

"57. Srečanje mladih raziskovalcev Slovenije"

KATEHINI IZ KAKAVA KOT LOVILCI KEMIJSKIH KARCINOGENOV – RAČUNALNIŠKI PRISTOP

RAZISKOVALNO PODROČJE: KEMIJA ALI KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Šola: Prva gimnazija Maribor

Avtor: Mia Miholič

Mentorji: mag. Helena Lonjak, dr. Veronika Furlan, dr. Urban Bren

2023, Maribor

Kazalo vsebine

POVZETEK	6
ABSTRACT	7
ZAHVALA.....	8
1 UVOD	9
1.1 Namen, hipoteze in cilji.....	9
2 TEORETIČNI DEL.....	11
2.1 Polifenoli	11
2.2 Kakav in (+)-katehin.....	11
2.3 Glutation	13
2.4 Kemijski karcinogeni.....	14
3.1 Molekularno modeliranje	16
3.1.1 Metoda Hartree-Fock	17
3.2 Geometrijska optimizacija in frekvenčna analiza	19
3.3 Scan površine potencialne energije	19
3.4 Solvatacijski efekt	20
3.5 Priprava vhodnih datotek za izvajanje izračunov	21
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.2 Tabelarični prikaz rezultatov.....	28
4.3 Primerjava aktivacijskih prostih energij	30
5 ZAKLJUČEK	33
6 VIRI IN LITERATURA	34
7 PRILOGE.....	37

Seznam slik

Slika 1: Kakavova zrna [5]	9
Slika 2: Primerjava aktivacijske proste energije za reakcijo kemijskega karcinogena s (+)-catehinom oz. gvaninom/glutationom	10
Slika 3: Kakavovec [11]	12
Slika 4: Kemijska struktura (+)-catehina [13].....	13
Slika 5: Kemijska struktura glutationa [8].....	13
Slika 6: Polarizacijski efekt p in d orbital [26]	18
Slika 7: Kavitacija topljence po modelu PCM [8].....	20
Slika 8: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja reakcije alkilacije med (+)-catehinom in 2-cianoetilen oksidom	24
Slika 9: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in AFB1 ekso-8,9-epoksidom. Vodikova vez je prikazana z modro črtkano črto ..	24
Slika 10: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in β -propiolaktonom	25
Slika 11: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in etilen oksidom	25
Slika 12: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in glicidamidom. Vodikova vez je prikazana z modro črtkano črto	26
Slika 13: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in kloroetilen oksidom	26
Slika 14: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in propilen oksidom	27
Slika 15: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in stiren oksidom	27
Slika 16: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in vinil karbamat epoksidom	28

Seznam tabel

Tabela 1: Vsebnost (+)-katehina v različnih živilih [9].....	12
Tabela 2: Rezultati, dobljeni z metodo Hartree-Fock pri najvišjem baznem setu.....	29
Tabela 3: Aktivacijske proste energije za reakcije alkilacije med (+)-catehinom, glutationom oziroma gvaninom [27] in posameznimi končnimi kemijskimi karcinogeni na nivoju teorije HF/6-311++G(d,p) v kombinaciji s solvacijskima modeloma SCRF in LD	30
Tabela 4: Rezultati, dobljeni z metodo Hartree-Fock pri baznem setu 6-31G(d,p)	37

Uporabljeni simboli in kratice

\hat{H}	Hamiltonov operator
Ψ	valovna funkcija
d^R	oddaljenost med reakcijskima centroma na (+)-catehinu in karcinogenu pri reaktantih (\AA)
d^{TS}	oddaljenost med reakcijskima centroma na (+)-catehinu in karcinogenu v prehodnem stanju(\AA)
ω^R	najnižja pozitivna frekvenca reaktantov (cm^{-1})
ω^{TS}	vrednost imaginarne frekvence, ki ustreza prehodnemu stanju (i cm^{-1})
E	celotna energija molekulskega sistema (kcal/mol)
ΔE	energija aktivacije v vakuumu (kcal/mol)
ΔG^\ddagger	aktivacijska prosta energija (kcal/mol)
ΔG_{bulk}	solvatacijski prispevek zunanjega dielektričnega kontinuma (kcal/mol)
ΔG_{do}	disperzijsko-odbojni prispevek k solvatacijski prosti energiji (kcal/mol)
ΔG_{ES}	elektrostatski prispevek k solvatacijski prosti energiji (kcal/mol)
ΔG_{exp}	eksperimentalno določena vrednost aktivacijske proste energije reakcije alkilacije med gvaninom in kemiskimi karcinogeni (kcal/mol)
ΔG_{hf}	solvatacijski prispevek hidrofobnih interakcij (kcal/mol)
ΔG_{kav}	kavitacijski prispevek k solvatacijski prosti energiji (kcal/mol)
ΔG_{sol}	solvatacijska prosta energija (kcal/mol)
ΔG_{pol}	solvatacijski prispevek polarizacije topljenca (kcal/mol)
ΔG_{vdW}	solvatacijski prispevek van der Waalsovih interakcij (kcal/mol)
ΔG_{LD}	aktivacijska prosta energija, dobljena po metodi LD (kcal/mol)
ΔG_{SCRF}	aktivacijska prosta energija, dobljena po metodi SCRF (kcal/mol)
$\Delta\Delta G_{hidr}$	razlika med hidratacijsko prosto energijo prehodnega stanja in hidratacijsko prosto energijo reaktantov (kcal/mol)
DNK	dezoksiribonukleinska kislina
HF	Hartree-Fock metoda
LD	metoda Langevinovih dipolov
PCM	model polarizabilnega kontinuma
SCRF	samouglašeno reakcijsko polje
VRANA	vzporedni računalnik za akceleracijo numeričnih algoritmov

POVZETEK

Kakav se ponaša s številnimi pozitivnimi vplivi na človeško zdravje, saj predstavlja vir antioksidantov, mineralov in vitaminov. Med najpomembnejše bioaktivne spojine kakavovih zrn prištevamo polifenole katehine. V raziskovalni nalogi smo s pomočjo kvantno-mehanskih simulacij preučevali polifenol (+)-catehin v vlogi lovilca devetih končnih kemijskih karcinogenov, ki smo jih v vsakdanjem življenju pogosto izpostavljeni.

S pomočjo kvantno-mehanske metode Hartree-Fock in dveh implicitnih solvatacijskih modelov smo pri dveh fleksibilnih baznih setih izračunali aktivacijske proste energije obravnavanih kemijskih reakcij med (+)-catehino in devetimi končnimi kemijskimi karcinogeni. Izračunane aktivacijske proste energije za reakcije (+)-catehina s končnimi kemijskimi karcinogeni smo na koncu primerjali z eksperimentalnimi vrednostmi za reakcije istih kemijskih karcinogenov z gvaninom, najbolj reaktivno bazo DNK, oziroma glutationom, najboljšim lovilcem kemijskih karcinogenov v našem telesu. Na podlagi primerjave smo določili, ali je (+)-catehin učinkovit lovilec kemijskih karcinogenov, ki lahko prepreči nastanek poškodb DNK.

Ključne besede: kakav, (+)-catehin, kemijski karcinogeni, kvantno-mehanske simulacije, aktivacijska prosta energija, gvanin, glutation

ABSTRACT

Cocoa possesses many positive effects on human health, as it represents a great source of antioxidants, minerals, and vitamins. One of the most important bioactive compounds of cocoa beans are polyphenols catechins. In our research, we examined (+)-catechin from cocoa as a polyphenolic scavenger of nine ultimate chemical carcinogens, to which we are frequently exposed in our everyday life using quantum-mechanical simulations.

By applying the quantum-mechanical method Hartree-Fock in conjunction with two different flexible basis sets and two implicit solvation models, we calculated the activation free energies of chemical reactions between (+)-catechin and nine ultimate chemical carcinogens of the epoxy type. The calculated activation free energies for the alkylation reactions of (+)-catechin with ultimate chemical carcinogens were compared with experimental values for the reactions of the same chemical carcinogens with guanine, the most reactive DNA base, and glutathione, the strongest scavenger of chemical carcinogens in human cells. Based on this comparison, we determined whether (+)-catechin is an effective scavenger of ultimate chemical carcinogens that could prevent DNA damage.

Keywords: cocoa, (+)-catechin, chemical carcinogens, quantum-mechanical simulations, activation free energy, guanine, glutathione

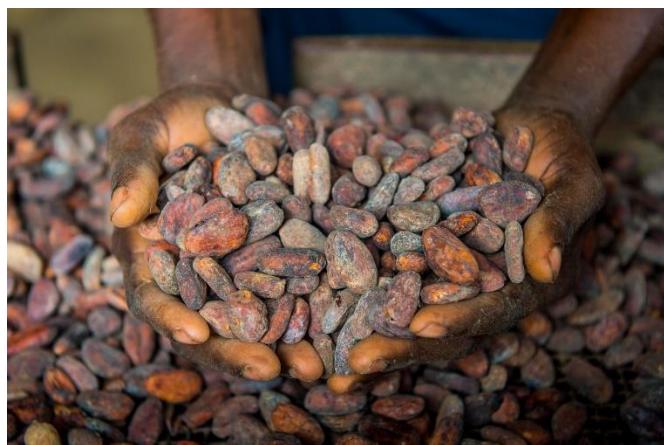
ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorjem s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo v Mariboru za vložen čas in vso pomoč pri izvedbi praktičnega dela. Iskrena zahvala gre raziskovalni mentorici asist. dr. Veroniki Furlan, ki je usmerjala raziskovalno delo in pisanje raziskovalne naloge ter mi priskrbela literaturo. Hvala za ves trud in pomoč. Hvaležna sem tudi svoji šolski mentorici mag. Heleni Lonjak, ki me je navdušila za tematiko ter pisanje naloge in pomagala pri njenem oblikovanju.

1 UVOD

V sodobnem času smo obdani z vedno več škodljivimi snovmi, ki imajo izredno negativen vpliv na naše zdravje. Mednje uvrščamo tudi fizikalne, kemijske in biološke karcinogene, ki povzročajo rakava obolenja.[1] Eksperimentalno preučevanje kemijskih karcinogenov je lahko zaradi tega zelo nevarno. Mehanizme nastanka poškodb na dednem materialu, ki so posledica njihovega delovanja, pa je mogoče na varen način preučiti z uporabo metod računalniške kemije.

V želji po izboljšanju vitalnosti se ljudje pogosto zatekajo k naravnim učinkovinam, predvsem tistim, ki jih najdemo v rastlinah. Eno izmed najbolj priljubljenih živil z že znanimi in raziskanimi pozitivnimi učinki na zdravje je kakav (Slika 1). Kakav je zimzelena rastlina, ki izvira iz tropskih predelov Centralne in Južne Amerike. Ponaša se s številnimi pozitivnimi lastnostmi za dobrobit človeškega zdravja, saj vsebuje veliko različnih antioksidantov, vitaminov in mineralov.[2,3] Med najpomembnejše bioaktivne spojine kakavovih zrn prištevamo polifenole katehine iz skupine flavanolov. Katehine najdemo tudi v hmelju, zelenem čaju in rdečem vinu, odlikujejo pa jih protivnetno, antioksidativno in antikarcinogeno delovanje.[4]

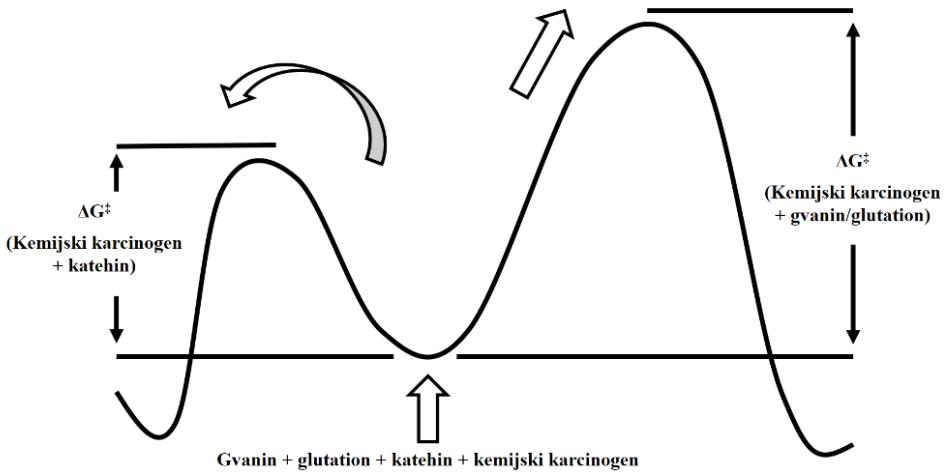


Slika 1: Kakavova zrna [5]

1.1 Namen, hipoteze in cilji

V raziskovalni nalogi smo raziskovali antikarcinogeni potencial (+)-catehina v vlogi lovilca devetih končnih kemijskih karcinogenov s pomočjo kvantno-mehanskih simulacij. Da bi se čim bolj približali biološkemu okolju v celici smo pri simulacijah upoštevali vpliv topila (vode). S pomočjo kvantno-mehanske metode Hertree-Fock v kombinaciji z dvema fleksibilnima

baznima setoma smo izračunali aktivacijske proste energije za vezavo devetih končnih kemijskih karcinogenov s (+)-catehinom in jih primerjali z aktivacijskimi prostimi energijami vezave istih karcinogenov z gvaninom oziroma glutationom (Slika 2).



Slika 2: Primerjava aktivacijske proste energije za reakcijo kemijskega karcinogena s (+)-catehinom oz. gvaninom/glutationom

Oblikovali smo naslednje hipoteze:

Hipoteza 1: Aktivacijska prosta energija za reakcije končnih kemijskih karcinogenov s (+)-catehinom je nižja od aktivacijske proste energije za reakcije istih karcinogenov z gvaninom. To pomeni, da reakcija kemijskih karcinogenov s (+)-catehinom poteče hitreje od reakcije enakih karcinogenov z gvaninom. (+)-Katehin torej reagira s karcinogeni, preden bi se ti lahko vezali na DNK in jo poškodovali.

Hipoteza 2: Aktivacijska prosta energija za reakcije končnih kemijskih karcinogenov s (+)-catehinom je nižja od aktivacijske proste energije za reakcije istih karcinogenov z glutationom. Reakcija kemijskih karcinogenov s (+)-catehinom torej poteče hitreje od reakcije z glutationom. (+)-Katehin posledično zagotavlja učinkovitejšo zaščito DNK pred končnimi kemijskimi karcinogeni.

Hipoteza 3: Obravnavane reakcije potekajo po mehanizmu nukleofilne substitucije tipa 2 (S_N2).

Cilj raziskovalne naloge je ugotoviti, ali je (+)-catehin učinkovit lovilec obravnavanih končnih kemijskih karcinogenov, oziroma koliko in katere izmed njih lahko ulovi preden lahko le-ti poškodujejo naš dedni material. Z naložo želimo raziskati tudi reakcijski mehanizem, po katerem (+)-catehin preprečuje nastanek raka.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Polifenoli

Polifenoli predstavljajo veliko skupino več kot 10 000 naravnih spojin, za katere je značilen en ali več aromatskih obročev z vsaj eno vezano hidroksilno skupino. Polifenoli so sekundarni rastlinski metaboliti, prisotni v sadju, zelenjavi in zeliščih. Veljajo za močne antioksidante – delujejo kot lovilci prostih kisikovih in dušikovih radikalov, učinkujejo protivnetno ter ščitijo pred UV-svetlobo. Polifenoli rastlinam predstavljajo zaščito, predvsem pred paraziti in plenilci, kažejo pa tudi velik potencial pri zdravljenju in preprečevanju srčno-žilnih bolezni in različnih vrst raka.[6]

Polifenoli so del naše prehrane, pri čemer njihov povprečni dnevni vnos znaša 1 g/dan, kar je precej več kot v primeru drugih zaužitih antioksidantov. Dnevni vnos vitamina C znaša na primer 75 do 90 mg/dan.[7] Glavni vir polifenolov so sadeži, kot so grozdje, citrusi, jagodičevje in breskve, najdemo pa jih tudi v zelenem in črnem čaju, rdečem vinu, pivu, različnih oreščkih, žitaricah in kakavu. Hrana navadno vsebuje kompleksne mešanice polifenolov, najpogosteji v naši prehrani pa spadajo v skupino flavonoidov in fenolnih kislin.[8]

Polifenoli lahko s svojim antioksidativnim delovanjem preprečijo oksidativni stres v naših celicah, ki ga povzročajo reaktivne dušikove in kisikove spojine. Oksidativni stres v celicah je lahko posledica vnetja, ki je običajno močno povezano z nastankom raka.[1] Prav zaradi tega so polifenoli eden izmed glavnih kandidatov za raziskave preprečevanja rakavih obolenj. Pri tem so njihove ključne prednosti visoka vsebnost v številnih naravnih virih, nizka toksičnost za organizem ter specifičnost odziva. Slabost pa predstavlja njihova nizka biodostopnost za celice, hitra presnova in hitra izločitev iz telesa, zaradi česar dosežejo tarčne celice v nizkih koncentracijah.[9]

2.2 Kakav in (+)-katehin

Kakavovec (*Theobroma cacao*) je zimzeleno drevo, ki izvira iz tropov Srednje in Južne Amerike (Slika 3). Kakav so ob poročnih ceremonijah in obredih uporabljale že zgodnje južno-ameriške civilizacije. Maji in Azteki so verjeli, da je kakav darilo bogov. Od tu izvira beseda za kakav (*kakawa*), ki v dobesednem prevodu pomeni "hrana bogov".[3]

Letno proizvedemo milijone ton kakavovih zrn. Največ ga proizvedejo v Afriki, kljub temu pa Afričani predstavljajo le 3 % svetovne potrošnje čokolade.[10] Kakavova zrna vsebujejo vodo,

lipide, beljakovine, vlaknine ter številne bioaktivne snovi, ki so v raziskavah na živalih že pokazale antikarcinogeno delovanje.[2]



Slika 3: Kakavovec [11]

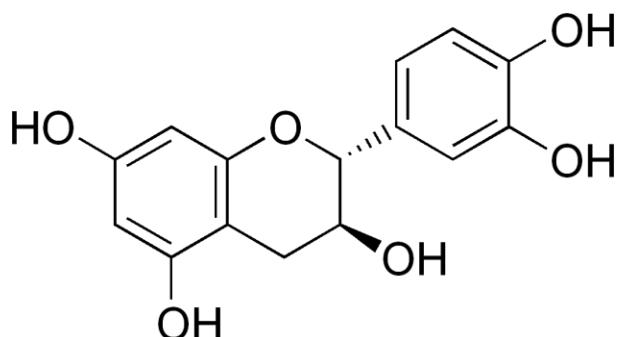
Skupno je bilo v kakavu identificiranih 380 bioaktivnih spojin. Med njimi prevladujejo polifenoli in ksantinski alkaloidi, ki skupno tvorijo 14-20% teže kakavovega zrna. Kakav je še posebej bogat s flavanoli, ki predstavljajo 60% celotnega ne-fermentiranega kakavovega zrna. Mednje spadajo monomerne oblike, (+)-catehin in (-)-epikatehin, ter njune oligomerne oblike, procianidini. Flavanoli pomagajo pri zaščititi pred srčnimi boleznimi, nižajo krvni tlak, skrbijo za pretok krvi in preprečujejo celične poškodbe.[9]

Pozitivni učinki flavanolov na zdravje so odvisni od našega metabolizma, absorpcije, hitrosti njihovega izločanja ter njihove kemiske strukture. Kot pri vseh drugih spojinah, pa je tudi pri njih delovanje odvisno od zaužite koncentracije. Proizvodnja kakavovih izdelkov je večstopenjski proces, predelava pa vodi do spremnjanja koncentracije fitokemikalij, med drugim tudi (+)-catehina, zato ni vseeno po katerem živilu posežemo (Tabela 1).

Tabela 1: Vsebnost (+)-catehina v različnih živilih [9]

Vir (+)-catehina	Vsebnost (+)-catehina (mg/g)
Kakavovo zrno	0,28
Praženo kakavovo zrno	0,33
Alkalizirano kakavovo zrno	0,26
Alkaliziran kakav v prahu	0,60
Sušeno alkalizirano kakavovo zrno	0,33
Kakavov liker	0,34
Čokolada za peko	0,24
Mlečna čokolada	0,05 – 0,12

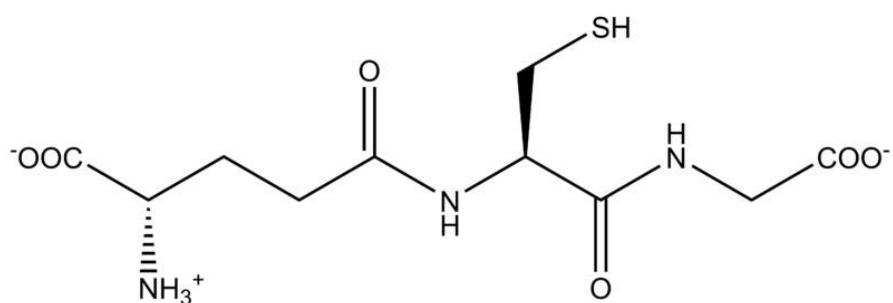
(+)-Katehin je sekundarni rastlinski metabolit z antioksidativnimi lastnostmi. Po kemijski strukturi spada med flavan-3-ole, sestavljata pa ga dva polifenolna obroča (Slika 4). Njegova molekulska formula je C₁₅H₁₄O₆. Znanstvene raziskave so dokazale, da so katehini koristni za zdravje ljudi.[2] Z laboratorijskimi preiskavami so odkrili, da katehini, prisotni v listih čajevca, preprečujejo rast rakavih celic ter lovijo proste radikale, ki povzročajo celične poškodbe, katerih posledica je lahko rak.[12] Analogne biološke učinke lahko pripisemo tudi katehinom v kakavu. V raziskovalni nalogi smo zato raziskali antikarcinogeni potencial (+)-catehina v vlogi lovilca devetih končnih kemijskih karcinogenov, ki do sedaj še ni bil raziskan.



Slika 4: Kemijska struktura (+)-catehina [13]

2.3 Glutation

Glutation je znotrajcelični tripeptid in predstavlja pomembno hidrofilno biomolekulo, ki sodeluje v procesu detoksifikacije v celicah (Slika 5).[14] Aktivira se ob prisotnosti ksenobiotikov in z njimi reagira ter tako zmanjša njihovo reaktivnost in posledično toksičnost. V celicah deluje kot polarni lovilec ksenobiotikov, vezava ksenobiotikov in glutationa pa omogoča večjo polarnost in s tem enostavnejše izločanje ksenobiotikov iz telesa. Glutation predstavlja najmočnejši naravni lovilec kemijskih karcinogenov in prostih radikalov v naših celicah, kljub temu pa lahko zaradi prenizke koncentracije glutationa v celicah pride do oksidativnega stresa, ki ima pomembno vlogo pri pospešenem staranju in nastanku raka.[8]



Slika 5: Kemijska struktura glutationa [8]

2.4 Kemijski karcinogeni

Rak je bolezen sodobnega časa, ki predstavlja drugo najbolj smrtonosno bolezen za srčno-žilnimi obolenji. Usodna je za enega od šestih ljudi. Po definiciji bolezen označujemo kot nenadzorovano delitev in rast človeških celic. Zaradi nenadzorovanih delitev se rakave celice razraščajo v okoliško tkivo, prek krvnega ali limfnega sistema pa se lahko razširijo tudi v oddaljene organe.[15] Znanstveniki predvidevajo, da bi se lahko z uravnoteženo prehrano, aktivnim in zdravim načinom življenja (brez kajenja, uživanja alkohola in drog) število obolelih za rakom zmanjšalo kar za dve tretjini.[16] Zdrav način življena pa postaja vedno težje dosegljiv tudi zaradi onesnaževanega okolja in hrane. Skoraj nemogoče se je popolnoma izogniti nevarnim karcinogenim snovem, ki nas obdajajo.

Karcinogen je vsakršna spojina ali sevanje, ki povzroča nastanek raka. Delimo jih na fizikalne, kemijske in biološke karcinogene. Skupna lastnost vseh pa je, da lahko poškodujejo celično DNK in tako povzročijo mutacije – genotoksični karcinogeni, ali spremenijo izražanje genov brez poseganja v strukturo DNK – epigenetski karcinogeni.[17]

Kemijska karcinogeneza je večstopenjski proces, katerega sprožitelj je izpostavljenost kemijskim karcinogenom, ki so prisotni v okolju in naši prehrani. Večina rakotvornih snovi ne reagira neposredno z nukleofilnimi dušikovimi bazami DNK, temveč se v genotoksične elektrofilne metabolite oziroma končne kemijske karcinogene pretvori s presnovnimi procesi s pomočjo encimov citokroma P450. Ker elektrofilne metabolite privlačijo nukleofili, le-ti reagirajo z najbolj reaktivno nukleobazo DNK – gvaninom, kar vodi v nastanek mutacij na DNK.[1]

V raziskovalni nalogi smo v eksperimentalnem delu preučevali devet končnih kemijskih karcinogenov, ki smo jim v vsakdanjem življenju pogosto izpostavljeni:

- 2-cianoetilen oksid
- AFB1 ekso-8,9-epoksid
- β-propiolakton
- etilen oksid
- kloroetilen oksid
- glicidamid
- propilen oksid
- stiren oksid
- vinil karbamat epoksid

2-cianoetilen oksid nastane pri oksidaciji akrilonitrila, ki ga uporabljam v proizvodnji smol, plastike in polimerov.[18] Aflatoksin B1 ekso-8,9-epoksid je presnovni metabolit aflatoksina B1, ki je prisoten v plesni, ki se razvije na žitaricah, oreščkih, oljih ter krmih, v zelo vlažnem okolju z visoko temperaturo.[19] β -propiolakton se uporablja v cepivih za virusne okužbe.[20] Etilen oksid se uporablja za sterilizacijo medicinske opreme in za dezinfekcijo.[21] Kloroetilen oksid se v jetrih presnovi iz vinil klorida, ki se uporablja v industriji plastike, kmetijstvu in elektroindustriji.[22] Glicidamid se presnovi iz akrilamida, produkta Maillardove reakcije, ki nastaja pri cvrtju hrane.[8] Propilen oksid je v rabi kot sredstvo za sterilizacijo [23] stiren oksid pa se uporablja pri proizvodnji plastike.[24] Vinil karbamat epoksid je presnovni metabolit uretana, ki se kot stranski produkt izloča med fermentacijo, prisoten pa je tudi v tobaku.[25]

3 EKSPERIMENTALNI DEL

Eksperimentalni del raziskovalne naloge smo izvedli s pomočjo molekularnega modeliranja oziroma računalniške kemije. Najprej smo na osebnem računalniku v operacijskem sistemu Linux pripravili vhodne datoteke za vse reaktante ((+)-catehin z vsakim posameznim karcinogenom) in jih nato poslali na superračunalnike VRANA, kjer smo zagnali kvantno-mehanske izračune s programom Gaussian 09. Izračune smo izvajali na vseh 50 računalnikih s 16 procesorji iz superračunalniške gruče VRANA. Na posamezni računalnik smo se povezali z ukazom ssh ime_računalnika (npr. ssh o1.vrana13).

Ko so se izračuni končali, smo dobili izhodne log datoteke z optimiziranimi strukturami reaktantov, ki smo jih prenesli nazaj na osebni računalnik. Nato smo izvedli sproščeni scan, s katerim smo locirali začetni približek prehodnih stanj obravnavanih reakcij. Nadalje smo na enak način kot v primeru reaktantov s programom Gaussian 09 pridobili optimizirane strukture prehodnih stanj. Rezultate iz izhodnih datotek smo pridobili s pomočjo tekstovnega urejevalnika Geany in programa za vizualizacijo Gmolden. Na koncu smo s programom Avogadro pripravili slike, ki prikazujejo optimizirane strukture reaktantov in prehodnih stanj.

3.1 Molekularno modeliranje

Molekularno modeliranje ali računalniška kemija je področje kemije, ki se ukvarja z matematičnimi enačbami klasične in kvantne fizike. Z njim je mogoče posnemati obnašanje molekulskega sistema. Modeliranje delimo na dve področji: kvantno in klasično mehaniko.[26] Kvantna mehanika matematično opisuje obnašanje osnovnih delcev (elektronov). Osnova večine metod kvantne kemije je Schrödingerjeva enačba (enačba 1), ki je analitično rešljiva samo za primer vodikovega atoma oziroma za enoelektronske sisteme.[14]

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

Kjer je:

\hat{H} Hamiltonov operator

Ψ valovna funkcija

E celotna energija molekulskega sistema (kcal/mol).

Z molekularnim modeliranjem lahko, če opredelimo notranje koordinate, molekule vizualiziramo. Simulacija sicer ne more nadomestiti eksperimenta, lahko pa usmerja

eksperimente in napove njihov izid. Računalniško kemijo pogosto uporabljajo na področju farmacije, saj je z njo mogoče preučevati interakcije zdravil in biomolekul. Zaradi varne uporabe pa ima računalniška kemija velik pomen tudi pri raziskovanju karcinogenov in drugih nevarnih snovi.[26]

3.1.1 Metoda Hartree-Fock

Ko preučujemo atome ali molekule z več kot enim elektronom, moramo pri računanju upoštevati Coulombske odbojne sile med elektroni. Posledično to onemogoči rešitev Schrödingerjeve enačbe, ki je analitično rešljiva samo za sistem z enim elektronom.[1] Pri tem pomaga Hartree-Fock (HF) metoda, s katero dobimo približne vrednosti Schrödingerjeve enačbe. Edini problem metode je, da zanemari medsebojne interakcije med elektroni. V izračunih uporabljam variacijski približek, ki elektrone obravnava kot skupek z neko elektronsko gostoto in ne kot posamezne delce.

Osnova HF metode sta dva približka:

- 1.) Molekulska orbitala je predstavljena kot linearna kombinacija baznih funkcij, ki tvorijo bazni set.
- 2.) Valovna funkcija sistema je predstavljena s Slaterjevo determinanto, z matričnimi elementi v obliki molekulskih orbital.

Kompleksne molekulske orbitale so poenostavljene na take z enim elektronom. Gibanje vsakega elektrona je po teoriji molekulskih orbital opisano z enoelektronsko valovno funkcijo.

Iteracijska metoda Hartree-Fock deluje po principu samouglašenega polja. Najprej si izmislimo začetno valovno funkcijo – tako dobimo začetno gostoto elektronov. S pomočjo elektronske gostote izračunamo enoelektronske valovne funkcije za vse elektrone sistema. Enoelektronske orbitale z linearo kombinacijo združimo v novo valovno funkcijo ter ponovimo postopek računanja elektronske gostote.

Tako nadaljujemo, dokler nova valovna funkcija ni dovolj podobna prejšnji. Z vsakim korakom se energija sistema zniža, vrednost gostote elektronov pa se izboljša. Končni cilj je molekulska valovna funkcija z najnižjo možno energijo.[26]

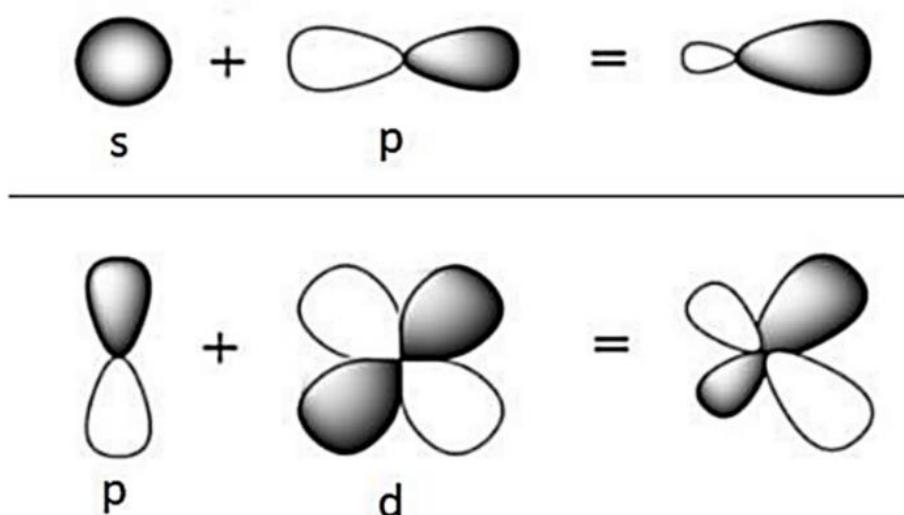
3.1.2 Bazni set

Bazni set je sestavljen iz Gaussianov (Gaussovih funkcij), ki ponazarjajo atomske orbitale. Iz teh orbital program s pomočjo linearnih kombinacij izračuna molekulske orbitale. Ko izbiramo bazni set moramo paziti, da je le-ta dovolj natančen in hkrati čas trajanja izračunov ni predolg. Bolj, ko je metoda natančna (uporabimo višje bazne sete), dlje časa potekajo kvantno-mehanski izračuni.[1]

V raziskovalni nalogi smo uporabili dva različna bazna seta: 6-31G(d) in 6-311++G(d,p).

Posamezni simboli v zapisu baznega seta opisujejo njegove značilnosti. Za bazni set 6-311++G(d,p) številka 6 predstavlja elektrone v notranji lupini, opisane s šestimi Gaussovimi funkcijami (G). Valenčni ozziroma zunanji elektroni so označeni s 311. Difuzne funkcije, označene s ++, so pomembne pri obravnavi nabitih sistemov, saj upoštevajo elektronsko gostoto, ki je močno oddaljena od jedra.

Oznaki (d,p) predstavlja polarizacijski funkciji, ki upoštevata različno elektronegativnost atomov v molekulskejem sistemu. Atomi se nahajajo zelo blizu drugega, zato njihova razporeditev naboja povzroči polarizacijo, ki spremeni obliko atomskih orbital. Valenčne s orbitale pridobijo značilnosti p orbital, valenčne p orbitale pa značilnosti d orbital. Črka d pomeni kombinacijo zunanjih p orbital z d orbitalami, črka p pa označuje funkcijo, ki kombinira s orbitale s p orbitalami (Slika 6).[26]



Slika 6: Polarizacijski efekt p in d orbital [26]

3.2 Geometrijska optimizacija in frekvenčna analiza

Ureditev atomov neke molekule v prostoru predstavlja molekulsko geometrijo. Razporeditev atomov in elektronov določa energijski nivo molekule. Energija pa se lahko spremeni že z majhno spremembo molekulske strukture.

V raziskovalni nalogi smo pridobili optimizirane strukture reaktantov in prehodnih stanj. Za vse reaktante (posamezni končni kemički karcinogen s (+)-catehinom) smo poiskali strukturo z najnižjo možno energijo. To je namreč cilj geometrijske optimizacije oziroma energijske minimizacije – najti strukturo molekule z minimalno energijo. V tem stanju je struktura najstabilnejša, v taki obliki se pojavlja v naravi.

Energijska minimizacija pri izračunu energije molekule ne upošteva vibracij atomov, zato izračunamo energijo idealiziranih položajev atomov v molekuli. Za realnejšo oceno energije po geometrijski optimizaciji opravimo še frekvenčno analizo molekule v harmonskem približku. Za opis potencialne energije vibracij atomov uporabimo model harmonskega oscilatorja (matematična kvadratna funkcija oziroma parabola).[26] Z upoštevanjem harmonskega približka nam drugi odvod predstavlja najvišji člen v Taylorjevi vrsti, višje odvode pa zanemarimo. Optimalno vibriranje atomov je mogoče določiti le v ravnotežni geometriji molekule z minimalno energijo, molekula mora biti pred frekvenčno analizo torej geometrijsko optimizirana.

Če so po frekvenčni analizi vse frekvence pozitivna realna števila, to pomeni, da smo našli lokalni minimum na površini potencialne energije, ki predstavlja optimalno geometrijo reaktantov. Ko je natanko ena frekvenca imaginarno število, vse ostale pa so pozitivne, pa to pomeni, da smo našli sedelno točko na površini potencialne energije in locirali ravnotežno geometrijo prehodnega stanja.

3.3 Scan površine potencialne energije

Funkcija Scan vrši pregled površine potencialne energije. Scan smo uporabili za lociranje začetnega približka prehodnega stanja. Pred izvedbo scana smo določili spremenljivke ter izbrali enega izmed dveh načinov pregledovanja – sproščeni scan.[1] Pregled smo opravili s sproščenim scantom, ki v vsaki točki na površini potencialne energije izvede še geometrijsko optimizacijo ostalih koordinat.

Pred začetkom scana smo strukturo molekulskega sistema definirali s kartezičnimi koordinatami ter v vhodni datoteki določili dolžino reakcijske vezi (\AA) v vlogi spremenljivke na sledeč način:

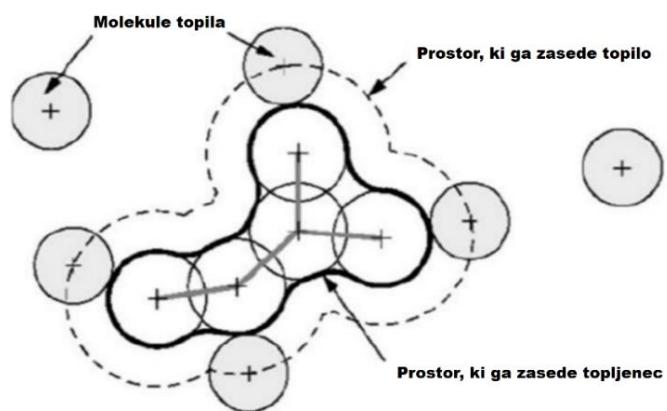
12 S 50 0.05

Številki 1 in 2 predstavljata dva atoma, S pove, da bo program zagnal sproščeni scan, ki bo potekal v 50 korakih, dolžina enega koraka pa znaša 0,05. Gaussian bo torej 50-krat povečal razdaljo med atomoma za dolžino 0,05 \AA .

3.4 Solvatacijski efekt

V bioloških sistemih reakcije ne potekajo v vakuumu, temveč v topilu – vodi. Tudi okolje v celici, kjer pride do reakcije med končnimi kemijskim karcinogenom in DNK, je obdano s topilom. Topilo pomembno vpliva na potek kemijske reakcije, saj lahko spremeni energijo, obstojnost in orientacijo molekul v prostoru. Vpliv topila na obravnavane reakcije alkilacije smo upoštevali z vključitvijo dveh solvatacijskih modelov: modelom polarizabilnega kontinuma (PCM) in metodo Langevinovih dipolov (LD). Solvatacijski modeli topilo obravnavajo kot kontinuumski medij, ki obdaja obravnavani topljenec.

Model polarizabilnega kontinuma poenostavi izračune, saj je topilo obravnavano kot brezstrukturni kontinuum, pri katerem eksplicitnih interakcij topljenca in topila ni potrebno računati. Model predpostavlja, da prostora, ki ga zavzame topljenec, molekule topila ne morejo zavzeti. Topljenec se nahaja v prazni votlini neprekinjenega dielektričnega medija, ki posne ma topilo (Slika 7). Votlina se imenuje kavitacija topljenca.[8]



Slika 7: Kavitacija topljenca po modelu PCM [8]

Solvatacijsko prosto energijo PCM model izračuna z enačbo 2:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{ES} + \Delta G_{do} + \Delta G_{kav} \quad (2)$$

kjer je:

ΔG_{sol} solvatacijska prosta energija (kcal/mol)

ΔG_{ES} elektrostatski prispevek k solvatacijski prosti energiji (kcal/mol)

ΔG_{do} disperzijsko-odbojni prispevek k solvatacijski prosti energiji (kcal/mol)

ΔG_{kav} kavitacijski prispevek k solvatacijski prosti energiji (kcal/mol)

Pri PCM modelu se upošteva princip samouglasenega reakcijskega polja (SCRF) – prostor izven molekulskega radija topljenca ima enako dielektrično konstanto kot topilo.

Drugi solvatacijski model je model Langevinovih dipolov. Njegova osnova so interakcije med elektrostatskim poljem topljenca, ki izvira iz nabojev na njegovih atomih, ter točkastimi dipoli, ki so mrežasto porazdeljeni okrog topljenca. Mreža dipolov je obdana še z dielektričnim kontinuumom.[26] Prosto energijo solvatacije po metodi LD izračunamo z enačbo 3:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{ES} + \Delta G_{bulk} + \Delta G_{vdW} + \Delta G_{hf} + \Delta G_{pol} \quad (3)$$

kjer je:

ΔG_{sol} solvatacijska prosta energija (kcal/mol)

ΔG_{ES} elektrostatski prispevek k solvatacijski prosti energiji (kcal/mol)

ΔG_{bulk} solvatacijski prispevek zunanjega dielektričnega kontinuma (kcal/mol)

ΔG_{vdW} solvatacijski prispevek van der Waalsovih interakcij (kcal/mol)

ΔG_{hf} solvatacijski prispevek hidrofobnih interakcij (kcal/mol)

ΔG_{pol} solvatacijski prispevek polarizacije topeljca (kcal/mol)

3.5 Priprava vhodnih datotek za izvajanje izračunov

Preden smo izračune izvedli na superračunalnikih VRANA v Ljubljani, smo na domačem računalniku pripravili vhodne datoteke. V vhodnih datotekah smo definirali specifikacije, s katerimi je program Gaussian 09 izvedel izračune.

Vhodne datoteke smo definirali po sledečem sistemu:

- V prvi vrstici smo opredelili število procesorjev, uporabljenih pri izračunih. Pri vseh smo določili uporabo 16 procesorjev.

%Nproc=16

- Druga vrstica predstavlja velikost prostora, ki ga lahko program uporabi za izdelavo izhodnih (.chk in .log) datotek. Za vse izračune je bilo na voljo 5 GB prostora.

%mem=5GB

- Ime datoteke, ki vsebuje informacije o strukturi sistema ter načinu opravljanja procesnih operacij, smo definirali v tretji vrstici.

%chk=ime_datoteke

- Naslednja vrstica je rezervirana za določitev kvantno-mehanske metode, baznega seta in druge izračune, vedno se začne z znakom #P. Peta vrstica je prazna.

#P Ime metode Bazni set Geometrijska optimizacija Frekvenčna analiza

- Sledi naslov datoteke, ki ga Gaussian 09 ne upošteva, zato lahko tu zapišemo karkoli. Za naslovom ponovno sledi prazna vrstica, ki naslovni del loči od specifikacije molekul.

Katehin in kloroetilen oksid prehodno stanje brez topila

- Sledijo molekulske specifikacije. V prvi vrstici določimo naboj celotnega sistema (0 za nevtralni sistem, +1 za kation in -1 za anion) ter spinsko multipliciteto, definirano z enačbo $2S+1$ (S predstavlja skupni molekulski spin, pri sparjenih elektronih velja pravilo $S=0$, pri nesparjenih pa $S=0,5$). Nato strukturo molekule definiramo s kartezičnimi koordinatami. Sledi prazna vrstica.

Simbol atoma	X-koordinata	Y-koordinata	Z-koordinata
---------------------	---------------------	---------------------	---------------------

- Pri vhodnih datotekah za funkcijo scan, smo definirali še razdaljo med reaktivnima mestoma, ki se je med scanom spremenjala.

1 2	S	50	0.05
------------	----------	-----------	-------------

- Na koncu sledita dve prazni vrstici, ki označujeta konec zapisa vhodne datoteke.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultati so prikazani za vsak karcinogen posebej. Najprej je podana primerjava optimiziranih struktur reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije (+)-catechina in posameznega končnega kemijskega karcinogena. Na slikah so atomi vodika predstavljeni z belo, atomi ogljika s sivo, atomi kisika z rdečo, atomi klora z zeleno in atomi dušika z modro barvo. Vodikova vez je prikazana z modro črtkano črto. Slike so izdelane pri kombinaciji metode Hertree-Fock (HF) z najvišjim baznim setom HF/6-311++G(d,p) s programom Avogadro.

V Tabeli 2 so prikazane vrednosti aktivacijske proste energije v vakuumu, aktivacijske proste energije v topilu, dobljene po metodi SCRF, najnižja pozitivna frekvenca reaktantov, vrednost imaginarni frekvence prehodnega stanja ter razdalja med reaktivnima centroma na (+)-catehinu in kemiskem karcinogenu pri reaktantih in v prehodnem stanju.

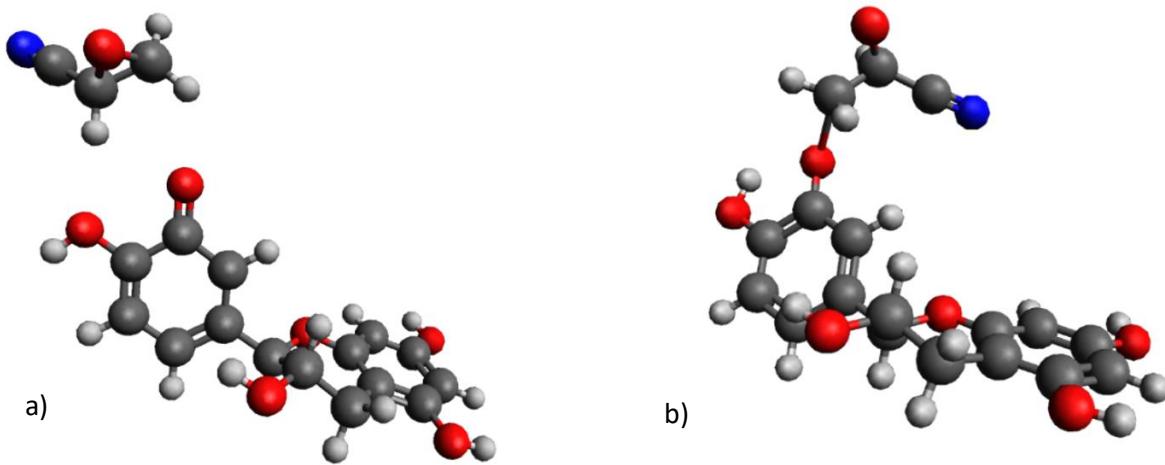
Pomemben vpliv na aktivacijsko prosto energijo predstavlja topilo. Zaradi tega smo v nadaljevanju v Tabeli 3 primerjali aktivacijske proste energije, dobljene z metodo Hartree-Fock pri najvišjem baznem setu HF/6-311++G(d,p) po dveh solvatacijskih metodah SCRF in LD. Tako smo izbrali najboljšo kombinacijo metode in solvatacijskega modela, ki se za reakcijo posameznega karcinogena z gvaninom najbolje ujema z eksperimentalno izmerjeno vrednostjo za reakcijo gvanina z istim karcinogenom. Predvidevamo lahko, da je aktivacijska prosta energija za reakcije (+)-catehina oziroma glutationa z istim karcinogenom, dobljena z enako kombinacijo metode in solvatacijskega modela, najbolj podobna eksperimentalni vrednosti.

Na koncu smo vrednosti aktivacijskih prostih energij za reakcije posameznih karcinogenov s (+)-catehinom, dobljene z izbrano kombinacijo metode in solvatacijskega modela, primerjali z vrednostmi energij za reakcije istih karcinogenov z gvaninom, najbolj reaktivno dušikovo bazo DNK, in glutationom, najboljšim lovilcem kemijskih karcinogenov v človeških celicah. Na podlagi tega smo določili, ali je (+)-catechin dober lovilec posameznih karcinogenov.

4.1 Slikovni prikaz rezultatov

V tem delu smo primerjali strukture reaktantov (označene z a) in prehodnih stanj (označene z b) za reakcije alkilacije devetih končnih kemijskih karcinogenov s (+)-catehinom.

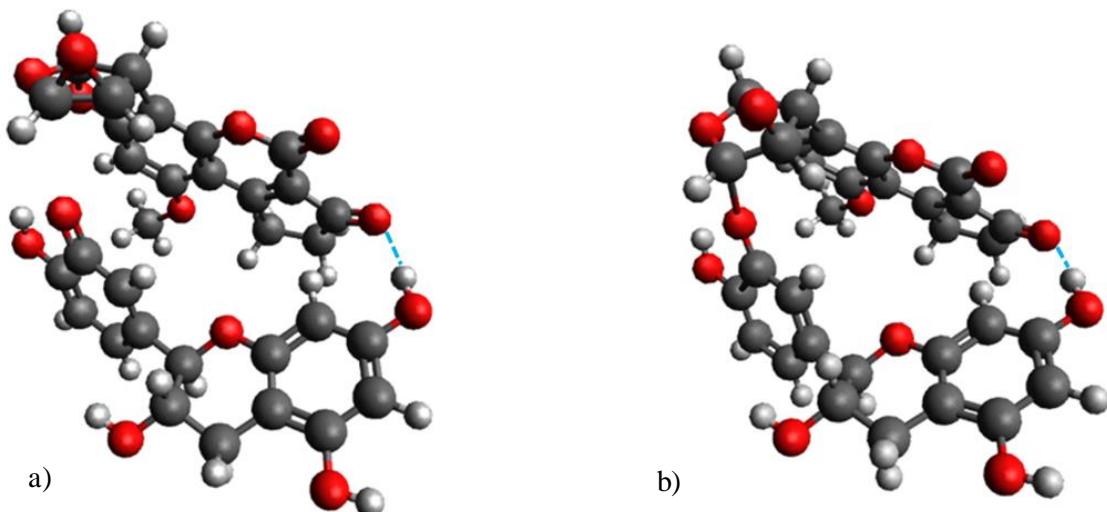
Na Sliki 8 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med 2-cianoetilen oksidom in (+)-catehinom.



Slika 8: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja reakcije alkilacije med (+)-catehinom in 2-cianoetilen oksidom

Slike 8 z oznako b) je razvidno, da se molekula 2-cianoetilen oksida približa (+)-catehinu, pri čemer se razpre epoksidni obroč na karcinogenu in nastane nova kovalentna vez med reakcijskima mestoma (kisikom na (+)-catehinu in akiralnim ogljikom na 2-cianoetilen oksidu). Hidroksilna skupina na (+)-catehinu se med reakcijo obrne, kar dodatno stabilizira strukturo (+)-catehina in karcinogena.

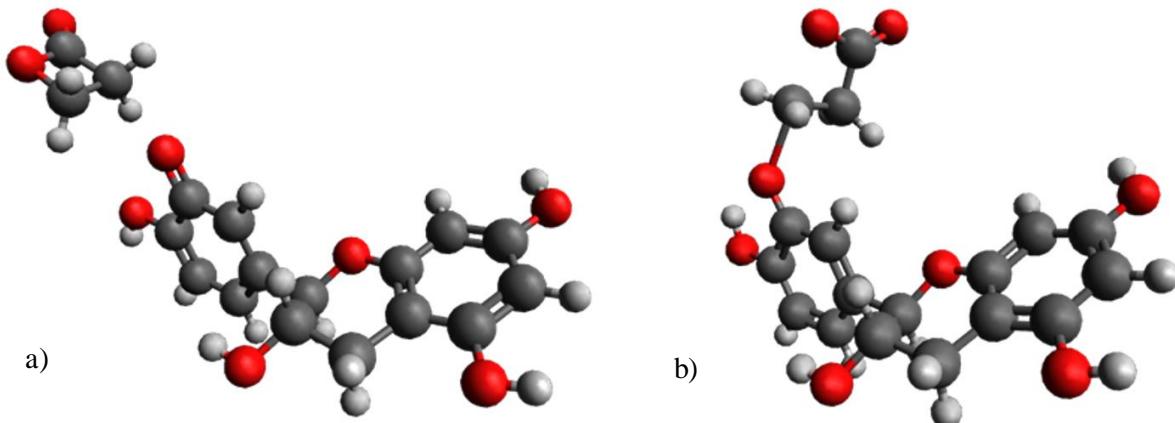
Na Sliki 9 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med AFB1 ekso-8,9-epoksidom in (+)-catehinom.



Slika 9: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in AFB1 ekso-8,9-epoksidom. Vodikova vez je prikazana z modro črtkano črto

S Slike 9 (oznaka b) je razvidno, da se med reakcijo odpre epoksidni obroč na AFB1 ekso-8,9-epoksidu. Nukleofilni kisik na (+)-catehinu pa se poveže z elektrofilnim ogljikom na AFB1 ekso-8,9-epoksidu.

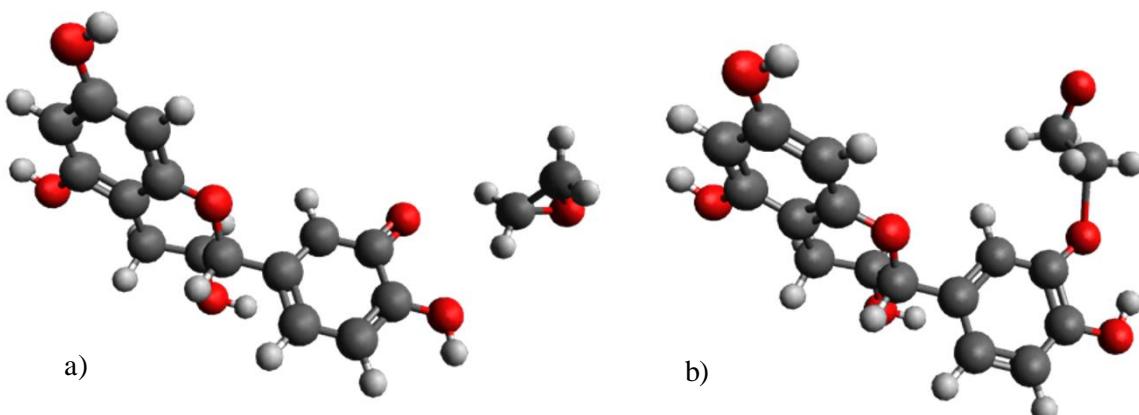
Na Sliki 10 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med β -propiolaktonom in (+)-catehinom.



Slika 10: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in β -propiolaktonom

S Slike 10, ki prikazuje prehodno stanje reakcije, lahko opazimo, da se β -propiolakton približa (+)-catehinu. Na β -propiolaktonu se ob vezavi s (+)-catehinom odpre laktonski obroč. Pri tem se hidroksilna skupina na (+)-catehinu obrne proti kisiku.

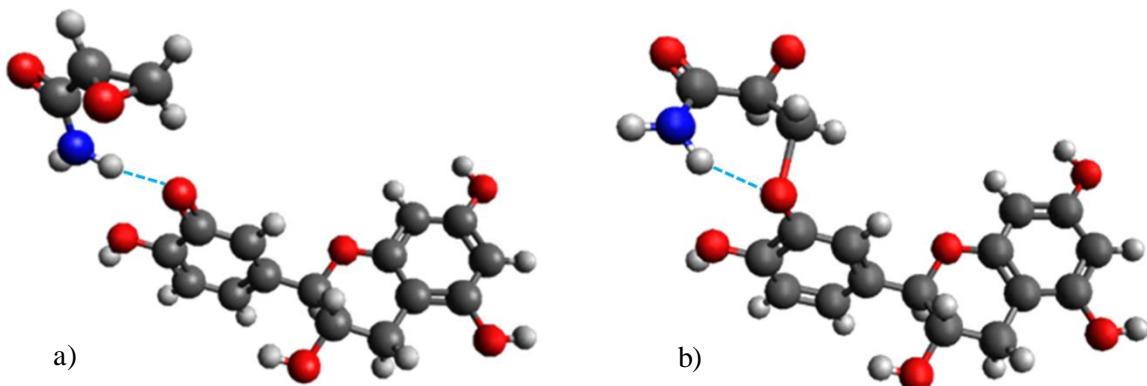
Na Sliki 11 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med etilen oksidom in (+)-catehinom.



Slika 11: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in etilen oksidom

Na Sliki 11 b) lahko vidimo, da se ob prekinitvi vezi v epoksidnem obroču na etilen oksidu in približanju struktur vzpostavi nova kovalentna vez med kisikom na (+)-catehinu in ogljikom na etilen oksidu. Pri tem se spremeni položaj hidroksilne skupine na (+)-catehinu.

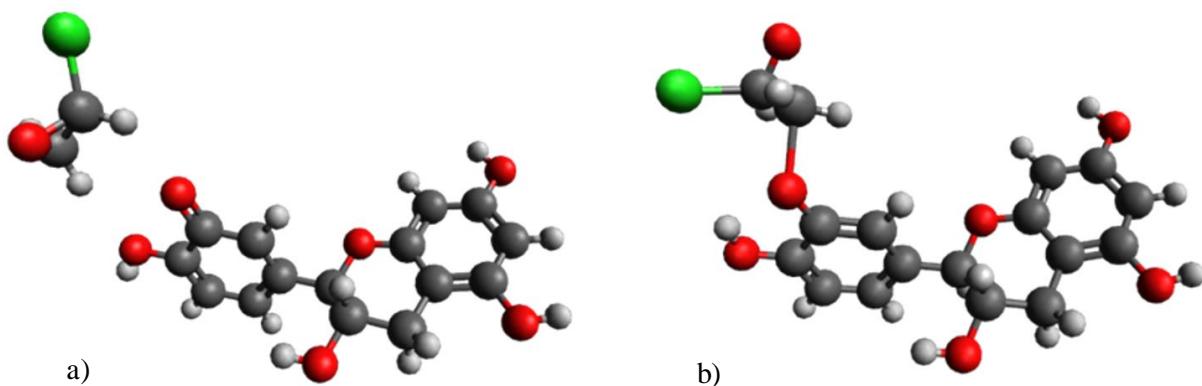
Na Sliki 12 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med glicidamidom in (+)-catehinom.



Slika 12: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in glicidamidom. Vodikova vez je prikazana z modro črtkano črto

Slike 12 b) za prehodno stanje je ponovno razviden nastanek nove kovalentne vezi med glicidamidom in (+)-catehinom in odprtje epoksidnega obroča na glicidamidu.

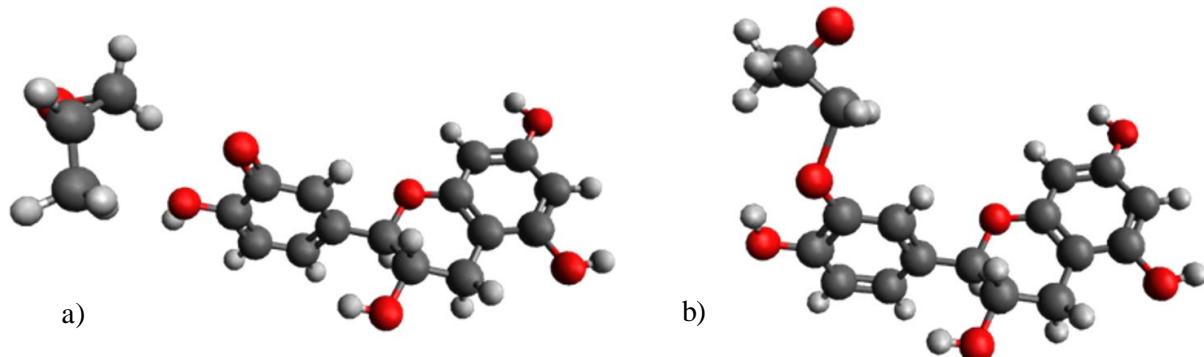
Na Sliki 13 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med kloroetilen oksidom in (+)-catehinom.



Slika 13: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in kloroetilen oksidom

Tudi na Sliki 13 lahko opazimo prekinitve vezi v epoksidnem obroču kloroetilen oksida. V tem primeru se elektrofilni ogljik na kloroetilen oksidu poveže z nukleofilnim kisikom na (+)-catehinu. Hidroksilna skupina na (+)-catehinu se obrne.

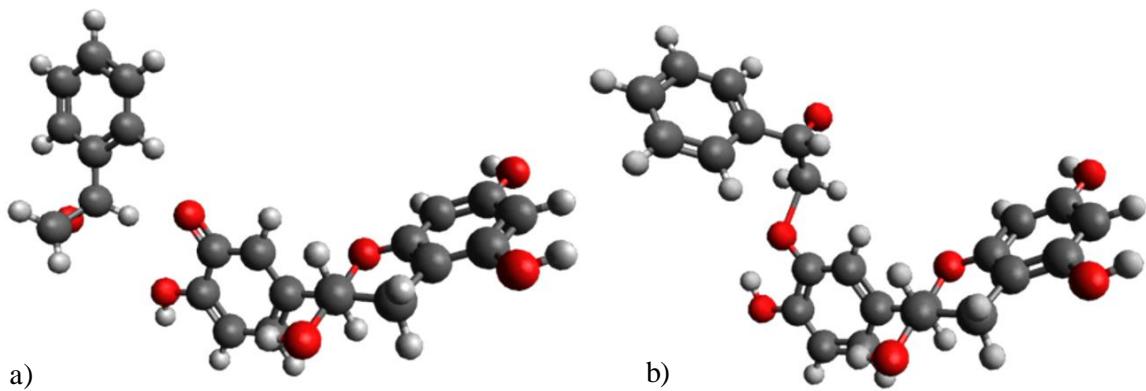
Na Sliki 14 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med propilen oksidom in (+)-catehinom.



Slika 14: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in propilen oksidom

Tudi s Slike 14 b) sta razvidna odprt epoksidni obroč in novonastala kovalentna vez med reaktantoma. Sprememba strukture (+)-catehina je opazna v drugačni orientaciji hidroksilne skupine.

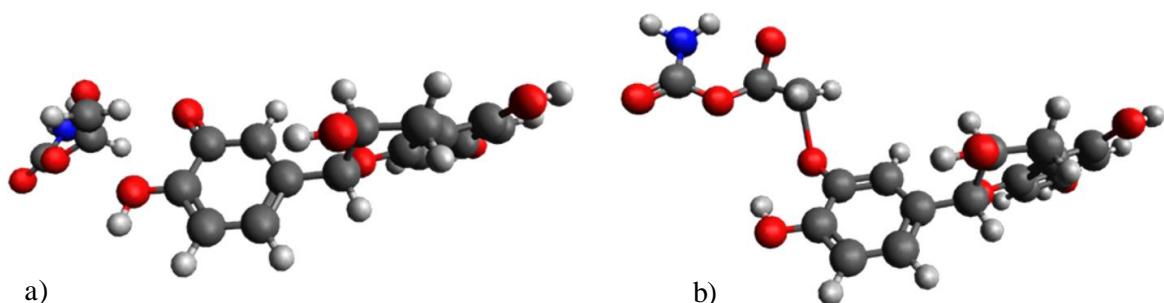
Na Sliki 15 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med stiren oksidom in (+)-catehinom.



Slika 15: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in stiren oksidom

Ko se reaktivni mesti dovolj približata, se epoksidni obroč stiren oksida odpre, med nukleofilnim kisikom na (+)-catehinu in elektrofilnim ogljikom na stiren oksidu pa se vzpostavi nova kovalentna vez. To kaže Slika 15 (oznaka b). Pri tem hidroksilna skupina na (+)-catehinu spremeni svoj položaj.

Na Sliki 16 sta predstavljeni strukturi reaktantov in prehodnega stanja za reakcijo alkilacije, ki poteče med vinil karbamat epoksidom in (+)-catehinom.



Slika 16: Struktura a) reaktantov in b) prehodnega stanja za reakcijo alkilacije med (+)-catehinom in vinil karbamat epoksidom

Vez, ki nastane med (+)-catehinom in vinil karbamat epoksidom je prikazana na Sliki 16 b). Epoksidni obroč se razpre ob nastanku nove kovalentne vezi s (+)-catehinom, hidroksilna skupina na (+)-catehinu pa spremeni svojo orientacijo.

S slikovnih prikazov lahko razberemo, da je razdalja med (+)-catehinom in posameznim karcinogenom v primeru reaktantov večja. V prehodnem stanju se reaktanta med seboj približata tako, da se nukleofilni kisik na (+)-catehinu približa elektrofilnemu ogljiku na karcinogenu z zadnje strani. Obravnavane reakcije alkilacije torej potečejo v skladu z mehanizmom nukleofilne substitucije tipa 2 (S_N2). Pri tem mehanizmu ob nastanku nove kovalentne vezi med reakcijskima mestoma razpade vez v epoksidnem obroču končnega kemijskega karcinogena. Struktura teži k zmanjšanju steričnih ovir, zato reaktanta med potekom reakcije spremeni svoja položaja.

4.2 Tabelarični prikaz rezultatov

V Tabeli 2 so prikazani številski rezultati za reakcije med (+)-catehinom in posameznim končnim kemijskim karcinogenom, dobljeni z metodo Hartree-Fock pri najvišjem baznem setu 6-311++G(d,p).

ΔE	aktivacijska energija v vakuumu (kcal/mol)
ΔG_{SCRF}	aktivacijska prosta energija, dobljena po SCRF metodi(kcal/mol)
ω^R	najnižja pozitivna frekvenco reaktantov (cm^{-1})
ω^{TS}	vrednost imaginarne frekvence, ki ustreza prehodnemu stanju ($i \text{ cm}^{-1}$)
d^R	oddaljenost med reakcijskima centroma na (+)-catehinu in karcinogenu pri reaktantih (\AA)
d^{TS}	oddaljenost med reakcijskima centroma na (+)-catehinu in karcinogenu v prehodnem stanju(\AA)

Tabela 2: Rezultati, dobljeni z metodo Hartree-Fock pri najvišjem baznem setu

HF/6-311++G(d,p)	ΔE (kcal/mol)	ΔG_{SCRF} (kcal/mol)	ω^R (cm^{-1})	ω^{TS} ($i \text{ cm}^{-1}$)	d^R (\AA)	d^{TS} (\AA)
2-cianoetilen oksid	16,16	18,87	8,81	674,34	3,07	1,97
AFB1 ekso-8,9-epoksid	25,37	17,58	9,59	232,61	3,02	2,11
β -propiolakton	11,66	11,68	9,45	642,17	2,84	2,02
etilen oksid	18,15	20,67	7,57	620,35	3,05	1,93
glicidamid	34,96	27,5	6,93	641,1	4,6	1,9
kloroetilen oksid	9,23	11,85	7,76	664,13	3,19	2,04
propilen oksid	18,24	19,94	8,83	626,21	3,26	1,93
stiren oksid	19,26	21,76	6,26	636,64	4,12	1,94
vinil karbamat epoksid	7,97	12,98	3,41	638,93	3,14	2,04

Iz Tabele 2 lahko razberemo, da so pri vseh karcinogenih z izjemo AFB1 ekso-8,9-epoksidom in glicidamida, aktivacijske energije v vakuumu nižje od aktivacijskih energij v prisotnosti topila. Posledično lahko sklepamo, da topilo upočasni kemijo reakcije alkilacije. ω^R ponazarja najnižjo frekvenco reaktantov in je pri vseh reakcijah pozitivno število, kar pomeni, da smo našli ustrezno strukturo reaktantov. Vrednost ω^{TS} pri vseh končnih kemijskih karcinogenih predstavlja natanko eno imaginarno frekvenco, ki sovpada z nastankom nove kovalentne vezi med (+)-catehinom in posameznim karcinogenom, pri čemer se vez znotraj epoksidnega obroča v karcinogenu prekine. To potrjuje, da smo našli pravilno strukturo prehodnega stanja.

Opazimo lahko tudi, da se vrednosti d^R in d^{TS} , ki predstavljata razdaljo med reaktivnima mestoma na (+)-catehinu in posameznem končnem kemijskem karcinogenu, razlikujeta. Vrednost razdalje je v prehodnem stanju manjša, saj se molekuli med seboj približata z namenom tvorbe nove kovalentne vezi.

4.3 Primerjava aktivacijskih prostih energij

Kemijske reakcije v bioloških sistemih potekajo v vodni raztopini. Zaradi tega rezultati, dobljeni za reakcije v vakuumu, niso tako natančni kot rezultati izračunov, ki upoštevajo vpliv topila. Ti se lahko primerjajo z eksperimentalno izmerjenimi vrednostmi. V Tabeli 3 so predstavljeni rezultati, dobljeni z dvema različnima solvatacijskima metodama SCRF in LD, ki upoštevata vpliv topila. Zajeta je primerjava aktivacijskih prostih energij za reakcije alkilacije med (+)-catehinom, glutationom oziroma gvaninom in posameznimi končnimi kemijskimi karcinogeni. V tabeli 3 so podane tudi eksperimentalne vrednosti za reakcije gvanina s preučevanimi končnimi kemijskimi karcinogeni.

ΔG_{SCRF}	aktivacijska prosta energija, dobljena s SCRF metodo (kcal/mol)
ΔG_{LD}	aktivacijska prosta energija, dobljena s LD metodo (kcal/mol)
ΔG_{exp}	eksperimentalno določena vrednost aktivacijske proste energije reakcije alkilacije med gvaninom in posameznimi končnimi kemijskimi karcinogeni (kcal/mol)

Tabela 3: Aktivacijske proste energije za reakcije alkilacije med (+)-catehinom, glutationom oziroma gvaninom [27] in posameznimi končnimi kemijskimi karcinogeni na nivoju teorije HF/6-311++G(d,p) v kombinaciji s solvatacijskima modeloma SCRF in LD

	(+)-catehin (kcal/mol)		glutation (kcal/mol)		gvanin (kcal/mol)		
	ΔG_{SCRF}	ΔG_{LD}	ΔG_{SCRF}	ΔG_{LD}	ΔG_{SCRF}	ΔG_{LD}	ΔG_{exp}
2-cianoetilen oksid	18,87	<u>21,93</u>	26,36	<u>26,78</u>	28,48	<u>19,02</u>	<u>19,2</u>
AFB1 ekso-8,9-epoksid	17,58	<u>9,82</u>	15,68	<u>5,21</u>	18,9	<u>14,25</u>	<u>15,1</u>
β -propiolakton	<u>11,68</u>	8,66	<u>22,51</u>	17,79	<u>22,45</u>	12,06	<u>20,8</u>
etilen oksid	20,67	<u>19,4</u>	30,02	<u>24,17</u>	21	<u>24,62</u>	<u>24,7</u>
glicidamid	27,5	<u>21,84</u>	32,22	<u>28,19</u>	25,78	<u>23,55</u>	<u>22,8</u>
kloroetilen oksid	<u>11,85</u>	14,44	<u>21,59</u>	18,78	<u>17,26</u>	22,87	<u>19,5</u>

propilen oksid	19,94	<u>18,61</u>	30,02	<u>26,06</u>	21,26	<u>25,15</u>	<u>25,4</u>
stiren oksid	21,76	<u>21,03</u>	31,56	<u>30,16</u>	/	<u>27,65</u>	<u>26,5</u>
vinil karbamat epoksid	<u>12,98</u>	14,96	<u>24,59</u>	22,09	<u>22,15</u>	19,13	<u>22,4</u>

Iz Tabele 3 je razvidno, da so vrednosti aktivacijskih prostih energij pridobljene po metodi SCRF višje od aktivacijskih prostih energij pridobljenih po metodi LD pri AFB1 ekso-8,9-epoksidu, β -propiolaktonu, etilen oksidu, glicidamidu, propilen oksidu in stiren oksidu. Vrednosti aktivacijskih prostih energij dobljenih z metodo LD pa so višje pri 2-cianoetilen oksidu, kloroetilen oksidu in vinil karbamat epoksidu.

Razvidno je tudi, da (+)-catehin v primerjavi z glutationom predstavlja boljši lovilec obravnavanih končnih kemijskih karcinogenov, saj so vse vrednosti aktivacijskih prostih energij za reakcije s (+)-catehinom (z izjemo AFB1 ekso-8,9-epoksida) nižje od vrednosti aktivacijskih prostih energij za reakcije z glutationom. Ta predstavlja boljšo blokirno spojino le v primeru AFB1 ekso-8,9-epoksida.

Iz primerjave eksperimentalno določenih vrednosti aktivacijskih prostih energij za reakcije gvanina s končnimi kemijskimi karcinogeni ter aktivacijskih prostih energij, izračunanih z metodama LD in SCRF, je razvidno, da je pri večini končnih kemijskih karcinogenov z eksperimentalnimi vrednostmi bolj primerljiva LD metoda (ujemanje je označeno z oranžno barvo). Izjemo predstavljajo β -propiolakton, kloroetilen oksid in vinil karbamat epoksid, kjer je ujemanje z eksperimentalnimi vrednostmi boljše v primeru metode SCRF (označeno z modro barvo).

S pomočjo primerjave izračunanih aktivacijskih prostih energij po obeh solvatacijskih metodah z eksperimentalno določenimi vrednostmi aktivacijskih prostih energij za reakcije alkilacije med gvaninom in istimi karcinogeni, je mogoče ugotoviti, ali (+)-catehin predstavlja učinkovit lovilec končnih kemijskih karcinogenov. Če je vrednost izračunane aktivacijske proste energije za reakcijo (+)-catehina s posameznim karcinogenom nižja od eksperimentalne vrednosti za reakcijo istega karcinogena z gvaninom, je (+)-catehin uspešen lovilec določenega karcinogena.

Iz tabele 3 je razvidno, da so vrednosti aktivacijskih prostih energij za reakcije skoraj vseh karcinogenov s (+)-catehinom nižje od pripadajočih eksperimentalnih vrednosti. Izjema je le

reakcija (+)-catehina z 2-cianoetilen oksidom, pri kateri je eksperimentalna vrednost nižja. To pomeni, da v primeru 2-cianoetilen oksida reakcija s (+)-catehinom poteče počasneje kot reakcija z gvaninom, zato nas (+)-catehin ne more zaščititi pred poškodbami dednega materiala, ki jih povzroča omenjeni karcinogen.

Razlika med vrednostjo aktivacijske proste energije, dobljene po metodi LD, in eksperimentalno določeno vrednostjo aktivacijske proste energije je v primeru glicidamida zelo majhna (0,96 kcal/mol). Za ta karcinogen (+)-catehin predstavlja podobno učinkovit lovilec kot gvanin.

V skladu z metodo SCRF, (+)-catehin najhitreje reagira z β -propiolaktonom, saj je vrednost aktivacijske proste energije najnižja, najpočasneje pa reagira z glicidamidom, ker je vrednost aktivacijske proste energije za reakcijo najvišja. Tudi v skladu z metodo LD reakcija alkilacije najhitreje poteče med (+)-catehinom in β -propiolaktonom, najpočasneje pa v primeru 2-cianoetilen oksida.

Zaključimo lahko, da (+)-catehin predstavlja učinkovit lovilec osmih od devetih preučevanih končnih kemijskih karcinogenov. Poškodb človeške DNK ne more preprečiti le v primeru 2-cianoetilen oksida.

5 ZAKLJUČEK

Glavni cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali je (+)-katehin iz kakava učinkovit lovilec devetih preučevanih končnih kemijskih karcinogenov. Prvo hipotezo, ki pravi, da reakcija karcinogenov s (+)-katehinom poteče hitreje od reakcije z gvaninom, lahko skoraj v celoti potrdimo. Za edino izjemo se je izkazal 2-cianoetilen oksid. Našega dednega materiala pred vplivi tega karcinogena (+)-katehin ne more zaščititi. Tudi druga hipoteza, ki pravi, da se karcinogeni hitreje vežejo s (+)-katehinom kot z glutationom, velja za skoraj vse karcinogene razen za AFB1 ekso-8,9-epoksid. Tega že pred (+)-katehinom ujame glutation in prepreči njegovo vezavo z DNK. Potrdili smo tudi, da vse obravnavane reakcije alkilacije potekajo po S_N2 mehanizmu.

Glutation našemu telesu ne zagotavlja zadostne zaščite pred končnimi kemijskimi karcinogeni, zato potrebujemo dodatne učinkovine, ki mu lahko pri tem pomagajo. (+)-Katehin se je izkazal kot zelo dober lovilec kemijskih karcinogenov. V skladu z dobljenimi rezultati lahko (+)-katehin ulovi osem od devetih končnih kemijskih karcinogenov preden le-ti reagirajo z gvaninom in tako poškodujejo človeško DNK.

Z nalogo smo postavili temelje za nadaljnje raziskave antikarcinogenih učinkov (+)-katehina in prispevali k boljšemu razumevanju mehanizmov njegovega antikarcinogenega delovanja. Naše rezultate, dobljene s kvantno-mehanskimi simulacijami, pa je v prihodnosti seveda potrebno potrditi tudi z eksperimentalnimi raziskavami. Z raziskovalno nalogo tako dolgoročno strememimo k temu, da bi lahko v prihodnosti s prehranskimi dopolnili, ki vsebujejo (+)-katehin, preprečili nastanek raka.

6 VIRI IN LITERATURA

1. Vtič, U. (2021). Pinocembrin iz medu kot potencialni lovilec kemijskih karcinogenov – računalniški pristop, diplomsko delo. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. <https://dk.um.si/Dokument.php?id=153508&lang=slv>
2. Borchers, T, A., Keen, L, C., Hannum, S., Gershwin, E. (2004). Cocoa and Chocolate: Composition, Bioavailability, and Health Implications. *Journal of Medicinal Food*, 3(2), 77-105. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/109662000416285>
3. Prehrana.si. Vse o kakavu in čokoladi. Dostopno na: <https://www.prehrana.si/clanek/244-vse-o-kakavu-in-cokoladi> (citirano 25.1.2023)
4. Cadoná, C, F., Ferreira, D, R., Haas de Mello, G., Paes, S, F. (2021). Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2021.1913091?journalCode=bfsn20>
5. Cook, L, R., Christy, M. (2022). Cocoa bean. Britannica. Dostopno na: <https://www.britannica.com/topic/cocoa-bean> (citirano 10.2.2023)
6. The American Journal of Clinical Nutrition. Polyphenols: food sources and bioavailability. Dostopno na: <https://academic.oup.com/ajcn/article/79/5/727/4690182> (citirano 25.1.2023)
7. Mayo Clinic. Nutrition and healthy eating: Is it possible to take too much vitamin C? Dostopno na: <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/expert-answers/vitamin-c/faq-20058030> (citirano 13.2.2023)
8. Furlan, V. (2017). [6]-gingerol kot naravni lovilec kemijskih karcinogenov, magistrsko delo. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. <https://dk.um.si/Dokument.php?id=117616&lang=slv>
9. Sorrenti, V., Ali, S., Mancin, L., Davinelli, S., Paoli, A., Scapagnini, G. (2020). Cocoa Polyphenols and Gut Microbiota Interplay: Bioavailability, Prebiotic Effect, and Impact on Human Health. *Nutrients*. <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/7/1908>
10. Moj prihranek. Najbolj zabavna dejstva o kakavu. Dostopno na: <https://www.mojprihranek.si/izpostavljen/zanimivosti/najbolj-zabavna-dejstva-o-kakavu/> (citirano 2.2.2023)

11. UGani. Kakav. <https://ugani.wordpress.com/2013/08/24/111/> (citirano 1.2.2023)
12. Angeles, M, M., Goya, L., Ramos, S. (2013). Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 336-351. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691513001294?via%3Dhub>
13. Wikipedia. Catechin. Zadnja sprememba 15.10.2022. Dostopno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Catechin> (citirano 20.1.2023)
14. Štuhec, A. (2016). Računalniške simulacije karcinogeneze β -propiolaktona, raziskovalna naloga. Dostopno na: https://zpm-mb.si/wp-content/uploads/2016/06/S%C5%A0_Kemija_Ra%C4%8Dunalni%C5%A1ke_simulacije_karcinogeneze_%CE%B2-propiolaktona.pdf
15. NIJZ. Rak. Dostopno na: <https://nijz.si/nenalezljive-bolezni/rak/> (citirano 27.1.2023)
16. National cancer institute. What is cancer? Dostopno na: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (citirano 29.1.2023)
17. Wikipedija, prosta enciklopedija. Karcinogen. Zadnja sprememba 21.8.2021. Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Karcinogen> (citirano 20.1.2023)
18. Hogy, L, L., Guengerich F, P. (1986). In vivo interaction of acrylonitrile and 2-cyanoethylene oxide with DNA in rats. *Cancer research*, 46(8), 3932-3938. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2425936/>
19. Bailey, E, A., et al. (1996). Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1535-1539. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC39975/pdf/pnas01508-0182.pdf>
20. Bonnafous, P., et al. (2014). Treatment of influenza virus with beta-propiolactone alters viral membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(1), 355-363. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0005273613003520>
21. Kranjc, A., Mavri, J. (2006). Guanine alkylation by ethylene oxide: calculation of chemical reactivity. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(17), 5740-5744. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp055092z>
22. Bren, U., et al. (2006). Chemical reactivity as a tool to study carcinogenicity: reaction between chloroethylene oxide and guanine. *The Journal of organic chemistry*, 71(11), 4078-

4084.

https://www.researchgate.net/publication/7072758_Chemical_Reactivity_as_a_Tool_to_Study_Carcinogenicity_Reaction_between_Chloroethylene_Oxide_and_Guanine

23. Mavri, J. (2013). Can the chemical reactivity of an ultimate carcinogen be related to its carcinogenicity? An application to propylene oxide. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 479-485. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233312002019?via%3Dihub>

24. Kržan, M., Mavri, J. (2009). Carcinogenicity of styrene oxide: Calculation of chemical reactivity. *Croatica Chemica Acta*, 82(1), 317-322. <https://hrcak.srce.hr/file/60679>

25. Guengerich, F, P., Kim, D, H. (1991). Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1, N6-ethenoadenosine. *Chemical research in toxicology*, 4(4), 413-421. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1912327/>

26. Malić, M. (2018). Antikarcinogeni potenciali polifenolnih spojin iz smilja – računalniški pristop, diplomska delo. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. <https://dk.um.si/Dokument.php?id=129510&lang=slv>

27. Furlan, V., Bren, U. (2020). Protective Effects of [6]-Gingerol Against Chemical Carcinogens: Mechanistic Insights. *International journal of Molecular sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21030695>

7 PRILOGE

V Tabeli 4 so prikazani številski rezultati za reakcije med (+)-catehinom in posameznim končnim kemijskim karcinogenom, dobljeni z metodo Hartree-Fock pri baznem setu 6-31G(d,p).

ΔE	aktivacijska energija v vakuumu (kcal/mol)
ΔG_{SCRF}	aktivacijska prosta energija, dobljena po SCRF metodi(kcal/mol)
ω^R	najnižja pozitivna frekvenca reaktantov (cm^{-1})
ω^{TS}	vrednost imaginarne frekvence, ki ustreza prehodnemu stanju (i cm^{-1})
d^R	oddaljenost med reakcijskima centroma na (+)-catehinu in karcinogenu pri reaktantih (\AA)
d^{TS}	oddaljenost med reakcijskima centroma na (+)-catehinu in karcinogenu v prehodnem stanju (\AA)

Tabela 4: Rezultati, dobljeni z metodo Hartree-Fock pri baznem setu 6-31G(d,p)

HF/6-31G(d,p)	ΔE (kcal/mol)	ΔG_{SCRF} (kcal/mol)	ω^R (cm^{-1})	ω^{TS} (i cm^{-1})	d^R (\AA)	d^{TS} (\AA)
2-cianoetilen oksid	14,11	18	7,83	681,74	3,1	1,94
AFB1 ekso-8,9- epoksid	27,43	20,31	11,18	438,86	2,36	2,07
β -propiolakton	14,26	11,48	9,1	663,79	2,48	2
etilen oksid	18,57	22,05	2,69	641,93	2,13	1,89
glicidamid	35,92	29,48	4,46	656,68	4,5	1,87
kloroetilen oksid	7,65	11,18	6,73	687,99	2,32	2,02
propilen oksid	18,48	21,34	8,55	647,43	2,29	1,89
stiren oksid	18,72	22,16	6,56	659,39	2,12	1,9
vinil karbamat epoksid	6,34	11,74	4,73	654,41	2,66	2,03