slika 4.18** Antioksidativne osobine 10 mM i 100 mM Tris pufera, pH 7,4; (a) Koncentracija Epi pri različitim  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  u 10 mM Tris puferu praćena tokom 5 minuta inkubacije; Dodatak: HPLC hromatogram Epi; (b) EPR spektri DEPMPO/OH spin-adukta (5 mM), ilustracija kapaciteta Tris pufera da ukloni hidroksil radikal ( $\text{HO}^\bullet$  - proizvod Fentonove reakcije); (c) Koncentracija Epi pri različitim  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  u 100 mM Tris puferu dobijena tokom 5 minuta inkubacije; Dodatak: HPLC hromatogram Epi; (d) UV/Vis spektar Epi/ $\text{Fe}^{2+}$  sistema nakon 5 minuta inkubacije u 100 mM Tris puferu; Oduzeti eksperimentalni spektri predstavljeni su isprekidanom linijom.

Na slici 4.18 prikazane su antioksidativne osobine 10 mM i 100 mM Tris pufera. Naime, redukcija  $\text{O}_2$  pomoću  $\text{Fe}^{2+}$  jona dovodi do proizvodnje različitih reaktivnih vrsta (tabela 1.1), uključujući  $\text{HO}^\bullet$ , koji deluje kao vrlo jak oksidans. Ove vrste uzrokuju degradaciju Epi, što je i pokazano pomoću HPLC metode (slika 4.18a), kao i sa UV/Vis metodom (slika 4.17b). Konstanta brzine reakcije Epi +  $\text{HO}^\bullet$  je za red veličine veća u odnosu na konstantu brzine reakcije Tris +  $\text{HO}^\bullet$  i iznosi:  $2,2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  za Epi +  $\text{HO}^\bullet$ , odnosno  $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  za Tris +  $\text{HO}^\bullet$  reakciju<sup>193,194</sup>. Zato je korišćena 10 puta veća koncentracija Tris-a (100 mM), koja može da „zaštiti“ Epi od  $\text{HO}^\bullet$  radikala. Drugim rečima, 100 mM Tris je upotrebljen kao antioksidativni pufer što je prikazano na slici 4.18c. Merenja EPR metodom sa spinskim hvatačem, slika 4.18b, pokazuju da 100 mM Tris ima značajno viši kapacitet da ukloni  $\text{HO}^\bullet$  u odnosu na 10 mM pufer. Kao što je i očekivano,

rezultati pokazuju da je razgradnja Epi u prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$  jona smanjena u 100 mM Trisu, dok je potpuno inhibirana u sistemima sa  $[\text{Fe}^{2+}]_i \leq 0,2$  mM. U skladu sa ovim, može se zaključiti da jedan molekul Epi može da promovise oksidaciju dva (i više)  $\text{Fe}^{2+}$  jona u 100 mM Tris-u.

### 4.3.3 Redoks analiza epinefrin- $\text{Fe}^{2+}$ interakcija primenom oksimetrije i redoks elektrode



**Slika 4.19** Promene u koncentraciji  $\text{O}_2$  i redoks potencijala ( $E_h$ ) Epi/ $\text{Fe}^{2+}$  sistema u 10 mM Tris puferu, pH 7,4; (a) Promene  $[\text{O}_2]$  indukovane različitim koncentracijama  $\text{Fe}^{2+}$  jona u odsustvu ili prisustvu 0,2 mM Epi (levo); Početna brzina potrošnje kiseonika praćena dodatkom  $\text{Fe}^{2+}$  (desno); (b) Kvantifikacija potrošnje  $\text{O}_2$  i akumulacije  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 s nakon dodatka  $\text{Fe}^{2+}$  jona ili CAT, respektivno;  $\text{H}_2\text{O}_2$  nastajanje je kvantifikovano pomoću CAT-indukovanog  $\text{O}_2$  oslobađanja ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \times \Delta[\text{O}_2]$ ); Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$ SE. (crni krugovi -  $[\text{O}_2]$ , beli krugovi -  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ); (c) Promene redoks potencijala 10 mM Tris pufera sa ili bez Epi, praćene dodatkom  $\text{Fe}^{2+}$  jona; (d) Promene redoks potencijala 10 mM Tris pufera (sistem bez  $\text{O}_2$ , pod  $\text{N}_2$  (g)), sa ili bez Epi, praćene dodatkom  $\text{Fe}^{2+}$  jona; Isprekidane linije označavaju redoks potencijale referentnih sistema (stabilni celo vreme).

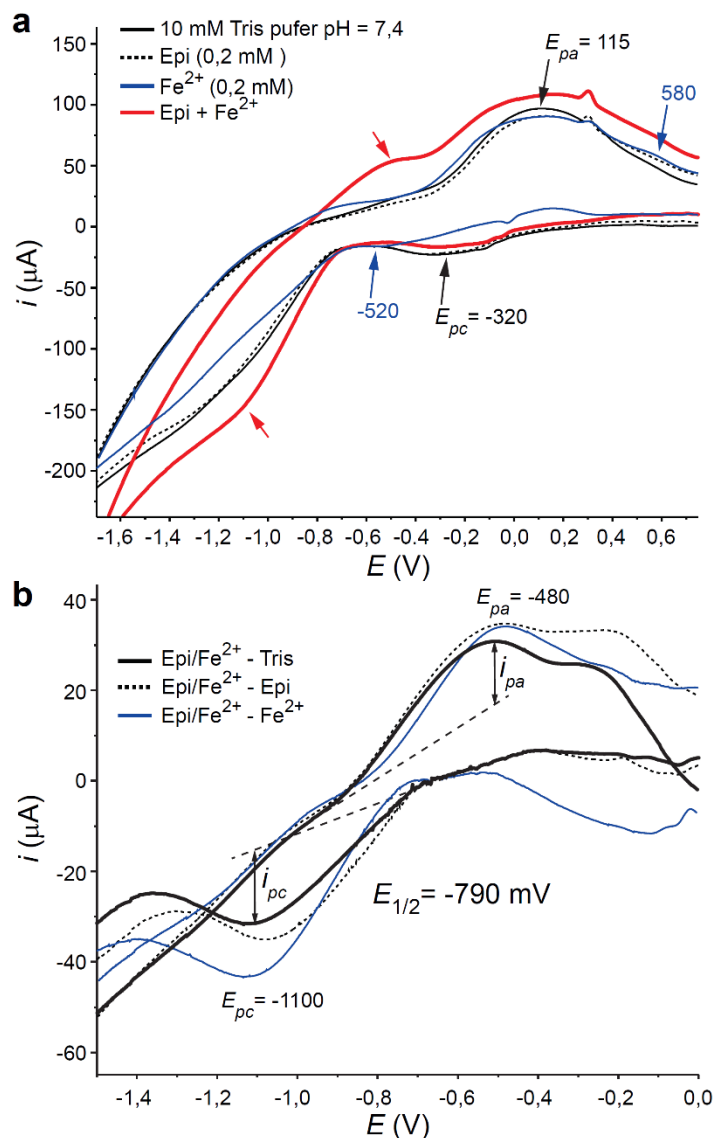
U cilju ispitivanja efekta Epi na oksidaciju  $\text{Fe}^{2+}$  jona pomoću  $\text{O}_2$  merena je brzina potrošnje kiseonika na fiziološkoj pH u prisustvu i odsustvu Epi (slika 4.19a). Uočava se da Epi značajno poveća početnu brzinu potrošnje  $\text{O}_2$ . Eksperimenti sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima nisu pokazali promene u  $[\text{O}_2]$ . Ukupno smanjenje koncentracije kiseonika pokazuje linearnu zavisnost od  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  sa nagibom  $k \sim 0,25$ , što je prikazano na slici 4.19b. Ovakav rezultat ukazuje da je potrebno oksidovati četiri  $\text{Fe}^{2+}$  jona da bi se uklonio jedan molekul  $\text{O}_2$ , što je u skladu sa literaturnim podacima  $\text{Fe}^{2+}$  oksidacije na pH opsegu (7 - 8) <sup>195,196</sup>.  $\text{Fe}^{2+}$  jon se ne troši samo na redukciju  $\text{O}_2$  već i na druge reakcije, koje ili uklanjaju ili proizvode  $\text{O}_2$ , kao što su redukcija i oksidacija  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (proizvodnja  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$ ), Fentonova reakcija i reakcija sa  $\text{HO}^{\cdot}$  (tabela 1.1). Da bi se izračunala početna brzina oksidacije  $\text{Fe}^{2+}$  jona korišćene su početne brzine potrošnje  $\text{O}_2$  i  $k$  vrednost. Stoga početne brzine oksidacije za  $\text{Fe}^{2+}$  jone iznosile su:  $\sim 0,2 \text{ min}^{-1}$  za  $\text{Fe}^{2+}$ ; i  $(3,95 \pm 0,22) \text{ min}^{-1}$ ,  $(3,73 \pm 0,11) \text{ min}^{-1}$  i  $(2,36 \pm 0,08) \text{ min}^{-1}$  za  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{2+}]_i = 4, 2$  i  $1$ , respektivno. Katalaza je dodavana 5 minuta nakon što je  $\text{Fe}^{2+}$  jonima

indukovan pad  $[O_2]$  u svrhu procene proizvodnje  $H_2O_2$ . Na niskim  $[Fe^{2+}]_i$  iznosima sav potrošeni kiseonik se konvertuje do  $H_2O_2$ , dok visoki  $[Fe^{2+}]_i$  iznosi sprečavaju proizvodnju  $H_2O_2$  (slika 4.19b). Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama  $Fe^{2+}/O_2$  sistema na  $pH \sim 7$  koji pokazuju da je uklanjanje  $H_2O_2$  promovisano povećanjem  $[Fe^{2+}]_i$  <sup>195,196</sup>.

Ispitivane su i redoks osobine Epi- $Fe^{2+}$  kompleksa merenjem statičkog redoks potencijala ( $E_h$ ) redoks elektrodom u aerobnim i anaerobnim uslovima. Redoks elektroda određuje statički redoks potencijal rastvora (odnosno čitavog sistema). Kao redukujući agens,  $Fe^{2+}$  joni dovode do značajnog i relativno stabilnog pada  $E_h$  vrednosti (slika 4.19c). U prisustvu Epi promene su manje izražene i delimično reverzibilne. Dobijeno je da je vrednost  $E_h$  za sistem  $[Epi]/[Fe^{2+}]_i = 4$  veća i da je ovaj sistem stabilniji u poređenju sa  $E_h$  za analogni sistem  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 4$ . Ovo je verovatno povezano sa nagomilavanjem  $H_2O_2$  (slika 4.19a) koji deluje kao oksidujuća vrsta i tako povećava  $E_h$  vrednost. Pri  $[Epi]/[Fe^{2+}]_i = 1$  vrednost  $E_h$  se polako približava vrednostima koje su dobijene za  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$  sistem (slika 4.19c), što je u skladu sa odsustvom nagomilavanja  $H_2O_2$  (slika 4.19a). Važno je napomenuti da je  $E_h$  vrednost za  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 1$  veća u poređenju sa  $E_h$  za  $[Epi]/[Fe^{3+}] = 4$ , što je i pokazano cikličnom voltametrijom. Brza oksidacija ometa određivanje bitnih redoks osobina Epi/ $Fe^{2+}$  sistema zbog čega su merenja vršena u anaerobnim uslovima (slika 4.19d). Dodavanje  $Fe^{2+}$  jona izaziva ireverzibilno smanjenje  $E_h$  vrednosti koja je značajno veća u prisustvu Epi. Konačna  $E_h$  vrednost je oko 120 mV niža u Epi/ $Fe^{2+}$  sistemu u poređenju sa  $E_h$  vrednošću koja odgovara  $Fe^{2+}$  jonima u odsustvu Epi. Sa druge strane, Epi za sebe ne indukuje smanjenje  $E_h$  vrednosti. Ovaj rezultat pokazuje da molekul Epi i  $Fe^{2+}$  joni formiraju kompleks čija je stehiometrija najverovatnije 1:1 <sup>107</sup>, i koji deluje kao jako redukciono sredstvo.

Oksidacija  $Fe^{2+}$  jona je značajno ubrzana u prisustvu molekula Epi, i to najmanje 10 puta. Literaturni podaci koji se zasnivaju na modelovanju pokazuju da  $Fe^{2+}$  jon prenosi 1,3 elektrona na elektronima bogati kateholni prsten <sup>197</sup>, što za rezultat može imati destabilizaciju kompleksa. Promovisana oksidacija  $Fe^{2+}$  jona u prisustvu Epi u aerobnim uslovima može biti objašnjena činjenicom da su ligandi sa tvrdim donorskim mestima bolji stabilizatori  $Fe^{3+}$  jona i da smanjuju redoks potencijal  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  para. Konstanta stabilnosti kateholnih kompleksa sa  $Fe^{3+}$  jonima je značajno veća od kompleksa sa  $Fe^{2+}$  jonima <sup>123</sup>. Prema HSAB principu,  $Fe^{3+}$  jon je tvrda, dok je  $Fe^{2+}$  jon granična Luisova kiselina. Hidroksilna grupa spada u tvrdu Luisovu bazu <sup>198</sup>. Pokazano je da se najviše zauzeta molekulska orbitala u molekulu Epi, na fiziološkoj pH vrednosti, nalazi na kateholnom prstenu i da su elektroni u prstenu redistribuirani prema C atomima koji su vezani za hidroksilne grupe <sup>199</sup>. Ovo čini da pomenute hidroksilne grupe budu tvrde baze od hidroksilnih grupa na alifatičnim lancima. Dakle, molekul Epi bi trebalo da jače vezuje  $Fe^{3+}$  jone nego  $Fe^{2+}$  jone zbog usaglašene tvrdo-tvrdo interakcije. Međutim, vezivanje  $Fe^{2+}$  jona za molekul Epi omogućeno je njegovom boljom rastvorljivošću i većom dostupnošću na fiziološkom pH 7,4, u odnosu na  $Fe^{3+}$  jone koji su pod ovim uslovima slabo rastvorljivi usled vezivanja za  $OH^-$  jone <sup>200</sup>. Važno je reći da postoji podatak za prethodno određenu  $K_D$  vrednost za NE i  $Fe^{2+}$  jone koja iznosi  $\sim 10^{-7,5} M$  <sup>201</sup>. Osim toga,  $Fe^{2+}$  joni i  $Fe^{3+}$  joni možda ne dele zajedničko mesto formiranja koordinatnih veza.  $Fe^{3+}$  jon se vezuje za O atome na kateholnom prstenu, dok se  $Fe^{2+}$  jon može koordinativno vezati za N atom na amino grupi koja je mekša baza od OH grupe.

#### 4.3.4 Određivanje redoks karakteristika epinefrin- $\text{Fe}^{2+}$ kompleksa cikličnom voltametrijom u anaerobnim uslovima



**Slika 4.20** Ciklični voltamogrami za 10 mM Tris pufer, pH 7,4, sa ili bez molekula Epi i/ili  $\text{Fe}^{2+}$  jona, dobijeni pomoću BDD radne elektrode; **(a)** Ciklični voltamogrami Tris, Epi (0,2 mM),  $\text{Fe}^{2+}$  jona (0,2 mM) i Epi/ $\text{Fe}^{2+}$  (0,2 mM/0,2 mM) sistema. Pozicije oksidacionog/anodnog ( $E_{pa}$ ) i redukcionog/katodnog ( $E_{pc}$ ) potencijala su označene strelicama. Crvene strelice označavaju približnu poziciju struje koja odgovara signalu kompleksa Epi- $\text{Fe}^{2+}$ ; **(b)** Signali dobijeni oduzimanjem eksperimentalnih voltamograma za različite sisteme od voltamograma Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleksa; Brzina skeniranja je iznosila 0,1 V/s.

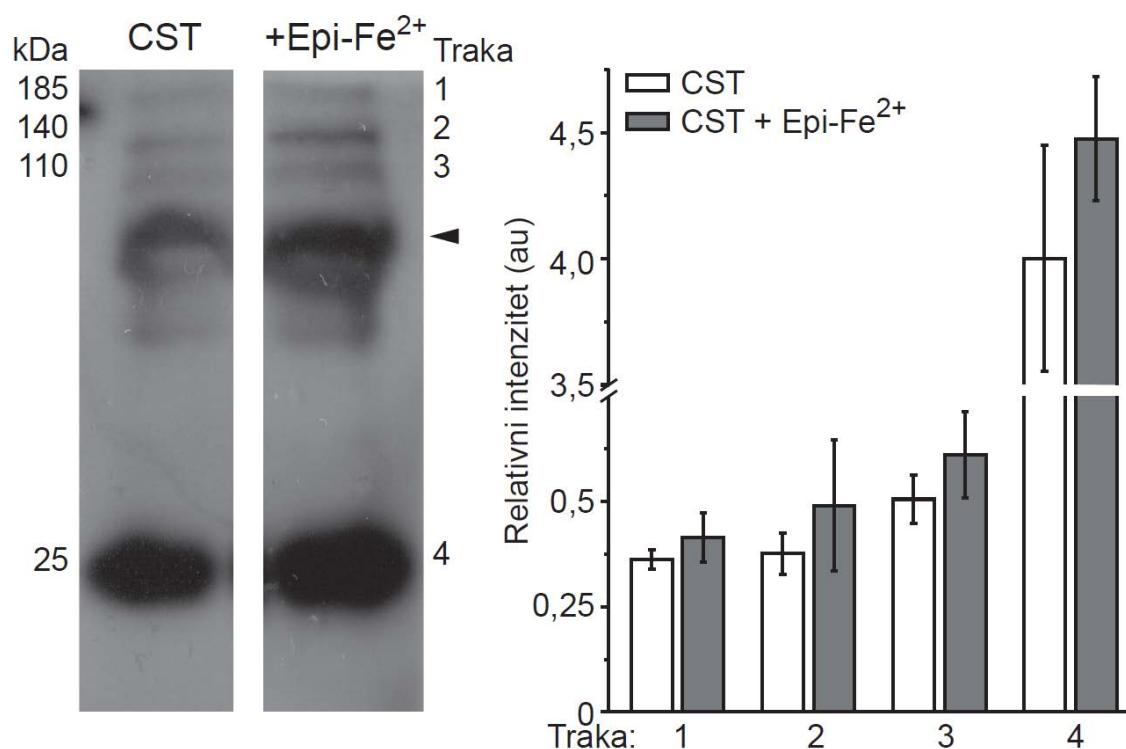
Da bi se ispitale redoks osobine Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleksa korišćena je metoda ciklična voltametrija u anaerobnim uslovima, što je i prikazano na slici 4.20. Sličan oblik voltamograma dobijen je za Tris pufer i za Epi rastvoren u ovom puferu, sa anodnim ( $E_{pa}$ ) i katodnim ( $E_{pc}$ ) potencijalima na 115 mV i -320 mV (slika 4.20a). Ovakvo ponašanje voltamograma ukazuje da struje uglavnom odgovaraju oksidaciji/redukciji Tris molekula.  $\text{Fe}^{2+}$  jon pokazao je dodatne signale na 580 mV i 520 mV. Ovo najverovatnije potiče od  $1e^-$  oksidacije  $\text{Fe}^{2+}$  jona do  $\text{Fe}^{3+}$  jona, i  $2e^-$  redukcije  $\text{Fe}^{2+}$  jona do  $\text{Fe}^0$ . U sistemu koji sadrži i molekul Epi i  $\text{Fe}^{2+}$  jon, redukcionni signal  $\text{Fe}^{2+}$  nije dobijen. Ovakav rezultat ukazuje da se  $\text{Fe}^{2+}$  joni vezuju za molekule Epi i na taj način dolazi do sprečavanja  $2e^-$  redukcije. Još važnije, prisutne su jake dodatne oksidacione i redukcionne struje. To ukazuje da Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleks ima jedinstvene redoks osobine. Na slici 4.20b prikazani su podaci za redoks potencijale Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleksa. Anodni potencijal  $E_{pa}$  za Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleks iznosi



približno -480 mV, dok katodni potencijal  $E_{pc}$  za isti kompleks iznosi približno -1100 mV. Razlika voltamograma za sistem Epi/ $Fe^{2+}$  i za čist Tris pufer odgovara voltamogramu za Epi- $Fe^{2+}$  kompleks. Odnos  $i_{pa} / i_{pc}$  za kompleks Epi- $Fe^{2+}$  je  $\sim 0,75$ .  $i_{pa} / i_{pc}$  odnos koji je manji od 1, i gotovo simetrični signali, ukazuju da Epi- $Fe^{2+}$  kompleks pokazuje kvazi-reverzibilno redoks ponašanje. Srednji potencijal  $E_{1/2}$  (*mid-point potential*), koji je određen korišćenjem Ag/AgCl (3 M KCl) referentne elektrode, iznosi 790 mV. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja pokazuju da u prisustvu dopamina reakcija oksidacije  $Fe^{2+}$  jona postaje termodinamički povoljnija, što dovodi do formiranja bezbojnog monokompleksa sa  $Fe^{2+}$  jonima i olakšanog prenosa elektrona između  $Fe^{2+}$  jona i  $O_2$  smanjenjem redukcionog potencijala polu-reakcije  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  para<sup>190, 202,203</sup>. Ovim se može objasniti sposobnost Epi- $Fe^{2+}$  kompleksa da brzo redukuje  $O_2$ , kao i olakšana oksidacija  $Fe^{2+}$  jona u prisustvu Epi, što je u skladu sa prethodno objavljenim niskim redukcionim potencijalima (do -450 mV u odnosu na SHE) za komplekse gvožđa sa kateholatnim oligo/polimerima<sup>124,190,204</sup>. Formiranje kompleksa smanjuje redukcionu potencijal  $Fe^{2+}$  jona čime se olakšava oslobađanje elektrona i reakcija oksidacije postaje termodinamički favorizovana.

Prooksidativna aktivnost gvožđa katalizovana Epi može objasniti prethodno opisana kateholaminima izazvana oksidativna oštećenja i kardiotoksičnost<sup>10</sup>. Pored toga, Epi može da povećava struju u kanalima kalcijuma L-tipa<sup>60</sup>, koji predstavljaju glavne transportere labilnog gvožđa u kardiomiocitima i smatra se da učestvuju u razvoju kardiomiopatija povezanih sa gvožđem<sup>61</sup>. Stoga bi Epi mogao igrati dvostruku ulogu u kardiovaskularnim problemima izazvanim stresom - putem gvožđe izazvanih oksidativnih oštećenja kao i promovišući transport/punjenje gvožđa u kardiomiocitima. Treba napomenuti da hronično izlaganje psihološkom stresu dovodi do pada koncentracije gvožđa u plazmi i smanjenog transporta gvožđa u enterocitima<sup>205,206</sup>. Povezano sa prvim, objavljeno je da Epi promovise interakcije između regulatornih elemenata gvožđa i gvožđe regulatornog proteina 1 i reguliše transferin receptor 1, što dovodi do skladištenja gvožđa vezanog za transferin u jetri i skeletnim mišićima<sup>207</sup>. Ovo može predstavljati kompenzacijske mehanizme čiji je cilj ublažavanje štetnog uticaja Epi / gvožđe sistema.

### 4.3.5 Određivanje kapaciteta epinefrin-Fe<sup>2+</sup> kompleksa da redukuje disulfidne veze

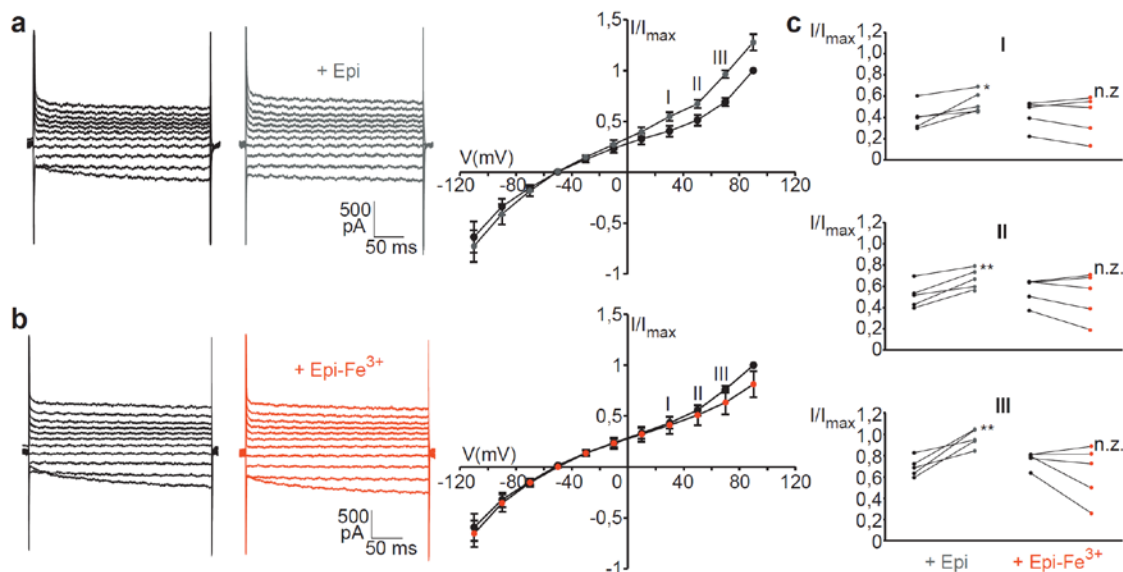


**Slika 4.21** Imunoblot analiza CST proteina koji sadrže -SH grupe; CST je bila tretirana sa Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleksom u anaerobnim uslovima; Tiolne grupe su obeležene biotin jodacetamidom; Analizirane su četiri dobro definisane trake; Relativni intenziteti traka (desno) su određeni u *Image J* softverskom programu i normalizovani na interni standard; Vrhovi strelica - nedefinisana traka, verovatno albumin (69 kDa) i transferin (79,5 kDa); Utvrđeno je da nema statistički značajne razlike. Analiza je izvršena na CST 4 subjekta.

Kako bi ilustrovali potencijalne *in vivo* efekte formiranja Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleksa, redoks aktivnost ovog kompleksa je dalje proučavana indirektno na nivou proteina humane CST, što je prikazano na slici 4.21. Imuno blot metodom određivan je kapacitet Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleksa da redukuje disulfidne veze (-S-S-) u proteinima. Kako bi se sprečila proizvodnja O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikala kao i njegovo učesće u daljim reakcijama, eksperimenti su sprovedeni pod anaerobnim uslovima (ranije je pokazano da Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleks brzo reaguje sa O<sub>2</sub>, slike 4.16a, 4.16b). U formiranju -S-S- veza kod proteina učestvuje aminokiselina cistein, koja je najčešće uključena u redoks reakcije tiol/disulfid, što predstavlja bitnu reakciju cisteina u živim sistemima. Disulfidne veze imaju različite funkcije u regulaciji proteina i makromolekulskih struktura<sup>208</sup>. Kapacitet za redukciju disulfidnih veza je određivan na osnovu koncentracije redukovanih tiolnih grupa, i to kroz reakciju sa jodoacetamidom za koji je zakačen biotin. Analizirane su 4 trake na 185 kDa, 140 kDa, 110 kDa i 25 kDa. Uočava se da su u prisustvu Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleksa trake izraženije u odnosu na samu CST. Džouns (*Jones*) i saradnici su odredili redoks potencijal za pojedinačne tiol/disulfid parove u zavisnosti od okruženja. U CST redoks potencijal ovog para varira od -90 mV do 150 mV. Takođe, redoks potencijali za tiol/disulfid parove značajno zavise od pH vrednosti (59 mV/pH jedinici za jednoelektronske prenose i 29,5 mV/pH jedinici za dvoelektronske prenose)<sup>209</sup>. Može se reći da kompleks pokazuje sposobnost da redukuje proteine CST. Drugim rečima, ovaj rezultat ukazuje da Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleks može da utiče na disulfidne veze, a samim tim i na funkciju proteina, menjajući njihove strukture. Ovo je u skladu sa prethodnim rezultatom dobijenim cikličnom voltametrijom, slika 4.20. Međutim, kod ovih eksperimenata nije dobijena statistički značajna razlika, tako da se govori samo o njegovoj mogućnosti da poseduje redukujuću sposobnost -S-S- veza.

## 4.4 Efekat vezivanja $\text{Fe}^{3+}$ jona za epinefrin na nivou adrenergičnih receptora

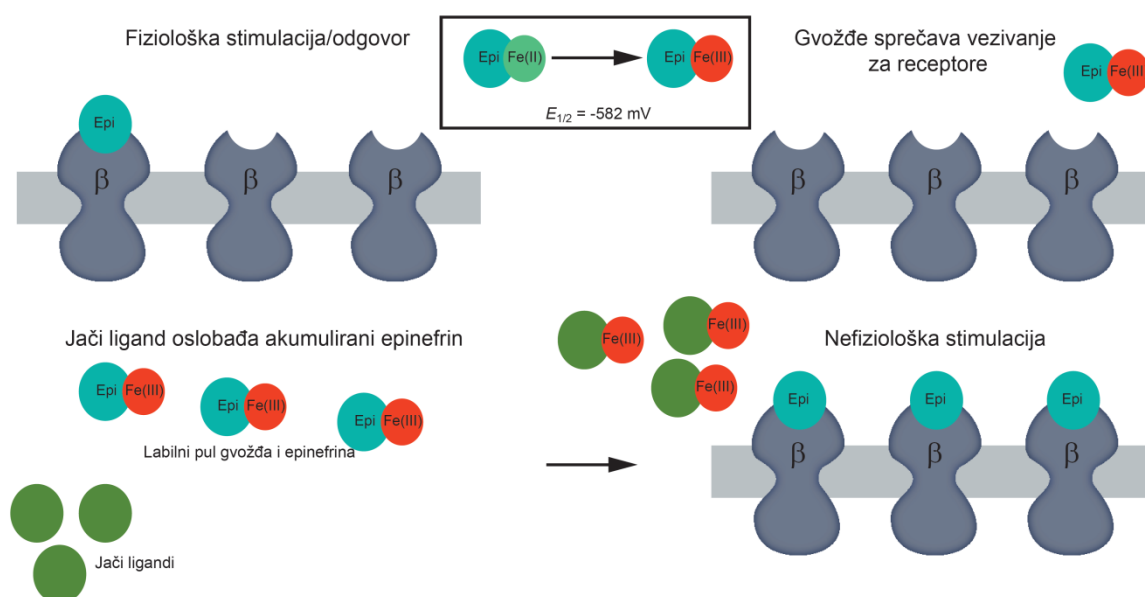
Na slici 4.22 je prikazan efekat vezivanja gvožđa za Epi na njegovu biološku aktivnost. Uzimajući u obzir da pod fiziološkim uslovima, koji uključuju prisustvo  $\text{O}_2$ ,  $\text{Epi-Fe}^{2+}$  kompleks brzo oksiduje do  $\text{Epi-Fe}^{3+}$  kompleksa, C6 ćelije astrocitoma su bile tretirane sa Epi i ekvimolarnom koncentracijom  $\text{Epi-Fe}^{3+}$  kompleksa. Može se primetiti da sam Epi dovodi do povećanja izlaznih struja. Za razliku od njega kompleks  $\text{Epi-Fe}^{3+}$  ne dovodi do promena izlaznih struja, što bi značilo da vezivanje gvožđa za molekule Epi inhibira njegovo vezivanje za adrenergičke receptore. Takođe se može uočiti da se selektivno povećanje javlja samo u slučaju izlaznih struja, jer se ne uočavaju promene kod ulaznih struja.



**Slika 4.22** Efekat Epi i  $\text{Epi-Fe}^{3+}$  kompleksa ( $20 \mu\text{M}$ ) na C6 ćelije sa konstitutivnim ekspiriranjem  $\beta$ -adrenergičnih receptora. (a) Zapisi struja na celjoj ćeliji i  $I$ - $V$  krive pre (crna) i posle dodavanja Epi (siva); Struje su normalizovane na vrednost  $I_{\text{max}}$  za  $V = +90 \text{ mV}$ . Podaci na  $I$ - $V$  krivama su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.E.; (b) Reprerentativni zapisi struja celih ćelija i  $I$ - $V$  kriva pre (crna) i posle dodavanja  $\text{Epi-Fe}^{3+}$  kompleksa (crvena); (c) Pojedinačni odgovori ćelija ( $n = 5$ ) na izlazne struje u tri ponavljanja označena kao I, II i III; Sam Epi izazvao je značajno povećanje izlaznih struja (I,  $p = 0,03$ ; II,  $p = 0,007$ ; III,  $p = 0,008$ ). Nema značajnih promena u izlaznim strujama nakon dodavanja  $\text{Epi-Fe}^{3+}$  kompleksa.

Ovi rezultati predstavljaju novi način za sagledavanje labilnog pula gvožđa u organizmu. Ne samo da ligandi utiču na redoks hemiju gvožđa nego i gvožđe utiče na aktivnost liganada. Sposobnost labilnog gvožđa da modulira biološku aktivnost liganada još uvek nije razrešena. Otkriće da vezivanje gvožđa za Epi sprečava aktiviranje AR daje novi pogled na funkciju labilnog gvožđa koje može delovati kao aktivni regulator biološke aktivnosti njegovih liganada Mnogi molekuli vezuju slobodno gvožđe i na taj način štite od stvaranja ROS-a. Svojim koordinativnim vezivanjem za ligande gvožđe može stvoriti pul neaktivnih liganada koji se ponovo mogu aktivirati odnosno osloboditi dodavanjem jačeg helirajućeg molekula, ili promenom hemijskog okruženja. Vezivanje gvožđa za ove ligande čini ga rastvornim i sprečava njegovo taloženje na pH 7,4, što olakšava vezivanje za molekule sa većim afinitetom kao što je transferin i oslobađanje  $\text{Fe}^{3+}$  jona iz različitih liganada<sup>210</sup>. Mešanje lekova koji heliraju gvožđe sa metabolizmom liganada može da objasni neke nus-pojave terapije heliranjem gvožđa<sup>211</sup>. Neki od mehanizama i simptoma patoloških stanja, koja uključuju preopterećenje gvožđem ili nedostatak gvožđa, mogu biti povezana sa međusobnom interakcijom labilnog gvožđa i liganada. Na primer, pokazano je da i prekusori Epi i suplementi gvožđa pružaju efikasno smanjenje simptoma sindroma nemirnih nogu, koji je povezan sa nedostatkom gvožđa<sup>212</sup>. S druge strane, preopterećenje gvožđem praćeno je aritmijama koje bi mogle nastati usled mešanja labilnog pula gvožđa sa hemijskom regulacijom srca<sup>213,214</sup>. Dalje se

radi na identifikaciji liganda koje doprinose labilnom pulu gvožđa kao i na uticaju gvožđa na ligande.



**Slika 4.23** Ilustracija Epi i uticaja prisustva  $\text{Fe}^{3+}$  jona na njegovu biološku aktivnost usled fiziološke i nefiziološke stimulacije.

U stresnim situacijama dolazi do proizvodnje Epi koji usled interakcije sa labilnim pulom  $\text{Fe}^{3+}$  jona dovodi do stvaranja stabilnog neaktivnog Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa. Da bi izazvao fiziološki odgovor organizam će težiti da proizvede što više samog Epi. Ligandi koji pokazuju visok afinitet prema gvožđu, jače ga vezuju od samog Epi i dovode do njegovog oslobađanja iz neaktivnog Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa, i stvaranja velike koncentracije cirkulišućeg Epi. Ovo predstavlja jedan od mogućih mehanizama toksičnosti Epi, kao i toksičnosti helirajućih agensa za gvožđe (slika 4.23).

Izgleda da kompleks 1:1 predstavlja dominantnu (pato)fiziološku vrstu. Gvožđe predstavlja najzastupljeniji prelazni metal u ljudskoj plazmi čija ukupna koncentracija iznosi od  $10 \mu\text{M}$  do  $30 \mu\text{M}$ . Koncentracija labilnog gvožđa (različiti redoks-aktivni Fe kompleksi sa malim ligandima) je promenljiva<sup>215</sup>. U odgovoru na stres koncentracija Epi može dostići vrednosti veće od  $50 \text{ nM}$ . U nekim patološkim stanjima, kao što su tumori nadbubrežne žlezde, koncentracija Epi može biti drastično veća, dostižući vrednosti do  $3,5 \mu\text{M}$ . Ova stanja dovode do kardiovaskularnih komplikacija<sup>58</sup>. Ipak, koncentracija labilnog gvožđa je veća od koncentracije Epi, što znači da je za *in vivo* uslove 1:1 kompleks relevantniji od 3:1 kompleksa. Kompleks 1:1 se formira u fosfatnom puferu čak i pri višim odnosima  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}]$  i na taj način može da dovede do povećanja rastvorljivosti amorfne  $\text{Fe}^{3+}$  jona, povećavajući koncentraciju labilnog gvožđa u plazmi i promovišući njegove redoks osobine koje uzrokuju probleme u fiziološkim uslovima. Ovaj 1:1 kompleks može da deluje kao poseban entitet inhibirajući aktivnost samog Epi i sprečavajući njegovo vezivanje za receptore. Važno je reći da Epi katalizovana oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  jona, rastvorne forme gvožđa u humanoj plazmi, predstavlja prihvatljiv hemijski mehanizam kardiotoksičnih efekata koji nastaju kao posledica povećane koncentracije Epi u odgovoru na stres organizma. Poznato je da  $\text{H}_2\text{O}_2$  prolazi kroz ćelijsku membranu ispoljavajući svoje dejstvo na osetljive unutarćelijske mete, dok  $\text{HO}^\bullet$  indukuje lipidnu peroksidaciju membrane<sup>215</sup>. Dobijeni rezultati pokazuju da Epi indukovani oksidativni stres zahteva redukovanu formu gvožđa, i da sam Epi ne može redukovati  $\text{Fe}^{3+}$  jone. Ovo ukazuje da redukujući agensi (tj. antioksidansi) ne mogu biti korisni u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja<sup>216,217</sup>. Ukratko, praćenjem odnosa između povišenog nivoa Epi i kardiovaskularnih problema, Epi katalizovana redoks aktivnost gvožđa može objasniti prethodno opisana kateholamin-indukovana oksidativna oštećenja kao i kardiotoksičnost<sup>10</sup>. Sa druge strane, kao odgovor simpatičkog nervnog sistema u stresnim situacijama, Epi je direktno uključen u regulaciju jonskih kanala regulišući jonske struje kroz L –tip

voltažno zavisnih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala<sup>60</sup>, koji predstavljaju glavne transportere labilnog gvožđa u kardiomiocitima i povezani su sa kardiomiopatijama izazvanih gvožđem<sup>61</sup>.

Zavisnost stehiometrije od koncentracionih odnosa koji su ovde dobijeni je ranije pokazana prilikom vezivanja  $\text{Fe}^{3+}$  jona za kateholaminske ostatke u biopolimerima<sup>128</sup>. Ovo, kao i analogija u EPR i Ramanovim spektrima<sup>22,179,180</sup>, ukazuju da Epi i  $\text{Fe}^{3+}$  joni mogu predstavljati dobar eksperimentalni model za unakrsno umrežavanje kateholaminima bogatih biopolimera. Spora reakcija umrežavanja sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima je ograničavajući korak za primenu takvih polimera. U ovom radu je pokazano da se Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleks približno deset puta brže formira kada se umesto  $\text{Fe}^{3+}$  jona dodaju  $\text{Fe}^{2+}$  joni. Ovakav rezultat može se objasniti činjenicom da su visoko rastvorni  $\text{Fe}^{2+}$  joni mnogo pristupačniji ligandima, dok se Epi „takmiči“ sa  $\text{OH}^-$  jonima za  $\text{Fe}^{3+}$  jone<sup>218</sup>. Pretpostavlja se da efikasnost unakrsnog umrežavanja na niskim pH vrednostima, koje nastaje vezivanjem kateholamina sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima, raste sa povećanjem početne pH vrednosti<sup>24</sup>. Ovi rezultati ukazuju da primena  $\text{Fe}^{2+}$  jona pri  $\text{pH} > 7$  može biti jednostavna alternativna strategija za unapređenje unakrsnog umrežavanja.

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove teze ispitivana je struktura Epi u vodi i polarnom rastvaraču DMSO, korišćenjem različitih NMR metoda ( $^1\text{H}$  NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC i NOESY). Zatim su ispitivane koordinativne i redoks interakcije Epi sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima pri različitim koncentracionim odnosima na fiziološkoj pH vrednosti (pH 7,4). Proučavanje stehiometrije, kinetike formiranja kompleksa, strukture i redoks potencijala Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa vršeno je korišćenjem UV/Vis spektroskopije, EPR spektroskopije, Ramanove spektroskopije, ciklične voltametrije i oksimetrije. Takođe, proučavanje redoks osobina Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleksa vršeno je pomoću ciklične voltametrije i oksimetrije. Na kraju je ispitivan efekat formiranja Epi- $\text{Fe}^{2+}$  kompleksa na oksidaciju tiolnih grupa kao i efekat Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa na biološku aktivnost Epi na ćelijama sa konstitutivnim eksprimiranjem adrenergičkih receptora, korišćenjem metode nametnute voltaže na deliću membrane u kofiguraciji cela ćelija. Iz rezultata se može zaključiti sledeće:

- Rezultati su pokazali da Epi u vodi zauzima drugačiju konformaciju u odnosu na konformaciju koju zauzima u DMSO. Epi gradi intramolekulsku vodoničnu vezu i zauzima konformaciju „škorpiona“ kada se nađe u DMSO, što nije slučaj kada se nađe u vodenoj sredini. S obzirom da konformacija molekula određuje njegovu interakcije sa drugim molekulima, kao i sa metalima, razumevanje uloge rastvarača je od velikog značaja.
- Struktura Epi u vodi je relaksirana, bez rigidnih substrukture odnosno jakih intra- i intermolekulskih vodoničnih veza (komparacija sa DMSO), i pokazuje slobodnu razmenu protona sa vodom na pozicijama OH i  $\text{NH}_2$ , koje su i mesta za formiranje koordinativnih veza sa gvožđem. U DMSO se uočavaju dva vrlo široka signala koja potiču od OH grupa na kateholnom prstenu i OH grupe na alifatičnom bočnom lancu. Međutim, zbog brze razmene sa vodom, oni se u vodi ne uočavaju, što ukazuje na nemogućnost formiranja intramolekulskih vodoničnih veza. Takođe uočena je i razlika za protone na metilenskoj i amino grupi. Obe vrste protona pokazuju hemijski i magnetno neekvivalentne protone u DMSO, koji u vodi nisu prisutni. Sve ovo ukazuje da je Epi molekul koji u vodi ima visok potencijal za formiranje koordinativnih veza sa gvožđem iz ugla neophodnog deprotonovanja, sternih i elektrostatičkih ograničenja.
- Na fiziološkoj pH vrednosti u prisustvu  $\text{O}_2$  ne dolazi do autooksidacije samog Epi. Zavisno od koncentracionih odnosa, Epi sa  $\text{Fe}^{3+}$  jonima formira stabilne 1:1 i 3:1 komplekse na pH 7,4. Na ovaj način Epi može da doprinese labilnom pulu gvožđa u plazmi, povećavajući rastvorljivost  $\text{Fe}^{3+}$  jona i promovišući njegovu redoks aktivnost. Uzimajući u obzir koncentraciju Epi u plazmi, 1:1 Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleks najverovatnije predstavlja dominantnu formu u organizmu. Kompleks 1:1 Epi- $\text{Fe}^{3+}$  može da produži vreme polu-života samog Epi ili da deluje kao poseban entitet čija funkcija nije otkrivena. EPR merenja pokazala su da su oba kompleksa visokospinska, ali da pokazuju različitu simetriju. 3:1 Epi- $\text{Fe}^{3+}$  kompleks pokazuje

veću anizotropiju u odnosu na 1:1 Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleks. Ramanova spektroskopija pokazala je da O atomi hidroksilne grupe na kateholnom prstenu predstavljaju mesta koordinovanja Fe<sup>3+</sup> jona na bidentatnom Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksu. Formira se jača veza kod 1:1 kompleksa, i ne nalazi se u istoj ravni sa kateholnim prstenom.

- Sa Fe<sup>2+</sup> jonima Epi formira kompleks koji deluje kao jako redukujuće sredstvo. U prisustvu kiseonika Epi katalizuje oksidaciju Fe<sup>2+</sup> jona od strane O<sub>2</sub>. Fe<sup>2+</sup> joni u ovom procesu ne dovode do oksidacije/razgradnje Epi, njega razgrađuju reaktivni nusprodukti oksidacije Fe<sup>2+</sup> jona. Poznato je da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prolazi kroz ćelijsku membranu, dok HO<sup>•</sup> indukuje lipidnu peroksidaciju. Dakle, Epi-indukovana oksidacija rastvorne forme Fe<sup>2+</sup> predstavlja mehanizam kardiotsičnosti usled povećane koncentracije Epi, izazvane delovanjem stresa. Formiranje 3:1 Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleksa je oko 10 puta brže ako se krene od Fe<sup>2+</sup> jona. Ovo predstavlja značajnu strategiju za razvoj kateholaminskih biopolimera, kod kojih je sporo umrežavanje sa Fe<sup>3+</sup> jonima ograničavajući faktor za razvoj adhezivnih svojstava. U anaerobnim uslovima Fe<sup>2+</sup> joni grade bezbojni mono-kompleks sa Epi koji pokazuje jako nizak redukcionni potencijal delujući kao jako redukcionno sredstvo. Ovaj Epi-Fe<sup>2+</sup> kompleks pokazuje sposobnost da redukuje disulfidne veze u proteinima CST i na taj način utiče na njihovu biološku funkciju menjajući njihovu strukturu i dovodeći do disfunkcije.
- Sa druge strane, 1:1 Epi-Fe<sup>3+</sup> kompleks utiče na biološku aktivnost samog Epi, sprečavajući njegovo vezivanje i aktivaciju β-AR. Na ovaj način pokazano je da gvožđe može da modulira aktivnost Epi, što može imati ulogu u Epi-indukovanoj kardiotsičnosti.

Ova istraživanja su od velikog značaja kako za razumevanje metabolizma Epi i njegovu interakciju sa adrenergičkim receptorima tako i za unapređenje protokola za sintezu biopolimera.

## 6. LITERATURA

1. Wong DL, Tai TC, Wong-Faull DC, Claycomb R, Meloni EG, Myers KM, Carlezon WA Jr, Kvetnansky R. Epinephrine: a short- and long-term regulator of stress and development of illness: a potential new role for epinephrine in stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32(5):737–748; 2012.
2. Bindoli A, Rigobello PM, Deeble JD. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic. Biol. Med.* 13:391–405; 1992.
3. Persoon-Rothert M, van der Valk-Kokshoorn EJ, Egas-Kenniphaas JM, Mauve I, van der Laarse A. Isoproterenol-induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical formation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21:1285–1291; 1989.
4. Rump AF, Rösen R, Klaus W. Cardioprotection by superoxide dismutase: a catecholamine-dependent process? *Anesth. Analg.* 76:239–246; 1993.
5. Rump AF, Klaus W. Evidence for norepinephrine cardiotoxicity mediated by superoxide anion radicals in isolated rabbit hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 349:295–300; 1994.
6. Liang C, Rounds NK, Dong E, Stevens SY, Shite J, Qin F. Alterations by norepinephrine of cardiac sympathetic nerve terminal function and myocardial beta-adrenergic receptor sensitivity in the ferret: normalization by antioxidant vitamins. *Circulation.* 102:96–103; 2000.
7. Qin F, Rounds KN, Mao W, Kawai K, Liang C-s. Antioxidant vitamins prevent cardiomyocyte apoptosis produced by norepinephrine infusion in ferrets. *Cardiovasc. Res.* 51:736–748; 2001.
8. Nappi AJ, Vass E. Comparative studies of enhanced iron-mediated production of hydroxyl radical by glutathione, cysteine, ascorbic acid and selected catechols. *Biochim Biophys Acta.* 1336:295–302; 1997.
9. Mladěnka P, Kalinowski DS, Hašková P, Bobrovová Z, Hrdina R, Simůnek T, Nachtigal P, Semecký V, Vávrová J, Holeckova M, Palicka V, Mazurová Y, Jansson PJ, Richardson DR. The novel iron chelator, 2-pyridylcarboxaldehyde 2-thiophenecarboxyl hydrazone, reduces catecholamine-mediated myocardial toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 22:208–217; 2009.
10. Hašková P, Kovaříková P, Koubková L, Vávrová A, Macková E, Simůnek T. Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 50:537–549; 2011.
11. Hašková, P, Koubková L, Vávrová A, Macková E, Hrušková K, Kovaříková P, Vávrová K, Simůnek T. Comparison of various iron chelators used in clinical practice as protecting



- agents against catecholamine-induced oxidative injury and cardiotoxicity. *Toxicology*. 289:122–131; 2011.
12. Yang J, Cohen Stuart MA, Kamperman M. Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms. *Chem. Soc. Rev.* 43:8271–8298; 2014.
  13. Abu-Eittah R, Mobarak Z, El-lathy S. Complexes of iron (III) with catechol amines and their electronic absorption spectra. *J. Prakt. Chemie.* 316:235–240; 1974.
  14. Fiaz T, Fatima N, Abbas Zaidi SZ, Abbas T, Kazimi MR. Investigation of iron complex formation of anti-hypertensive drug: Methyldopa. *Am. J. Anal. Chem.* 6:551–558; 2015.
  15. El-Ayaan U, Jameson RF, Linert W. A kinetic study of the reaction between noradrenaline and iron (III): an example of parallel inner- and outer-sphere electron transfer. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1315–1319; 1998.
  16. El-Ayaan U, Herlinger E, Jameson RF, Linert W. Anaerobic oxidation of dopamine by iron (III). *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2813–2818; 1997.
  17. Stallings MD, Morrison MM, Sawyer DT. Redox chemistry of metal-catechol complexes in aprotic media. 1. Electrochemistry of substituted catechols and their oxidation products. *Inorg. Chem.* 20:2655–2660; 1981.
  18. Palaniandavar M, Viswanathan R. Iron (III) complexes of phenolate ligands as models for catechol dioxygenases. *Proc. - Indian Acad. Sci., Chem. Sci.* 108:235–249; 1996.
  19. Linert W, Herlinger E, Jameson RF. A Kinetic study of the anaerobic reactions between adrenaline and iron (III). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 12:2435–439; 1993.
  20. Mentasti E, Pelizzetti E, Baiocchi C. Interactions of Fe (III) with adrenaline, L-dopa and other catechol derivatives: Electron-exchange kinetics and mechanism in acidic perchlorate media. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 38:2017–2021; 1976.
  21. Vaccaro E, Herbert Waite J. Yield and post-yield behavior of mussel byssal thread: A self-healing biomolecular material. *Biomacromolecules.* 2:906–911; 2001.
  22. Harrington MJ, Masic A, Holten-Andersen N, Waite JH, Fratzl P. Iron clad fibers: A metal-based biological strategy for hard flexible coatings. *Science.* 328:216–220; 2010.
  23. Holten-Andersen N, Mates TE, Toprak MS, Stucky GD, Zok FW, Waite JH. Metals and the integrity of a biological coating: The cuticle of mussel byssus. *Langmuir.* 25:3323–3326; 2008.
  24. Holten-Andersen N, Harrington JM, Birkedal H, Lee PB, Messersmith BP, Lee CKY, Waite JH. pH-induced metal-ligand cross-links inspired by mussel yield self-healing polymer networks with near-covalent elastic moduli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:2651–2655; 2011.
  25. Gnegy EM. Chapter 14 – Catecholamines. In: Brady S, Siegel GR, Albers W, Price D, editors. *Basic Neurochemistry Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. 8th ed. Waltham, USA: Elsevier Inc.; 2012, pp. 283–299.
  26. Nagatsu T. The catecholamine system in health and disease. Relation to tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 82(10):388–415; 2006.
  27. Sneader W. The discovery and synthesis of epinephrine. *Drug News Perspect.* 14:491–494; 2001.
  28. Takamine J. The isolation of the active principle of the suprarenal gland. *J. Physiol.* 27:29–30; 1901.

29. Abel J. On epinephrine, the active constituent of the suprarenal capsule and its compounds. *J Physiol.* 27:237; 1901.
30. Aldrich TB. A preliminary report on the active principle of the suprarenal gland. *Am J Physiol.* 5:457–461; 1901.
31. Szulczewski DH, Hong W. Epinephrine. *APDS.* 7:193–229; 1978.
32. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175; 1972.
33. Du J, Wagner BA, Buettner GR, Cullen JJ. Role of labile iron in the toxicity of pharmacological ascorbate. *Free Radic Biol Med.* 84:289–295; 2015.
34. Chaix P, Chauvet J, Jazequel JI. Étude cinétique de l'oxydation de l'adrénaline en solution tampon-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 4:471–483; 1950.
35. Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y, Zhao K. DNA damage induced by catechol derivatives. *Chem.-Biol. Interact.* 126:125–136; 2000.
36. Lee DR, Galant NJ, Wang H, Mucsi Z, Setiadi DH, Viskolcz B, Csizmadia IG. Thermodynamic functions of molecular conformations of (2-fluoro-2-phenyl-1-ethyl)ammonium ion and (2-hydroxy-2-phenyl-1-ethyl)ammonium ion as models for protonated noradrenaline and adrenaline: first-principles computational study of conformations and thermodynamic functions for the noradrenaline and adrenaline models. *J Phys Chem A.* 113:2507–2515; 2009.
37. van Mourik T. The shape of neurotransmitters in the gas phase: a theoretical study of adrenaline, pseudo-adrenaline, and hydrated adrenaline. *Phys Chem Chem Phys.* 6:2827–2837; 2004.
38. Burger K editor. *Effect of the Solvent on the Kinetics and Mechanisms of Coordination Reactions In: Studies in Analytical Chemistry.* Budapest, Hungary: Elsevier Inc.; 1983, pp. 6:203–216.
39. Mouadili A, Attayibat A, El Kadiri S, Radi S, Touzani R. Catecholase activity investigations using in situ copper complexes with pyrazole and pyridine based ligands. *Applied Catalysis A: General.* 454:93–99; 2013.
40. Pohorecky LA, Wurtman RJ. Adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Pharmacol Rev.* 23:1–35; 1971.
41. Cryer PE, Rizza RA, Haymond MW, Gerich JE. Epinephrine and norepinephrine are cleared through beta-adrenergic, but not alpha-adrenergic, mechanisms in man. *Metabolism.* 29:1114–1118; 1980.
42. Kambur O, Männistö PT. Catechol-*O*-Methyltransferase and pain. *Int. Rev. Neurobiol.* 95:227–279; 2010.
43. Totah RA, Rettie AE. 5.07 - Principles of Drug Metabolism 3: Enzymes and Tissues. In: Taylor JB, Triggle DJ, editors. *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* 2th ed. London, UK: Elsevier Inc.; 2007, pp. 167–191.
44. Peaston RT, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem.* 41:17–38; 2004.
45. Feher J. The adrenal medulla and integration of metabolic control. In: *Quantitative Human Physiology.* San Diego, USA: Elsevier Inc.; 2012. pp. 820-826.
46. Benovic JL. G-protein-coupled receptors signal victory. *Cell.* 151:1148-1150; 2012.

47. Exton JH. Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. *Am. J. Physiol.* 248:E633–E647; 1985.
48. Molinoff PB. Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs.* 28:1–15; 1984.
49. Minneman KP, Esbenshade TS. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34:117–133; 1994.
50. Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res.* 78(5):737–49; 1996.
51. Keularts IM, van Gorp RM, Feijge MA, Vuist WM, Heemskerk JW.  $\alpha_2$ -Adrenergic receptor stimulation potentiates calcium release in platelets by modulating cAMP levels. *J Biol Chem.* 275:1763–1772; 2000.
52. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*, 6th ed. New York, US: W. H. Freeman Company; 2007.
53. Briones AM, Daly CJ, Jimenez-Altayo F, Martinez-Revelles S, Gonzalez JM, McGrath JC and Vila E. Direct demonstration of  $\beta_1$ - and evidence against  $\beta_2$ - and  $\beta_3$ -adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 146:679–691; 2005.
54. Lundberg U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender. *Psychoneuroendocrinology.* 30:1017–1021; 2005.
55. Clutter WE, Bier DM, Shah SD, Cryer PE. Epinephrine plasma metabolic clearance rates and physiologic thresholds for metabolic and hemodynamic actions in man. *J Clin Invest.* 66:94–101; 1980.
56. Staten MA, Matthews DE, Cryer PE, and Bier DM. Epinephrine's effect on metabolic rate is independent of changes in plasma insulin or glucagon. *Am. J. Physiol.* 257:E185–E192; 1989.
57. Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P, Bolinder J. Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J Clin Invest.* 85:893–898; 1990.
58. Wortsman J. Role of epinephrine in acute stress. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 31:79–106; 2002.
59. Elenkov IJ. Effects of Catecholamines on the Immune Response. *NeuroImmune Biolol.* 7:189–200; 2007.
60. Emrick MA; Sadilek M; Konoki K; Catterall WA.  $\beta$ -Adrenergic-regulated phosphorylation of the skeletal muscle CaV1.1 channel in the fight-or-flight response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107. (43):18712–18717; 2010.
61. Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, Koch SE, Dawood F, Ackerley C, Yazdanpanah M, Wilson GJ, Schwartz A, Liu PP, Backx PH. L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med.* 9(9):1187–1194; 2003.
62. Crichton R. Iron: essential for almost all life. In *Biological Inorganic Chemistry*, 3rd ed, Oxford, UK: Academic Press: Elsevier B.V; 2019, pp. 363–404.
63. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300(2):535–43; 1993.
64. Pierre JL, Fontecave M, Crichton RR. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *BioMetals.* 15:341–346; 2002.
65. Sánchez M, Sabio L, Gálvez N, Capdevila M, Dominguez-Vera JM. Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life.* 69(6):382–388; 2017.

66. Haas KL, Katherine J. Franz. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chem Rev.* 109(10):4921–4960; 2009.
67. Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, editors. Metal ions in life sciences. Volume 1. Neurodegenerative Diseases and Metal Ions. Chichester, England: John Wiley & Sons; 2006.
68. Burgess J, Twigg MW. Iron: inorganic & coordination chemistry. In: *Encyclopedia of inorganic chemistry*. New York, USA: John Wiley & Sons; 2006.
69. Zarić SD. Hemija prelaznih metala. Beograd: Hemijski fakultet; 2008.
70. Zucca FA, Segura-Aguilarb J, Ferraria E, Muñozb P, Parisb I, Sulzerd D, Sarnae T, Casellaf L, Zeccaa L. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 155:96–119; 2017.
71. Guo M, Perez C, Wei Y, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F, Chasteen ND. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Trans.* 4951–4961; 2007.
72. Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* 79:2325–2338; 2007.
73. King DW, Lounsbury HA, Millero FJ. Rates and mechanism of Fe (II) oxidation at nanomolar total iron concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 29(3):818–825; 1995.
74. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford, UK: Clarendon Press; 2007.
75. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biol. Med.* 22:861–870; 1997.
76. Charrier JG, Anastasio C. Rates of hydroxyl radical production from transition metals and quinones in a surrogate lung fluid. *Environ Sci Technol.* 49(15):9317–25; 2015.
77. Wood PM. The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem. J.* 253:287–289; 1988.
78. Buxton GV. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}/\text{O}^-$ ) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 17:513; 1988.
79. Iliberta M, Violaine Bonnefoy V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* 1827(2):161–175; 2013.
80. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.* 26:323–42; 2006.
81. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J.* 434:365–381; 2011.
82. Jensen MP, Gorman-Lewis D, Aryal B, Paunesku T, Vogt S, Rickert PG, Seifert S, Lai B, Woloschak GE, Soderholm L. An iron-dependent and transferrin-mediated cellular uptake pathway for plutonium. *Nat Chem Biol.* 7(8):560–565; 2011.
83. Hider RC, Hall AD. Clinically useful chelators of tripositive elements. *Prog Med Chem.* 28:41-173; 1991.
84. Pantopoulos K. Inherited disorders of iron overload. *Front. Nutr.* 5:103; 2018.
85. Pathak D, Srivastava AK, Gulati S, Rajeswari MR. Assessment of cell-free levels of iron and copper in patients with Friedreich's ataxia. *Biometals.* 32(2):307–315; 2019.

86. Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the etiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics*. 2:2; 2009.
87. Knutson MD. Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radic. Biol. Med.* 133:101–111; 2019.
88. Lawen A, Lane DJ. Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants Redox Signal.* 18(18):2473–2507; 2013.
89. Yamanaka K, Ishikawa H, Megumi Y, Tokunaga F, Kanie M, Rouault TA, Morishima I, Minato N, Ishimori K, Iwai K. Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nat. Cell Biol.* 5(4): 336–340; 2003.
90. Koppenol WH, Hider RH. Iron and redox cycling. Do's and don'ts. *Free Radical Biol. Med.* 133:3–10; 2019.
91. Sánchez P, Gálvez N, Colacio E, Miñones E, Domínguez-Vera JM. Catechol releases iron (III) from ferritin by direct chelation without iron (II) production. *Dalton Trans.* 811–813; 2005.
92. Evans RW, Rafique R, Zarea A, Rapisarda C, Cammack R, Evans PJ, Porter JB, Hider RC. Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. *J Biol Inorg Chem.* 13:57–74; 2008.
93. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1820(3):403–410; 2012.
94. Adam FI, Bounds PL, Kissner R, Koppenol WH. Redox properties and activity of iron-citrate complexes: evidence for redox cycling. *Chem Res Toxicol.* 28(4):604–614; 2015.
95. Dziuba N, Hardy J, Lindahl PA. Low-molecular-mass iron in healthy blood plasma is not predominately ferric citrate. *Metallomics.* 10:802–817; 2018.
96. Cryer PE. Adrenaline: a physiological metabolic regulatory hormone in humans? *Int J Obes Relat Metab Disord.* 17Suppl 3:S43-6, discussion S68; 1993.
97. Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 161:391–401; 1983.
98. Meerson FZ. Disturbances of metabolism and cardiac function under the action of emotional painful stress and their prophylaxis. *Basic Res. Cardiol.* 75:479–500; 1980.
99. Klaassen CD, Watkins JB. Toxic responses of the heart and vascular systems. 5th ed., USA: McGraw-Hill Companies; 1999, pp. 398–440.
100. Straton JR, Pfeifer MA, Ritchie JL, Halter JB. Hemodynamic effects of epinephrine: concentration-effect study in humans. *J. Appl. Physiol. B.* 4:1199–1206; 1985.
101. Liaudet L, Calderari B, Pacher P. Pathophysiological mechanisms of catecholamine and cocaine-mediated cardiotoxicity. *Heart Fail Rev.* 19:815–824; 2014.
102. Bernstein D, Fajardo G, Zhao M. The role of  $\beta$ -adrenergic receptors in heart failure: Differential regulation of cardiotoxicity and cardioprotection. *Prog Pediatr Cardiol.* 31(1):35–38; 2011
103. Costa VM, Silva R, Ferreira LM, Branco PS, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho RA, Carvalho M, Remião F. Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct. *Chem Res Toxicol.* 20(8):1183–1191; 2007.

104. Mah GT, Tejani AM, Musini VM. Methyl dopa for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 4:CD003893; 2009.
105. Barbeau A. L-Dopa therapy in Parkinson's disease. A critical review of nine years' experience. *Can Med Assoc J.* 101(13):59–68; 1969.
106. Barreto WJ, Giancoli Barreto SR, Moreira I, Kawano Y. Iron oxide and pyrocatechol: a spectroscopy study of the reaction products. *Quim. Nova.* 29:1255–1258; 2006.
107. Jewett SL, Egging S, Geller L. Novel method to examine the formation unstable 2:1 and 3:1 complexes catecholamines and iron (III). *J. Inorg. Biochem.* 66:165–173; 1997.
108. Baruah B, Das S, Chakravorty A. A family of vanadate esters of monoionized and diionized aromatic 1,2-diols: synthesis, structure, and redox activity. *Inorg. Chem.* 41:4502–4508; 2002.
109. Chiou YM, Que LJr. Structure of a mononuclear iron (II)-catecholate complex and its relevance to the extradiol-cleaving catechol dioxygenases. *Inorg. Chem.* 34:3577–3578; 1995.
110. Jo DH, Chiou YM, Que LJr. Models for extradiol cleaving catechol dioxygenases: syntheses, structures, and reactivities of iron (II)–monoanionic catecholate complexes. *Inorg. Chem.* 40:3181–3190; 2001.
111. Dilworth JR, Griffiths DV, Parrott SJ, Zheng Y. Synthesis and characterisation of rhenium dithiocarbamate complexes. Crystal structures of  $[\text{ReO}\{\text{O}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_4\}\{\text{S}_2\text{CNEt}_2\}_2]$ ,  $[\text{Re}\{\text{PPh}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{S}-2)\}_2\{\text{S}_2\text{CNEt}_2\}]\cdot\text{Me}_2\text{CO}$  and  $[\text{ReO}\{\text{PPh}(\text{C}_6\text{H}_4\text{S}-2)\}_2\{\text{S}_2\text{CNEt}_2\}]$ . *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2931–2936; 1997.
112. Pierpont CG, Buchanan RM. Transition metal complexes of o-benzoquinone, o-semiquinone, and catecholate ligands. *Coord. Chem. Rev.* 38:45–87; 1981.
113. Liu ZD, Hider RC. Design of iron chelators with therapeutic application. *Coord. Chem. Rev.* 232:151–171; 2002.
114. Avdeef A, Sofen SR, Bregante TL, Raymond KN. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 9. Stability constants for catechol models of enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* 100(17):5362–5370; 1978.
115. Martell E, Smith RM. *Critical Stability Constants*. New York: Plenum Press; 1977, pp. 200–201.
116. Aisen P, Leibman A, Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem.* 253(6):1930–7; 1978.
117. Sever MJ, Wilker JJ. Visible absorption spectra of metal–catecholate and metal–tironate complexes. *Dalton Trans.* 1061–1072; 2004.
118. Yu F, Zhang Y, Li A, Li B. A spin-crossover catecholato–iron (III) system: synthesis, crystal structure and magnetic properties. *Inorg. Chem. Commun.* 51:87–89; 2015.
119. Yamaharaa R, Ogo S, Masuda H, Watanabe Y. (Catecholato)iron (III) complexes: structural and functional models for the catechol-bound iron (III) form of catechol dioxygenases. *J. Inorg. Biochem.* 88:284–294; 2002.
120. Gülcin I. Antioxidant activity of l-adrenaline: a structure–activity insight. *Chem.-Biol. Interact.* 179:71–80; 2009.
121. Zhang Q, Jin B, Wang X, Lei S, Shi Z, Zhao J, Liu Q, Peng R. The mono(catecholamine) derivatives as iron chelators: synthesis, solution thermodynamic stability and antioxidant properties research. *R. Soc. Open Sci.* 5(6):171492; 2018.

122. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biol. Med.* 8(1):95–108; 1990.
123. Perron NR, Wang HC, DeGuire SN, Jenkins M, Lawson M, Brumaghim JL. Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding. *Dalton Trans.* 39: 9982–9987; 2010.
124. Taylor SW, Luther III GW, Waite JH. Polarographic and spectrophotometric investigation of iron (III) complexation to 3,4-dihydroxyphenylalanine-containing peptides and proteins from *Mytilus edulis*. *Inorg. Chem.* 3:5819–5824; 1994.
125. Pezron E, Ricard A, Lafuma F, Audebert R. Reversible gel formation induced by ion complexation. 1. Borax-galactomannan interactions. *Macromolecules.* 21:1121–1125; 1988.
126. Kushner AM, Vossler JD, Williams GA, Guan Z. A biomimetic modular polymer with tough and adaptive properties. *J Am Chem Soc.* 131:8766–8768; 2009.
127. Séréro Y, Aznar R, Porte G, Berret JF, Calvet D, Collet A, Viguier M. Associating polymers: from “flowers” to transient networks. *Phys Rev Lett.* 81:5584–5587; 1998.
128. Zeng H, Hwang DS, Israelachvili JN, Waite JH. Strong reversible Fe<sup>3+</sup>-mediated bridging between dopa-containing protein films in water. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(29):12850–12853; 2010.
129. Milosavljević SM. *Strukturne instrumentalne metode*. Beograd: Hemijski fakultet; 1994.
130. Darbeau RW. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: a review and a look at its use as a probative tool in deamination chemistry. *Applied Spectroscopy Reviews.* 41:401–425; 2006.
131. Xia Y, Momot K. *Biophysics and biochemistry of cartilage by NMR and MRI*. 1st ed, Croydon, UK: The Royal Society of Chemistry; 2017, pp. 69.
132. Rankin NJ, Preiss D, Welsh P, Burgess KE, Nelson SM, Lawlor DA, Sattar N. The emergence of proton nuclear magnetic resonance metabolomics in the cardiovascular arena as viewed from a clinical perspective. *Atherosclerosis.* 23:287–300; 2014.
133. Markwick PRL, Malliavin T, Nilges M. Structural biology by NMR: structure, dynamics, and interactions. *PLoS Comput Biol.* e1000168; 2008.
134. Kroon J, Kroon-Batenburg LMJ, Leeftang BR, Vliegthart JFG. Intramolecular versus intermolecular solution. *J. Mol. Struct.* 322:27–31; 1994.
135. Hibbert F, Emsley J. Hydrogen bonding and chemical reactivity. *Adv. Phys. Org. Chem.* 26:255–379; 1990.
136. Keller J. *Understanding of NMR spectroscopy*. 2nd ed, Cambridge, UK: John Wiley & Sons; 2002.
137. Bumbrah GS, Sharma RM. Raman spectroscopy – basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian J. Forensic Sci.* 6:209–215; 2016.
138. Que LJr, editor. *Physical methods in bioinorganic chemistry, spectrochemistry and magnetism*. Sausalito, CA: University Science Books; 2000.
139. Hagen WR. Metallomic EPR spectroscopy. *Metallomics.* 1(5):384–391; 2009.
140. Hagen WR. EPR spectroscopy as a probe of metal centres in biological systems. *Dalton Trans.* 4415–4434; 2006.
141. Weckhuysen BM, Heidler R, Schoonheydt RA. *Electron Spin Resonance Spectroscopy*. *Mol. Sieves.* 4:295–335; 2004.

142. Cammack R, Cooper CE. Electron paramagnetic resonance spectroscopy of iron complexes and iron-containing proteins. *Methods Enzymol.* 227:353–384; 1993.
143. Hagen WR. Chapter 3. EPR Spectroscopy. In: Crichton RR, Louro RO, editors. *Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry*. New York, USA: Elsevier Inc.; 2013, pp. 53–74.
144. Settle FA. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. New Jersey: Prentice Inc.; 1997.
145. Smith E, Dent G. *Modern Raman spectroscopy – a practical approach*. Chichester John Wiley & Sons; 2005.
146. Krishna R, Unsworth TJ, Edge R. *Raman spectroscopy and microscopy*. Manchester, UK: Elsevier Inc.; 2016.
147. Tsuboi M, Hirakawa AY. A correlation between vibronic coupling, adiabatic potential, and Raman scattering: A theoretical background of a proposed rule. *J. Raman Spectrosc.* 5(1):75–86; 1976.
148. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL. A practical beginner and guide to cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.* 95(2):197–206; 2018.
149. Sandford C, Edwards MA, Klunder KJ, Hickey DP, Li M, Barman K, Sigman MS, White HS, Minter SD. A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. *Chem. Sci.* 10:6404–6422; 2019.
150. Grgur B. *Elektrohemija*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu; 2018.
151. Mabbott GA. An introduction to cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.* 60:697–701; 1983.
152. Gileadi E, Eisner EK, Penciner J. *Interfacial chemistry: an experimental approach*. Tel-Aviv University, Israel: Addison-Wesley Eds; 1975.
153. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical methods, fundamentals and applications*. New York: John Wiley & Sons; 1980.
154. Sarma P, Medhi OK. Electrochemical study of interaction of 3, 5-ditertiarybutyl catechol with Fe (III) complexes of N-salicylidene-L-amino acids. *Curr. Res. Chem.* 3:87–97; 2011.
155. Killa HM, Mercer EE, Philp RH. Applications of cyclic voltammetry in the characterization of complexes at low ligand concentrations. *Anal. Chem.* 58:2401–2405; 1984.
156. Reza KMS, Motin MA, Mia MAH, Rahman MM, Azizl MA, Hasem MA. Redox behavior of biologically important Fe-catechol complexes at different pH. *Anal. Bioanal. Electrochem.* 6:763–775; 2014.
157. Renger G, Hanssum B. Oxygen detection in biological systems. *Photosynth Res.* 102:487–498; 2009.
158. Vujčić Z. *Eksperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Hemijski fakultet; 2002.
159. Molleman A. *Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology*. West Sussex, England: John Wiley and Sons; 2003.
160. Sokołowska P, Nowak JZ. Constitutive activity of beta-adrenergic receptors in C6 glioma cells. *Pharmacol Rep.* 57(5):659–63; 2005.



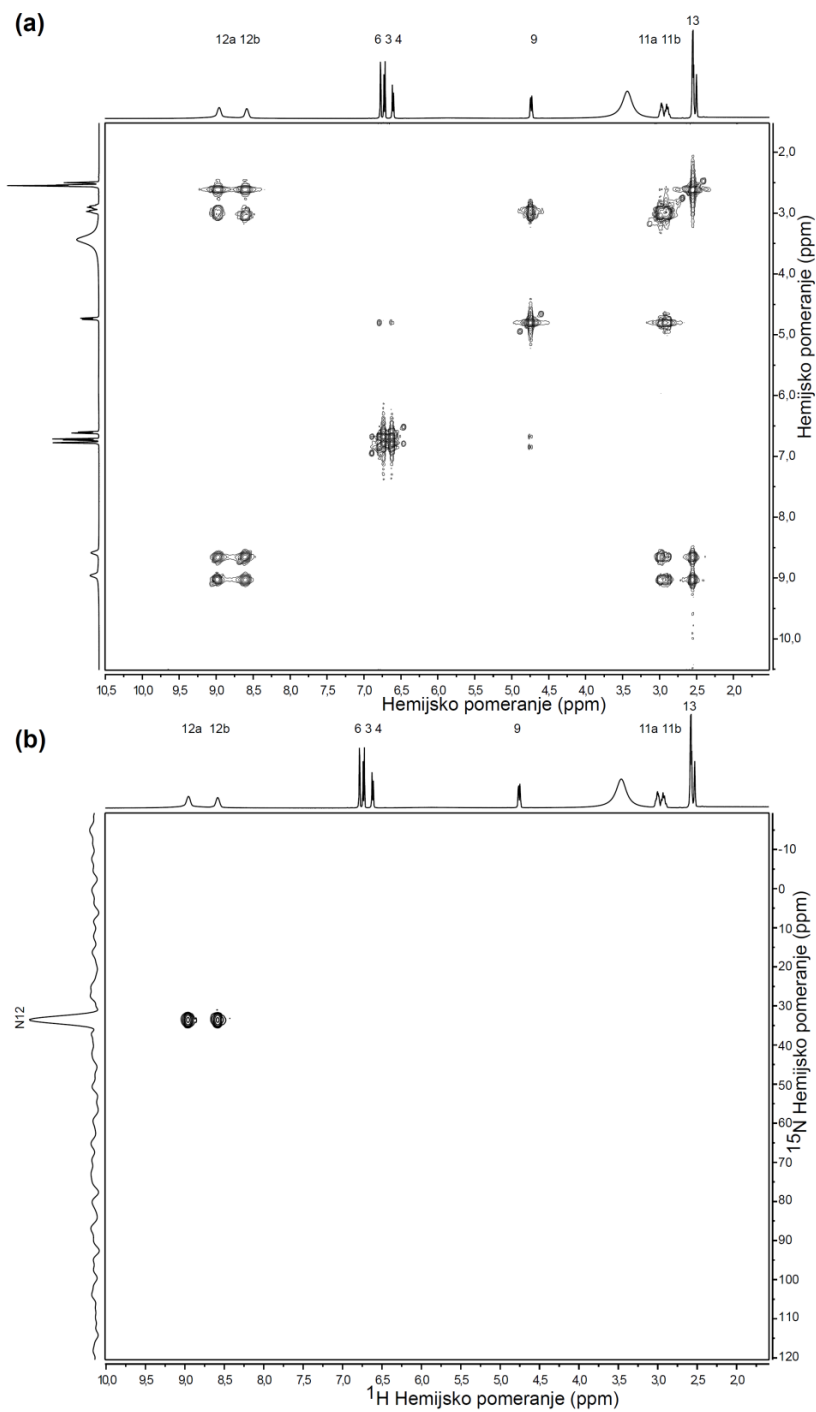
161. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S, Mandal R, Sinelnikov I, Xia J, Jia L, Cruz JA, Lim E, Sobsey CA, Shrivastava S, Huang P, Liu P, Fang L, Peng J, Fradette R, Cheng D, Tzur D, Clements M, Lewis A, De Souza A, Zuniga A, Dawe M, Xiong Y, Clive D, Greiner R, Nazyrova A, Shaykhtudinov R, Li L, Vogel HJ, Forsythe I HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 37(Database):D603–D610; 2009.
162. Pyta K, Przybylski P, Klich K, Stefańska J. A new model of binding of rifampicin and its amino analogues as zwitterions to bacterial RNA polymerase. *Org Biomol Chem*. 10:8283–8297; 2012.
163. Pretsch E, Buhlmann P, Badertscher M. Structure determination of organic compounds. 4th ed, Berlin: Springer-Verlag; 2009.
164. Cierpicki T, Otlewski J. Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins. *J Biomol NMR*. 21:249–261; 2001.
165. Tilton RF, Dewan JC, Petsko GA. Effects of temperature on protein structure and dynamics: X-ray crystallographic studies of the protein ribonuclease A at nine different temperatures from 98 to 320K. *Biochemistry*. 31:2469–2481; 1992.
166. Baxter NJ, Williamson MP. Temperature dependence of  $^1\text{H}$  chemical shifts in proteins. *J Biomol NMR*. 9:359–369; 1997.
167. Wagner G, Pardi A, Wuthrich K. Hydrogen bond length and proton NMR chemical shifts in proteins. *J Am Chem Soc*. 105:5948–5949; 1983.
168. Huang Z, Dai Y, Yu L. Density functional theory and topological analysis on the hydrogen bonding interactions in N-protonated adrenaline–DMSO complexes. *Struct Chem*. 21:863–872; 2010.
169. Jennings WB. Chemical shift nonequivalence in prochiral groups. *Chem Rev*. 75:307–352; 1975.
170. Alagona G, Ghio CE. Competitive H-bonds in vacuo and in aqueous solution for N-protonated adrenaline and its monohydrated complexes. *J Mol Struct THEOCHEM*. 811:223–240; 2007.
171. Wang H, Huang Z, Shen T, Guo L. Hydrogen-bonding interactions in adrenaline-water complexes: DFT and QTAIM studies of structures, properties, and topologies. *J Mol Model*. 18:3113–3123; 2012.
172. Yu ZY, Guo DJ, Wang HQ. Theoretical study on the hydrogen bond interaction between adrenaline and dimethyl sulphoxide. *Chin J Chem Phys*. 17:149–154; 2004.
173. Konrat R, Tollinger M, Kontaxis G, Kräutler B. NMR techniques to study hydrogen bonding in aqueous solution. *Monatshefte für Chemie*. 130: 961–982; 1999.
174. Kofuku Y, Ueda T, Okude J, Shiraishi Y, Kondo K, Maeda M, Tsujishita H, Shimada I. Efficacy of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat Commun*. 3:1045; 2012.
175. Moskovitz J, Walss-Bass C, Cruz DA, Thompson PM, Bortolato M. Methionine sulfoxide reductase regulates brain catechol-O-methyl transferase activity. *Int J Neuropsychopharmacol*. 17:1707–1713; 2014.
176. Tao Z, Wang G, Goodisman J, Asefa T, Accelerated oxidation of epinephrine by silica nanoparticles. *Langmuir*. 25(17):10183–10188; 2009.
177. Afanas'ev IB. Superoxide ion: Chemistry and biological implications. 1th ed. Boca Raton: CRC Press, Inc; 1989.

178. Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Molec. Pharmacol.* 14:633–643; 1978.
179. Sever MJ, Weisser JT, Monahan J, Srinivasan S, Wilker JJ. Metal-mediated cross-linking in the generation of a marinemussel adhesive. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43:448–450; 2004.
180. Tang L, Shi J, Wang X, Zhang S, Wu H, Sun H, Jiang Z. Coordination polymer nanocapsules prepared using metal-organic framework templates for pH-responsive drug delivery. *Nanotechnology.* 28:275601; 2017.
181. Hwang DS, Zeng H, Masic A, Harrington MJ, Israelachvili JN, Waite JH. Protein- and metal-dependent interactions of a prominent protein in mussel adhesive plaques. *J. Biol. Chem.* 285:25850–25858; 2010
182. Taylor SW, Chase DB, Emptage MH, Nelson MJ, Waite JH. Ferric ion complexes of a DOPA-containing adhesive protein from *Mytilus edulis*. *Inorg. Chem.* 35:7572–7757; 1996.
183. Raymond KN, Isied SS, Brown LD, Fronczek FR, Nibert JH. Coordination isomers of biological iron transport compounds. VI. Models of the enterobactin coordination site. A crystal field effect in the structure of potassium tris(catecholato) chromate (III) and – ferrate (III) sesquihydrates,  $K_3[M(O_2C_6H_4)_3] \cdot 1.5H_2O$ , M = chromium, iron. *J. Am. Chem. Soc.* 98:1767–1774; 1976.
184. Kim SH, Lee JW, Yeo IH. Spectroelectrochemical and electrochemical behavior of epinephrine at a gold electrode. *Electrochim. Acta.* 45:2889–2895; 2000.
185. Gorczyński A, Kubicki M, Szymkowiak K, Łuczak T, Patroniak V. Utilization of a new gold/Schiff-base iron (III) complex composite as a highly sensitive voltammetric sensor for determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid. *RSC Adv.* 6:101888–101899; 2016.
186. Sochr J, Švorc L, Rievaj M, and Bustin D. Electrochemical determination of adrenaline in human urine using a boron-doped diamond film electrode. *Diamond Relat. Mater.* 43:5–11; 2014.
187. Bard AJ, Faulkner LR. Kinetics of Electrode Reactions. In *Electrochemical methods, fundamentals and applications*. New York: John Wiley & Sons; 2001, pp. 87–136.
188. Bridge MH, Williams E, Lyons ME, Tipton KF, Linert W. Electrochemical investigation into the redox activity of Fe (II)/ Fe (III) in the presence of nicotine and possible relations to neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1690:77–84; 2004.
189. Tyson CA, Martell AE. Equilibriums of metal ions with pyrocatechol and 3,5-di-tert-butylpyrocatechol. *J. Am. Chem. Soc.* 90(13):3379–3386; 1968.
190. Sun Y, Pham AN, Waite TD. Elucidation of the interplay between  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  and dopamine with relevance to iron solubilization and reactive oxygen species generation by catecholamines. *J Neurochem.* 137:955–968; 2016.
191. García CR, Angelé-Martínez C, Wilkes JA, Wang HC, Battin EE, Brumaghim JL. Prevention of iron- and copper-mediated DNA damage by catecholamine and amino acid neurotransmitters, L-DOPA, and curcumin: metal binding as a general antioxidant mechanism. *Dalton Trans.* 41:6458–6467; 2012.
192. Jeschke G. EPR techniques for studying radical enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1707:91–102; 2005.

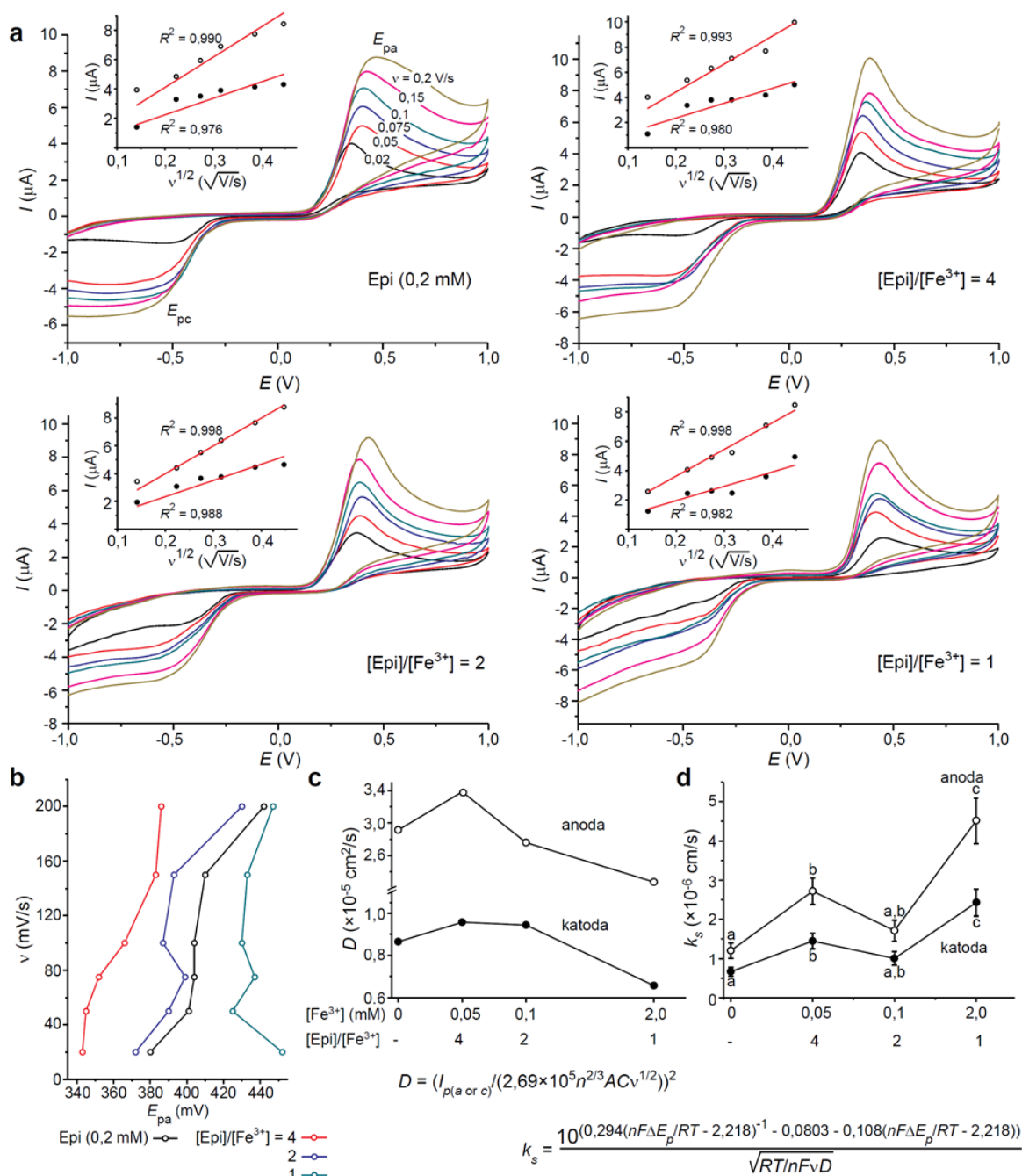
193. Gohn M, Getoff N, Bjergbakke E. Radiation chemistry studies on chemotherapeutic agents. Part 1. Pulse radiolysis of adrenalin in aqueous solutions. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*(73):406–414; 1977.
194. Hicks M, Gebicki JM. Rate constants for reaction of hydroxyl radicals with tris, tricine and hepes buffers. *FEBS Lett.* 199:92–94; 1986.
195. King DW, Lounsbury HA, Millero FJ. Rates and mechanisms of Ge (II) oxidation at nanomolar total iron concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 29:818–824; 1995.
196. Pham AN, Waite TD. Oxygenation of Fe (II) in natural waters revisited: Kinetic modeling approaches, rate constant estimation and the importance of various reaction pathways. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 72:3616–3630; 2008.
197. Xu Z. Mechanics of metal-catecholate complexes: the roles of coordination state and metal types. *Sci. Rep.* 3:2914; 2013.
198. Haas KL, Franz KJ. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chem. Rev.* 109:4921–4960; 2009.
199. Gámez-García VG, Cortes-Romero CM, Palomar-Pardave ME, Ramirez-Silva MT, Romero-Romo MA, Cuan A. Theoretical study on the chemical stability of adrenalin species. *Rev. Mex. Fis. S* 59:135–140; 2013.
200. Huang HH. The Eh-pH Diagram and Its Advances. *Metals.* 6:23; 2016.
201. Rajan KS, Davis JM, Colburn RW. Metal chelates in the storage and transport of neurotransmitters: interactions of metal ions with biogenic amines. *J. Neurochem.* 18(3):345–64; 1971.
202. Powell H. and Taylor M. Interactions of iron (II) and iron (III) with gallic acid and its homologues: a potentiometric and spectrophotometric study. *Aust. J. Chem.* 35:739–756; 1982.
203. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 53:75–100; 2009.
204. Lewis BL, Holt PD, Taylor SW, Wilhelm SW, Trick SG, Butler A, Luther GW. Voltammetric estimation of iron (III) thermodynamic stability constants for catecholate siderophores isolated from marine bacteria and cyanobacteria. *Mar. Chem.* 50:179–188; 1995.
205. Wei C, Zhou J, Huang X, Li M. Effects of psychological stress on serum iron and erythropoiesis. *Int. J. Hematol.* 88(1):52–56; 2008.
206. Chen J, Shen H, Chen C, Wang W, Yu S, Zhao M, Li M. The effect of psychological stress on iron absorption in rats. *BMC Gastroenterol.* 9:83; 2009.
207. Tapryal N, Vivek GV, Mukhopadhyay CK. Catecholamine stress hormones regulate cellular iron homeostasis by a posttranscriptional mechanism mediated by iron regulatory protein: implication in energy homeostasis. *J. Biol. Chem.* 290(12):7634–7646; 2015.
208. Ito K, Inaba K. The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18:450–458; 2008.
209. Jones DP, Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radic Biol Med.* 47:1329–1338; 2009.
210. Matias C, Belnap DW, Smith MT, Stewart MG, Torres IF, Gross AJ, Watt RK. Citrate and albumin facilitate transferrin iron loading in the presence of phosphate. *J. Inorg. Biochem.* 168:107–113; 2017.

211. Sheth S. Iron chelation. *Curr. Opin. Hematol.* 21(3):179–185; 2014.
212. Allen RP, Earley CJ. The role of iron in restless legs syndrome. *Mov. Disord.* 22(18):S440–S448; 2007
213. Lekawanvijit S, Chattipakorn N. Iron overload thalassemic cardiomyopathy: iron status assessment and mechanisms of mechanical and electrical disturbance due to iron toxicity. *Can. J. Cardiol.* 25(4):213–218; 2009.
214. Shizukuda Y, Rosing DR. Iron overload and arrhythmias: influence of confounding factors. *J. Arrhythm.* 35(4):575–583; 2019.
215. Mojić M, Bogdanović Pristov J, Maksimovic-Ivanić D, Jones DR, Stanić M, Mijatović S, Spasojević I. Extracellular iron diminishes anticancer effects of vitamin C: an in vitro study. *Sci. Rep.* 4:5955; 2014.
216. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst. Rev.* 14(3):CD007176; 2012.
217. Myung SK, Ju W, Cho B, Oh SW, Park SM, Koo BK, Park BJ; Korean Meta-Analysis Study Group. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 346:f10; 2013.
218. Nkhili E, Loonis M, Mihai S, El Hajji H, Dangles O. Reactivity of food phenols with iron and copper ions: binding, dioxygen activation and oxidation mechanisms. *Food Funct.* 5:1186–1202; 2014.

## 7. PRILOZI



**Prilog 1** 2D spektri Epi (50 mM) u DMSO; (a)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY; (b)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC;  $^{15}\text{N}$  signal je standardizovan indirektno na tečni  $\text{NH}_3$ .



**Prilog 2** Analiza brzine skeniranja Epi/ $\text{Fe}^{3+}$  sistema; **(a)** Ciklični voltamogram Epi u odsustvu ili prisustvu  $\text{Fe}^{3+}$  dobijen na različitim vrednostima  $v$  (0,02 V/s – 0,2 V/s) korišćenjem BDD radne elektrode; Umetnute figure u svakom panelu predstavljaju zavisnost između  $I_{pa}$  (beli krugovi) i  $I_{pc}$  (crni krugovi; apsolutne vrednosti) i  $v^{1/2}$ ; Linearna interpolacija i  $R^2$  vrednosti su prikazane; **(b)**  $E_{pa}$  za Epi i  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}] = 4, 2, \text{ i } 1$  za različite brzine skeniranja; **(c)**  $D$  za Epi i različite  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}]$  odnose. Randl-Ševčik jednačina (donji levi ugao):  $n$ , broj transferovanih  $e^-$ ;  $A$ , površina radne elektrode (0,0707  $\text{cm}^2$ );  $C$ , koncentracija redoks vrsta u rastvoru ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ); **(d)** Konstanta brzine transfera elektrona ( $k_s$ ) za Epi i različite  $[\text{Epi}]/[\text{Fe}^{3+}]$  odnose; Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ( $\pm$  SE) merenja dobijeni pri različitim  $v$ ;  $k_s$  ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ). Nikolson-Šejn jednačina (donji desni ugao):  $R$ , standardna gasna konstanta;  $T$ , temperatura (298 K);  $F$ , Faradejeva konstanta;  $\Delta E_p$ , razlika između  $E_{pa}$  i  $E_{pc}$  za različite vrednosti  $v$ .

## 8. BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena (Komnen) Korać Jačić rođena je 27. februara 1988. godine u Beranama, Republika Crna Gora. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Beranama. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2007. godine kao redovan student, a diplomirala jula 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,19, sa diplomskim radom pod naslovom „Izolovanje i inaktivacija papaina iz *Carica papaya* na niskim temperaturama“. Iste godine upisala je master akademske studije na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, studijski program biofizička hemija. Master studije je završila jula 2014. godine sa prosečnom ocenom 10, i odbranila master rad pod naslovom „Aktivnost i izoenzimski sastav peroksidaza u stablu juvenilnih biljaka Pančićeve omorike (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) izloženih mehaničkom stresu savijanjem“. Školske 2015./2016. godine Jelena Korać Jačić je upisala doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program doktor hemije.

Od septembra 2016. godine zaposlena je na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, kao istraživač pripravnik, a od 2018. godine kao istraživač saradnik. Istraživač Jelena Korać Jačić je uključena na projekat osnovnih istraživanja Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, projekat br. OI 173017. Član je COST akcije CA 15133 „The Biogenesis of Iron-sulfur Proteins: from Cellular Biology to Molecular Aspects (FeSBioNet)“. Kao dobitnik stipendije bila je učesnik 1<sup>st</sup> FeSBioNet Training School, koja je održana od 19. do 23. juna 2017. godine u Lisabonu, Portugal, pod nazivom „Understanding the molecular mechanisms of Fe/S protein biogenesis“. Dobitnik je prve nagrade za najbolji poster na VIII Konferenciji Biohemijskog društva Srbije. U okviru COST akcije bila je na kratkom studijskom boravku u Krakovu, Poljska, u periodu od 27. maja do 31. maja 2019. godine.

Do sada ima sedam objavljenih naučnih radova u međunarodnim časopisima i to četiri rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorije M22) i dva rada u međunarodnim časopisima (M23).

## 9. IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora: Jelena K. Korać Jačić

Broj indeksa: DH10/2015

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Ispitivanje koordinativnih sposobnosti epinefrina prema  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  katjonima i redoks aktivnost nastalih kompleksa“.

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

### Potpis autora

U Beogradu, 13. 02. 2020.

Jelena Korać Jačić



# 10. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTOSKOG RADA

Ime i prezime autora: Jelena K. Korać Jačić

Broj indeksa: DH10/2015

Studijski program: Doktor hemijskih nauka

Naslov rada: „Ispitivanje koordinativnih sposobnosti epinefrina prema  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  katjonima i redoks aktivnost nastalih kompleksa“.

Mentori: dr Ivan Spasojević, naučni savetnik i dr Sanja Grgurić-Šipka, redovni profesor

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

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

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

**Potpis autora**

U Beogradu, 13.02.2020.

Jelena Korać Jačić

## 11. IZJAVA O KORIŠĆENJU

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

„Ispitivanje koordinativnih sposobnosti epinefrina prema  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  katjonima i redoks aktivnost nastalih kompleksa“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, 13.02.2020.

Jasmina Škoput Jarić

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.