

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**  
**UNIVERZITETA U BEOGRADU - FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 04.03.2021. godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije (Odluka No 373/2) kandidata magistra farmacije Darije Obradović, pod naslovom:

**„Modelovanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora  
i srodnih jedinjenja u različitim hromatografskim uslovima“**

Komisija u sastavu:

1. Dr Danica Agbaba – mentor rada (predsednik komisije), profesor emeritus, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
2. Dr Katarina Nikolić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. Dr Oleg Alekseevič Špigun, profesor dopisni član Ruske Akademije Nauka, Hemijski fakultet Moskovskog državnog univerziteta naziva M.V. Lomonosov
4. Dr Filip Andrić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

je pregledala priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

## **IZVEŠTAJ**

### **1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija magistra farmacije Darije Obradović, pod naslovom: „**Modelovanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u različitim hromatografskim uslovima**“, napisana je na 170 strana kucanog teksta formata A4, fontom *Times New Roman*, veličine 12 i proredom 1. Tekst je

podeljen u 8 celina koje obuhvataju: *Uvod, Ciljeve, Eksperimentalni deo, Rezultate i diskusiju, Zaključke, Literaturu, Priloge, Biografiju autora.*

Na početku doktorske disertacije prikazan je sažetak na srpskom, engleskom i ruskom jeziku, kao i spisak korišćenih skraćenica u doktorskoj disertaciji. Tekst disertacije je dokumentovan sa 22 tabele, 57 grafičkih prikaza, 10 tabela u Prilogu A, 1 grafičkim prikazom takođe u Prilogu A, kao i sa 234 citirana literaturna navoda.

Poglavlje **Uvod** se sastoji od četiri podpoglavlja, koja se mogu podeliti na dve tematske celine. Prva celina obuhvata definisanje strukturnih i fizičko-hemijskih karakteristika 45 odabranih liganada imidazolinskih (amilorid, antazolin, benazolin, brimonidin, cirazolin, klonidin, detomidin, efaroksan, gvanabenz, gvanfacin, harman, harmin, idazoksan, metformin, nafazolin, oksimetazolin, fentolamin, RX 821002, tetrahidrozolin, tizanidin, ksilometazolin, moksonidin, trimazolin, sitagliptin) i serotoninskih receptora (aripiprazol, ziprazidon, olanzapin) i srodnih jedinjenja (Imp A1, Imp A2, Imp A3, Imp A4, Imp A5, Imp A6, Imp A7, Imp A8, Imp A9, Imp A10, Imp A11, Imp Z1, Imp Z2, Imp Z3, Imp M1, Imp M2, Imp M3, Imp M4). Takođe su opisane strukturne karakteristike liganada, koje utiču na vezivanje za imidazolinske ili serotoninske receptore. Objasnjen je receptorski profil i istaknut terapijski značaj testiranih jedinjenja. U drugoj tematskoj celini, opisane su hromatografske i statističke metode, koje se mogu koristiti u ispitivanjima i modelovanjima retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja. Detaljno su opisani različiti hromatografski sistemi uključujući reverzno-fazni (*Reversed-Phase*, RP) i normalno-fazi (*Normal-Phase*, NP) sistem, hromatografiju hidrofilnih interakcija (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC), superkritičnu fluidnu (*Supercritical Fluid Chromatography*, SFC) i *mixed-mode* hromatografiju. U sistemima tečne i superkritične fluidne hromatografije prikazane su fizičko-hemijske karakteristike mobilne i stacionarne faze i objašnjeni parametri za definisanje dominantnih mehanizama retencije. Detaljno su opisane različite metode retencionog modelovanja, koje se koriste u optimizaciji hromatografskih uslova razdvajanja, predviđanjima biofarmaceutskih karakteristika lekovite supstance ili definisanju kvantitativne veze između strukture i parametara retencije.

Ciljevi ove doktorske disertacije su navedeni u poglavlju **Cilj rada** i obuhvataju ispitivanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih/ $\alpha$ -adrenergičkih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u HPLC (*mixed-mode* HILIC/RP, RP, NA-HILIC) i SFC

sistemima na diol i *mixed-mode diol* stacionarnim fazama. Cilj rada je i definisanje hromatografskih uslova i matematičkih modela, koji bi se mogli uspešno primeniti kod ispitivanja novosintetisanih liganda imidazolinskih i serotoninskih receptora i strukturno srodnih jedinjenja. Jedan deo ciljeva zahteva primenu postojećih modela i standardnih metodologija kao npr.: *i*) definisanje uticaja karakteristika mobilne faze (polarnost, zapreminski udeo modifikatora mobilne faze) primenom *multi-modal* jednačine *ii*) definisanje uticaja parametara hromatografskog sistema (temperatura, koncentracija pufera, udeo modifikatora mobilne faze) na retenciono ponašanje primenom metodologije eksperimentalnog dizajna *iii*) definisanje kvantitativne veze između strukture i parametara retencije. Druga grupa ciljeva se zasniva na primeni nestandardnih statističkih tehnika radi: *i*) pronalazjenja novih retencionih modela koji uspešnije opisuju retenciono ponašanje u testiranim hromatografskim sistemima u odnosu na standardne modele *ii*) definisanja novih retencionih parametara koji se mogu primeniti u svojstvu retencionih deskriptora za precizniju kvantifikaciju retencionog ponašanja i definisanje retencionih mehanizama.

U poglavlju **Eksperimentalni deo** navedena je korišćena oprema, hemikalije i kompjuterski programi. Opisani su primenjeni hromatografski uslovi (RP, HILIC, SFC). Takođe su navedene metode za analizu retencionih podataka, kao i metode za definisanje kvantitativne veze između strukture i parametara retencije.

U poglavlju **Rezultati i diskusija** predstavljeni su rezultati ispitivanja retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u različitim hromatografskim uslovima (RP, HILIC, SFC). Prvi deo rezultata obuhvata modelovanje retencionog ponašanja na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi, definisanje retencionih mehanizama u vodenim (acetonitril/voda) HILIC (*Aqueous Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, AQ-HILIC) i RP sistemima, kao i definisanje hromatografskih uslova u kojima se očekuje smena između HILIC i RP interakcija (*prevojna tačka*). U drugom delu su predstavljeni rezultati ispitivanja retencionog ponašanja u nevodenom (acetonitril/metanol) HILIC (*Non-Aqueous Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, NA-HILIC) i SFC (CO<sub>2</sub>/metanol) sistemu na diol i modifikovanoj *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi.

Retenciono ponašanje je uspešno definisano u odnosu na fizičko-hemijske karakteristike mobilne faze. U *mixed-mode* HILIC/RP sistemima, definisan je uticaj zapreminskog udela modifikatora ( $\phi$ ) i uticaj ukupne polarnosti ( $P_{\text{tot}}$ ) mobilne faze na retenciono ponašanje, kao i primenljivost  $P_{\text{tot}}$  za određivanje vrednosti *prevojne tačke*. Pored uticaja promene  $\phi$  vrednosti

na retenciju u SFC i NA-HILIC sistemima, ispitana je i promena retencionih karakteristika, koja nastaje nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi. Linearni (particioni, adsorpcioni model) i nelinearni (*multi-modal*, kvadratni model) retencioni modeli su uspešno primenjeni za opisivanje retencionog ponašanja.

Novi retencioni deskriptori su izvedeni primenom metode integracije površine, za kvantifikaciju retencije u HILIC, RP i duž celog HILIC/RP regiona. Na osnovu *Box-Cox* transformacije su definisane troparametarske jednačine za opisivanje retencionog ponašanja, a njihovi minimumi su ispitani u svojstvu *prevojne tačke*. Različite statističke metode poput višestruke linearne regresione analize, metode vektora podrške (*Support Vector Machine*, SVM), LSER jednačine (linearna korelacija solvacionih energija, *Linear Solvation Energy Relationship*), analize glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA) i metode hijerarhijskog klasterovanja (*Hierarchical Cluster Analysis*, HCA) su primenjene za definisanje veze između strukture i parametara retencije. U SFC i NA-HILIC sistemu, primenjena je i metodologija eksperimentalnog dizajna za definisanje uticaja parametara hromatografskog sistema (temperatura, koncentracija pufera, udeo modifikatora mobilne faze) na retenciono ponašanje. Dodatno, ispitane su mogućnosti testiranih hromatografskih uslova u NA-HILIC i SFC sistemima za razdvajanje strukturno srodnih jedinjenja.

U poglavlju **Zaključak** navedeni su zaključci, izvedeni na osnovu dobijenih rezultata i njihove interpretacije.

Poglavljje **Literatura** sadrži 234 bibliografska navoda.

U poglavlju **Prilog** prikazane su tabele sa eksperimentalnim podacima, kao i slika dobijena u programu RStudio.

## 2. Opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji, retenciono ponašanje liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja je ispitano u različitim hromatografskim uslovima. U okviru iste farmakološke grupe testiranih jedinjenja, prisutna je strukturna raznolikost koja utiče na pojavu razlika u hromatografskom ponašanju. Zbog toga je složeno definisati odgovarajuće hromatografske uslove i opisati retenciono ponašanje *i*) primenom zajedničkog retencionog modela *ii*) analizom kvantitativne veze strukture i retencije (*Quantitative Structure Retention Relationship*, QSRR) *iii*) definisanjem novih parametara retencije.

U prvom delu doktorske disertacije, retenciono ponašanje liganada imidazolinskih i serotoninских receptora i srodnih jedinjenja je ispitano na *mixed-mode* HILIC/RP stacionarnoj fazi.

U širokom opsegu promene zapreminskog udela modifikatora mobilne faze ( $\varphi$  0,05-0,90) opisana je promena logaritma retencionog faktora ( $\log k$ ) u funkciji  $\varphi$ . Promena  $\log k = f(\varphi)$  je definisana nelinearnom *multi-modal* funkcijom, koja je konveksnog U-oblika. Retencioni model koji odgovara konveksnoj *multi-modal* funkciji ukazuje na istovremeno prisustvo HILIC i RP interakcija u ukupnom mehanizmu zadržavanja. Na suprotnim krajevima  $\log k = f(\varphi)$ , jedan retencioni mehanizam dominira naspram drugog, odnosno HILIC interakcije u poređenju sa RP predvode retenciono ponašanje i obrnuto. U dualnom HILIC/RP retencionom mehanizmu, HILIC regioni su od RP regiona odvojeni *prevojnou tačkom* ( $\varphi_{\min}$ ). *Prevojnou tačka* je značajan deskriptor dualne HILIC/RP retencije i predstavlja minimalnu vrednost  $\log k = f(\varphi)$  funkcije. Za sva testirana jedinjenja, vrednosti *prevojne tačke* su uspešno određene, pri čemu u zavisnosti od njihovih strukturnih karakteristika varira i širina dobijenih HILIC i RP regiona. Uočeno je da kod jedinjenja sa izraženijim lipofilnim karakteristikama RP interakcije dominiraju u ukupnom procesu retencije ( $\varphi_{\min} < 0,50$ ), dok je hidrofilni retencioni mehanizam izraženiji kod jedinjenja sa istaknutim polarnim osobinama ( $\varphi_{\min} > 0,50$ ). Takođe, detaljna analiza retencionog ponašanja strukturno srodnih jedinjenja je izvršena poređenjem oblika  $\log k = f(\varphi)$  funkcije i širine dobijenih RP i HILIC regiona.

U HILIC i RP regionima, testirana je primenljivost particionog i adsorpcionog modela u opisivanju retencionog ponašanja. U odnosu na adsorpcioni model, particioni model je pokazao nešto bolju primenljivost u opisivanju HILIC retencije, posebno za derivate piperazina i njihova strukturno srodna jedinjenja. Primenom metode vektora podrške (*Support Vector Machine*, SVM) i višestruke linearne regresione analize (*Multiple Linear Regression Analysis*, MLR) izdvojene su molekulske osobine sa najvećim uticajem na adsorpcioni i particioni mehanizam, kao i na vrednosti *prevojne tačke* ( $\varphi_{\min}$ ). Uočeno je da na particioni mehanizam značajan efekat imaju lipofilne karakteristike, dok je na adsorpcioni mehanizam u HILIC regionu izraženiji uticaj geometrijskih karakteristika ispitivanih jedinjenja. Na uslove prelaska iz HILIC-a u RP ( $\varphi_{\min}$ ) uticale su vrednosti koeficijenta distribucije ( $\log D$ ), molekulska masa i elektronske osobine liganada imidazolinskih i serotoninских receptora. Vrednosti koeficijenata eksterne validacije (visoke  $Q^2_{\text{LOO}}$  i  $Q^2_{\text{ext}}$ , niske *RMSEP*) pokazale su da se napravljeni QSRR modeli mogu primeniti u predviđanju retencionih karakteristika i kod novosintetisanih liganada na imidazolinskim i serotoninским receptorima.

Pored uticaja zapreminskog udela modifikatora, matematički je definisan uticaj ukupne polarnosti mobilne faze na retenciono ponašanje. Ustanovljeno je da se ukupna polarnost mobilne faze može iskoristi za pouzdano predviđanje retencionog ponašanja testiranih jedinjenja, ali i za definisanje vrednosti *prevojne tačke*. Kod više od 50% testiranih jedinjenja, primena ukupne polarnosti je pokazala bolje statističke rezultate u odnosu na primenu zapreminskog udela modifikatora mobilne faze kao zavisno promenljive.

Pored toga, primenom *Box-Cox* transformacije u programu RStudio, definisane su nove zavisnosti između retencionog faktora i zapreminskog udela modifikatora mobilne faze. Izdvojeno je pet novih zavisnosti sa boljim statističkim karakteristikama (XR, IQ, LQ, II, IR) u odnosu na standardno korišćenu *multi-modal* i kvadratnu funkciju. Uočeno je da trend promene retencionog ponašanja, odnosno oblik  $\log k = f(\varphi)$  funkcije, je primarno određen lipofilnim i geometrijskim osobinama (aromatičnost, sferičnost) testiranih jedinjenja, koje posledično utiču i na primenljivost XR, IQ, LQ, II, ili IR jednačina u opisivanju retencionog ponašanja.

Minimumi novopredloženih jednačina su testirani u svojstvu *prevojne tačke*, poređenjem sa referentnim vrednostima koje su dobijene kubnom *spline* interpolacijom. Najpouzdaniju primenu u određivanju vrednosti *prevojne tačke* u odnosu na referentnu  $\varphi_{\min}$ , pokazale su novopredložene II, IR, XR i LQ funkcije.

Za regione u kojima dominiraju HILIC ( $\log k_H$ ) ili RP ( $\log k_R$ ) interakcije, ali i duž celog HILIC/RP ( $\log k_A$ ) regiona, metodom integracije su dobijeni novi parametri retencije, pri čemu je između parametara dobijenih integracijom XQ i IR funkcije uočeno najveće slaganje. Takođe, vrednosti retencionih parametara  $\log k_H > \log k_R$  za ligande imidazolinskih receptora i  $\log k_H < \log k_R$  za ligande serotonininskih receptora.

Metoda glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA), hijerarhijskog klasterovanja (*Hierarchical Cluster Analysis*, HCA) i *Box-Cox* grafici, iskorišćeni su za vizuelno poređenje i klasifikaciju dobijenih vrednosti *prevojne tačke*, regresionih koeficijenata novopredloženih retencionih modela i parametara retencije. Na osnovu korelacije između parametara retencije i molekulskih osobina testiranih jedinjenja, definisana je fizičko-hemijska priroda testiranih hromatografskih sistema. Analizom strukturnih karakteristika ispitivanih jedinjenja, ustanovljeno je da parametri lipofilnosti i jonizacione karakteristike primarno određuju retenciono ponašanje u RP regionu, dok je veća složenost HILIC sistema zabeležena na osnovu velikog broja interakcija koje utiču na retenciono ponašanje npr. vodonične veze, dipolne interakcije, jonizacione karakteristike, aromatičnost i strukturne osobine molekula (molekulska masa, *van der Waals*-ov radijus, dijametar).

U drugom delu rada, retenciono ponašanje liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja je ispitano u NA-HILIC i SFC sistemima. Kako se potencijalna ograničenja HILIC-e u ispitivanjima lipofilnijih, a SFC tehnike u ispitivanjima polarnijih jedinjenja prevazilaze modifikacijama mobilne i odabirom odgovarajuće stacionarne faze, ispitan je: *i*) uticaj zapreminskog udela modifikatora mobilne faze *ii*) uticaj dodatka kiseline mobilnoj fazi, na retenciju ispitivanih jedinjenja na *diol* i modifikovanoj *mixed-mode diol* koloni.

Dobijene  $\log k$  vrednosti na *mixed-mode diol* su veće u poređenju sa  $\log k$  vrednostima na *diol* stacionarnoj fazi, zbog čega je uočeno da nepolarne alifatične grupe na površini *mixed-mode* stacionarne faze značajno utiču na retenciono ponašanje. Pored toga, na *mixed-mode diol* stacionarnoj fazi, vrednosti  $\log k$  parametra u SFC-u su generalno više u odnosu na NA-HILIC, jer je CO<sub>2</sub> mnogo slabiji eluent u odnosu na acetonitril.

Razlike između retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u SFC i NA-HILIC sistemima kvantifikovane su na osnovu: *i*) vrednosti parametara *S* *ii*) definisanja retencionih mehanizama *iii*) primene LSER jednačine i *iv*) razdvajanja strukturno srodnih jedinjenja.

U *mixed-mode* sistemima nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi, dobijene su visoke vrednosti parametara *S* koje ukazuju na značajne razlike između NA-HILIC i SFC retencije. Promena retencionih mehanizama u NA-HILIC sistemu je posledica protonovanja dostupnih funkcionalnih grupa na površini *mixed-mode* kolone, što posledično dovodi do promena u redosledu eluiranja i retenciji ispitivanih jedinjenja.

Efekat dodatka kiseline mobilnoj fazi u SFC sistemu, suprotan je u odnosu na NA-HILIC. Male razlike u dobijenim  $\log k$  vrednostima su pokazale, da dodatak kiseline mobilnoj fazi slabije utiče na promenu retencionog ponašanja u SFC-u, u odnosu na NA-HILIC sistem. S tim u vezi, uočava se da kiselost CO<sub>2</sub> mobilne faze ima značajan efekat na reticioni proces, jer u kiselim uslovima dolazi do protonovanja baznih jedinjenja i građenja jonskih parova. Zbog toga, dolazi do porasta molekulske mase i dipolnog momenta, ali i povećanog zadržavanja ispitivanih jedinjenja u SFC uslovima. Kod jedinjenja sa izraženijim baznim karakteristikama kao npr. liganada serotoninskih receptora,  $\log k$  vrednosti u SFC-u su više u odnosu na NA-HILIC sistem.

Linearni reticioni modeli su uspešno primenjeni za opisivanje retencionog ponašanja, s tim da je u SFC sistemu, adsorpcioni pokazao nešto bolju primenljivost u odnosu na particioni model.

Na osnovu linearne korelacije solvatacionih energija (LSER), ustanovljeno je da polarne interakcije između ispitivanih jedinjenja i funkcionalnih grupa na stacionarnoj fazi, kao i vodonične veze imaju dominantan efekat na NA-HILIC i SFC retencioni proces. Poređenje LSER/SFC i LSER/NA-HILIC modela je potvrdilo da nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi, dolazi do značajnih promena u mehanizmima retencije, posebno na modifikovanoj *mixed-mode diol* koloni.

Visoke vrednosti faktora selektivnosti ( $\alpha$ ) su pokazale, da se testirani NA-HILIC i SFC sistemi mogu uspešno primeniti u razdvajanju strukturno srodnih hemijskih parova. Na osnovu proton/donorskih i proton/akceptorskih karakteristika, kao i polarnosti testiranih jedinjenja objašnjena je i molekulska osnova uspešnog razdvajanja.

Metodologija eksperimentalnog dizajna je primenjena za definisanje razdvajanja strukturno srodnih jedinjenja i uticaja parametara hromatografskog sistema (temperatura, zapreminski udeo metanola, koncentracija pufera) na retenciono ponašanje u NA-HILIC i SFC sistemima. Vrednosti faktora selektivnosti ( $\alpha$ ) su pokazale da se testirani NA-HILIC i SFC sistemi, mogu iskoristiti za istovremeno hromatografsko ispitivanje liganada serotoninskih receptora (ziprazidon, aripiprazol) i strukturno srodnih jedinjenja. S tim u vezi, veće  $\alpha$  vrednosti između ziprazidona i srodnih jedinjenja su dobijene u SFC sistemu u odnosu na NA-HILIC, na klasičnoj diol stacionarnoj fazi. U *mixed-mode* SFC sistemu, zapreminski udeo metanola i kvadratna vrednost koncentracije pufera su pokazali negativan efekat na retenciju odabranih liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora, dok je pozitivan efekat pokazala promena koncentracije pufera i promena kvadratne vrednosti zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi. Takođe je uočeno, da pri nižim vrednostima zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi (<20%), dolazi do promene retencionog mehanizma.

### **3. Uporedna analiza doktorske disertacije sa podacima iz literature**

Ligandi  $\alpha$ -adrenergičkih/imidazolinskih i serotoninskih receptora osnovnim ili sporednim mehanizmima postižu odgovarajući farmakološki efekat na centralni nervni sistem (CNS). Ligandi  $\alpha$ -adrenergičkih/imidazolinskih receptora su derivati parcijalno hidriranog imidazolovog heterociklusa koji se koriste u: terapiji hipertenzije, alergijskog konjuktivitisa, nazalne kongestije, glaukoma, poremećaja pažnje kod dece, multiple skleroze, kao i terapiji srčane insuficijencije [1-2]. Ligandi serotoninskih receptora su derivati piperazina i najčešće se koriste u terapiji šizofrenije, depresije, manije i drugih udruženih stanja [3-4]. Kako bi se



postigao optimalni terapijski efekat neophodan je razvoj selektivnih liganada [5-6], ali i istovremeni napredak odgovarajućih hromatografskih metoda, koje se mogu primeniti u svim fazama optimizacije i ispitivanja novih lekova.

Najjednostavniji opis hromatografskog ponašanja postiže se na stacionarnim fazama čiji aktivni centri omogućuju jasno izdvajanje dominantnog retencionog mehanizma, kao što je silika gel stacionarna faza. Tom prilikom, retencioni proces je opisan jednostavnom linearnom jednačinom  $\log k = f(\varphi)$  [7] ili njenim logaritmom  $\log k = f(\log \varphi)$  [8]. Kada particioni ili adsorpcioni mehanizmi utiču na retenciju, osnovna veza između retencionog ponašanja i elucione snage rastvarača definiše se na osnovu teorije linearnog retencionog modelovanja (*Linear Solvent Strength*, LSS) ili primenom jednačine *Snyder-Soczewinski*. LSS model definiše osnovni particioni model kao glavni mehanizam razdvajanja u RP sistemima, na osnovu raspodele analita između polarne stacionarne i nepolarne mobilne faze [7]. Pored LSS modela, primenjena je i kvadratna jednačina *Schoenmakers*-a i saradnika [8] za opisivanje particionog procesa u RP uslovima. Adsorpcioni model je definisan na osnovu jednačine *Snyder-Soczewinski* kao linearna  $\log k = f(\log \varphi)$  zavisnost, koja je primenjena za opisivanje retencije u NP i HILIC sistemima [9]. Važan nedostatak upotrebe linearnih modela je njihova primenljivost, koja je ograničena samo na uske intervale promene  $\varphi$  vrednosti.

Kada je reč o sistemima hidrofilnih interakcija, posebno se ističe uloga adsorbovane vode u cilju razumevanja HILIC retencije. Zbog toga, svaka polarna stacionarna faza koja zadržava molekule vodene faze, može se primeniti u HILIC sistemima. HILIC stacionarne faze najčešće sadrže polarne (amino, cijano, ili diol) i hidrofobne funkcionalne grupe (aril, alkil) [10]. Pored toga, i čista silika [10], kao i stacionarne faze modifikovane cviterjonskim [11] ili katjonskim funkcionalnim grupama se takođe koriste u HILIC sistemima [12]. Česla i saradnici su istakli značaj nelinearnih funkcija u opisivanju izokratskog HILIC ponašanja (kvadratna funkcija, *multi-modal* funkcija, empirijska *Neue-Kuss* funkcija) [13], dok je u uslovima HILIC gradijenta, zabeležena uspešnija primenljivost LSS i *multi-modal* funkcije u odnosu na primenu kompleksnije *Neue-Kuss* ili primenu kvadratne funkcije [14]. U ovoj doktorskoj disertaciji linearni retencioni modeli su uspešno primenjeni za opisivanje retencije u sistemima HILIC i RP interakcija, pri čemu je particioni model pokazao uspešniju primenljivost u odnosu na adsorpcioni za definisanje HILIC retencije.

U slučajevima kada je proširen interval  $\varphi$  vrednosti, nelinearna retencija se definiše korišćenjem višeparametarskih funkcija, koje su zasnovane na kombinaciji linearnih aproksimacija [15]. U ovoj doktorskoj disertaciji, primenom nelinearne *multi-modal*  $\log k =$

$f(\varphi)$  funkcije je pouzdano opisano retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u proširenom intervalu  $\varphi$  vrednosti na *mixed-mode* stacionarnoj fazi. Pojava nelinearnosti se često vezuje za sisteme dualnih HILIC/RP interakcija, u kojima je neophodna primena višeparametarskih funkcija za definisanje retencionog ponašanja. Sa pojavom nelinearnosti i konveksne  $\log k = f(\varphi)$  raspodele retencionih podataka, uveden je i pojam *prevojne tačke* ili uslova u kojima dolazi do promene vodećeg mehanizma retencije [12]. Iako se može uočiti da u zavisnosti od lipofilnih karakteristika ispitivanih jedinjenja variraju i vrednosti  $\varphi_{\min}$ , ali i zastupljenost hidrofilnih i reverzno-faznih interakcija u ukupnom mehanizmu zadržavanja, u literaturi nema dostupnih rezultata predikcionog QSRR( $\varphi_{\min}$ ) modelovanja. Prema tome, u ovoj doktorskoj disertaciji su napravljani modeli kvantitativne veze strukture ispitivanih jedinjenja i vrednosti *prevojne tačke*, primenom MLR/QSRR i SVM/QSRR analize. Na osnovu koeficijenta distribucije, jonizacionih karakteristika i molekulske mase jedinjenja, omogućeno je predviđanje vrednosti  $\varphi_{\min}$  i kod novosintetisanih liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i strukturno srodnih jedinjenja.

Pored strukturnih osobina ispitivanih jedinjenja na prevlast RP ili HILIC mehanizma, utiču i fizičko-hemijske karakteristike mobilne i stacionarne faze. Primena polarne mobilne sa polarnom stacionarnom fazom omogućava prisustvo HILIC interakcija, dok nepolarna mobilna faza u kombinaciji sa polarnom stacionarnom fazom utiče na pojavu reverzno-faznog mehanizma zadržavanja. Iako za tumačenje dualne HILIC/RP retencije do sada nije primenjena, može se smatrati da ukupna polarlost mobilne faze utiče na osnovnu podelu hromatografskih uslova, kao i vrstu retencionog ponašanja u dualnim HILIC/RP sistemima. U ovoj doktorskoj disertaciji, ukupna polarlost mobilne faze je uspešno primenjena kao zavisno promenljiva za modelovanje retencionog ponašanja i definisanje uslova smene između hidrofilnih i reverzno-faznih interakcija. Ukupna polarlost je određena dipolnim momentom i vodoničnim interakcijama sistema, zbog čega u odnosu na zapreminski udeo modifikatora mobilne faze, ima direktno fizičko-hemijsko značenje [16].

Kako retencioni mehanizmi zavise od karakteristika stacionarne i mobilne faze, kao i molekulskih osobina ispitivanih jedinjenja, opšti matematički oblik promene retencije u zavisnosti od zapreminskog udela modifikatora mobilne faze ( $\log k = f(\varphi)$ ) nije utvrđen. Zbog toga je potrebno testirati različite oblike  $\log k = f(\varphi)$  zavisnosti, kako bi se pronašao najprecizniji opis retencionog ponašanja u testiranim hromatografskim uslovima. Sa ciljem pronalazjenja najpreciznije  $\log k = f(\varphi)$  zavisnosti za ligande imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja, na dobijene retencione podatke u *mixed-mode* sistemu je

primenjena *Box-Cox* transformacija ( $B(\varphi)$ ) [17]. Dobijeni nelinearni  $\log k=f(\varphi)$  retencioni modeli su pokazali bolje statističke karakteristike u odnosu na primenu standardne *multi-modal* i kvadratne funkcije. Metodom integracije površine su definisani novi parametri retencije, koji u odnosu na logaritam retencionog faktora daju informacije o prosečnoj retenciji u regionima u kojima dominiraju hidrofilne ili reverzno-fazne interakcije, kao i prosečnoj retenciji duž ukupnog HILIC/RP regiona.

U potpunosti nije razjašnjeno koji retencioni mehanizam je prisutan u HILIC i SFC sistemu, kao ni koliki je doprinos particionog i adsorpcionog mehanizma na retenciono ponašanje [18]. Studijama molekulske dinamike je pokazano da se karakteristike adsorbovanog vodenog sloja (npr. profil gustine rastvarača, lokalna orijentacija adsorbovanog rastvarača, kompozicija adsorbovanog sloja) značajno razlikuju od karakteristika adsorbovanog organskog sloja, pa se mogu očekivati drugačiji retencioni mehanizmi između retencije u AQ-HILIC i NA-HILIC sistemima [19]. Superkritična fluidna hromatografija se sve više koristi i postaje komplementarna primeni RP i HILIC hromatografije. Zbog toga je rutinska primena SFC tehnike, uvedena i u regulatorne farmaceutske propise (npr. dobra proizvođačka praksa; *Good Manufacturing Practice-GMP*) [20]. U SFC sistemima, mobilna faza se obično sastoji od  $\text{CO}_2$  i određenog udela metanola. U slučaju korišćenja polarnih stacionarnih faza (silika gel, diol, amino, cijano itd.) može se očekivati retenciono ponašanje slično NP mehanizmu, dok se u slučaju korišćenja nepolarnih stacionarnih faza ( $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_8$ , fenil itd.) očekuje sličnost sa RP mehanizmom retencije. Korišćenje metanola u SFC mobilnoj fazi dovodi do pojave dodatnih interakcija (vodonične veze, dipol-dipol interakcije, interakcije uslovljenje adsorpcijom rastvarača), pa se i u modelovanju retencije, uspešno koriste standardne linearne ali i višeparametarske funkcije [21]. Linearni retencioni modeli, kao i linearne korelacije solvacionih energija (LSER) su uspešno primenjen za modelovanje NA-HILIC i SFC, retencionog ponašanja ispitivanih jedinjenja. Tom prilikom, adsorpcioni model je pokazao bolje statističke karakteristike u odnosu na particioni u SFC sistemima. Na osnovu pregleda literature se uočava, da su rezultati ispitivanja retencionog ponašanja liganada imidazoliskih i serotoninih receptra i srodnih jedinjenja ove doktorske disertacije, prvi dostupni podaci o uporednoj analizi retencionih mehanizama u SFC i NA-HILIC sistemima.

Metodologija eksperimentalnog dizajna se često primenjuje u RP i HILIC sistemima [22-23] ali je njena upotreba zabeležena i u superkritičnoj fluidnoj hromatografiji [24]. Tom prilikom, su ispitani uticaji različitih faktora na SFC retenciju npr. pritisak, temperatura, nagib gradijenta. U ovoj doktorskoj disertaciji, metodologija eksperimentalnog dizajna je

primenjena u cilju definisanja faktora sa najznačajnijim uticajem na SFC retencioni proces, kao i bližeg određivanja ili kvantifikacije njihovog efekta. Na taj način je definisan uticaj koncentracije pufera, udela modifikatora mobilne faze i temperature na retenciono ponašanje liganada imidazolinskih i serotonininskih receptora i srodnih jedinjenja u SFC uslovima. Takođe je zabeleženo, da se uspešno razdvajanje strukturno srodnih jedinjenja postiže u SFC sistemima, koje u slučaju liganada serotonininskih receptora pokazuje bolje karakteristike u SFC u odnosu na standardne RP uslove [25-26].

Primenom kvantitativne veze strukture i retencije se može proceniti korelacija retencionih karakteristika ispitivanih jedinjenja sa parametrima lipofilnosti, u cilju optimizacije hromatografskih uslova za primenu u *in vitro* biofarmaceutskim ispitivanjima. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da lipofilnost liganada imidazolinskih i serotonininskih značajno utiče na retencione karakteristike u reverzno-faznim uslovima, kao npr. na vrednosti novopredloženog  $\log k_R$  parametra. U slučaju HILIC i SFC sistema, retencioni proces liganada imidazolinskih i serotonininskih receptora i srodnih jedinjenja je mnogo složeniji jer je pokazano da zavisi od geometrijskih karakteristika molekula, proton/donor i proton/akceptor osobina, dipolnih interakcija i dr.

### **Citirana relevantna literatura**

- [1] Dardonville C, Rozas I. Imidazoline binding sites and their ligands: an overview of the different chemical structures. *Med Res Rev.* 2004; 24: 639-661.
- [2] Lui H, Du DM. Recent advances in the synthesis of 2-imidazolines and their applications in homogenous catalysis. *Adv Synth Catal.* 2009; 351: 489-519.
- [3] Meyerson BJ, Lewander T. Serotonin synthesis inhibition and estrous behaviour in female rats. *Life Sci. I.* 1970; 9: 661-671.
- [4] Darmon M, Awabdh SA, Emerit MB, Masson J. Insights into serotonin receptor trafficking: cell membrane targeting and internalization. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015; 132: 97-126.
- [5] Nikolić K, Agbaba D. Pharmacophore development and SAR studies of imidazoline receptor ligands. *Mini Rev Med Chem.* 2012; 14: 1542-1555.
- [6] Robert KG. Adrenergic receptors and drugs affecting adrenergic neurotransmission, In: Williams DA; Lemke TL (eds), *Foye's principles of medicinal chemistry*, 7<sup>th</sup>. Edn, Lippincott Williams &Wilkins, 2012.

- [7] Snyder LR, Dolan JW. The linear–solvent–strength model of gradient elution. *Adv Chromatogr.* 38; 1998: 115-187.
- [8] Soczewinski E. Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel-electron donor solvent. *Anal Chem.* 1969; 41: 179-182.
- [9] Schoenmakers PJ, Billiet HAH, Tijssen R, De Galan L. Gradient selection in reversed-phased liquid-chromatography. *J Chromatogr.* 1978; 149: 519-537.
- [10] Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 402: 231-247.
- [11] Peng H, Wang X, Peng J, He Y, Chen Y, Chen F, Li S. Preparation and evaluation of surface-bonded phenylglycine zwitterionic stationary phase. *Anal Bioanal Chem.* 2018; 140: 5941-5950.
- [12] Jandera P. Stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J Sep Sci.* 2008; 31: 1421–1437.
- [13] Česla P, Vankova N, Krenkova J, Fischer J. Comparison of isocratic retention models for hydrophilic interaction liquid chromatographic separation of native and fluorescently labelled oligosaccharides. *J Chromatogr A* 2016; 1438: 179-188.
- [14] Pirok WJ, Molenaar SRA, van Outersterp RE, Schoenmakers PJ. Applicability of retention modelling in hydrophilic-interaction liquid chromatography for algorithmic optimization programs with gradient-scanning techniques. *J Chromatogr A* 2017; 1530: 104-111.
- [15] Karatapanis AE, Fiamegos YC, Stalikas CD. A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 2871-2879.
- [16] Snyder LR. Classification of solvent properties of common liquids. *J Chromatogr Sci.* 1978; 16: 223-234.
- [17] Sakia RM. The Box-Cox transformation technique: a review. *J R Stat Soc Ser D Appl Stat.* 1992; 41: 169-178.
- [18] Bicker W, Wu L, Lämmerhoffer M, Lindner W. Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packing with noncharged polar bondings. *J Sep Sci.* 2008; 31: 2971-2987.
- [19] Melnikov SM, Höltzel A, Seidel-Morgenstern A, Tallarek U. Evaluation of aqueous and nonaqueous binary solvent mixtures as mobile phase alternatives to water-

- acetonitrile mixtures for hydrophilic interaction liquid chromatography by molecular dynamics simulations. *J Phys Chem C* 2015; 119: 512-523.
- [20] Hicks MB, Regalado EL, Tan F, Gong X, Welch CJ. Supercritical fluid chromatography for GMP analysis in support of pharmaceutical development and manufacturing activities. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 117: 316-324.
- [21] Lesselier E. Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 1881-1890.
- [22] Sahoo DK, Sahu PK. Chemometric approach for RP-HPLC determination of azithromycin, secnidazole, and fluconazole using response surface methodology. *J Liq Chromatogr Related Technol.* 2015; 38: 750-758.
- [23] Dejaegher B, Mangelings D, Heyden YV. Method development for HILIC assays. *J Sep Sci.* 2008; 31: 1438-1448.
- [24] Losacco GL, Veathey JL, Guillarme D. Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry: Recent evolution and current trends. *Trends Analyt Chem.* 118; 2019: 731-738.
- [25] Nikolić K, Đorđević-Filijović N, Maričić B, Agbaba D. Development of a novel RP-HPLC method for the efficient separation of aripiprazole and its nine impurities. *J Sep Sci.* 2013; 36: 3165-3175.
- [26] Pavlović M, Malesević M, Nikolić K, Agbaba D. Development and validation of an HPLC method for determination of ziprasidone and its impurities in pharmaceutical dosage forms. *J AOAC Int.* 2011; 94: 713-722.

#### 4. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

##### Spisak publikovanih radova u međunarodnim časopisima

- **Obradović D**, Oljačić S, Nikolić K, Agbaba D. Investigation and prediction of retention characteristics of imidazoline and serotonin receptor ligands and their related compounds on mixed-mode stationary phase. *J Chromatogr A* 2019; 1585: 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.051> (M21)
- **Obradović D**, Stavrianidi AN, Ustinovich KB, Parenago OO, Shpigun OA, Agbaba D. The comparison of retention behaviour of imidazoline and serotonin receptor ligands in non-aqueous hydrophilic interaction chromatography and supercritical fluid

chromatography. J Chromatogr A 2019; 1603: 371-379.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.054> (M21)

- **Obradović D**, Komsta L, Agbaba D. Novel computational approaches to retention modelling in dual hydrophilic interactions/reversed-phase chromatography. J Chromatogr A 2020; 1619. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460951> (M21)

#### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M34)**

- **D. Obradović**, S. Oljačić, M. Popović-Nikolić, G. Popović, D. Agbaba. Investigation of retention behaviour of imidazoline receptor ligands on mixed-mode HILIC stationary phase, 1041-1044, Vol II, Physical Chemistry, Beograd, Srbija, 24 - 28. septembar 2018.

#### **Usmena izlaganja na skupovima međunarodnog značaja (M32)**

- Oljačić S, Nikolić K, Čarapić M, **Obradović D**, Agbaba D, Possibilities of instrumental planar chromatography in drug analysis, The 40<sup>th</sup> Symposium Chromatographic methods of investigating the organic compounds, Univerzitet u Sileziji, Katowice, Poljska, 23 - 26. maj, 2017.
- **Obradović D**, Oljačić S, Agbaba D, Investigation of retention behaviour of selected imidazoline receptor ligands in reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography, VII Serbian Congress of Pharmacy, Beograd, Srbija, 10 - 14. oktobar 2018.
- **Obradović D**, Oljačić S, Nikolić K, Agbaba D, Investigation and prediction of retention characteristics of selected set of central nervous system active compounds on mixed-mode diol stationary phase, The 42<sup>nd</sup> Symposium Chromatographic methods of Investigating Organic Compounds, Univerzitet u Sileziji, Katowice, Poljska, 4 - 7. jun 2019.

### **5. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije**

Ligandi  $\alpha$ -adrenergičkih/imidazolinskih i serotonininskih receptora osnovnim ili sporednim mehanizmima postižu odgovarajući farmakološki efekat na CNS. Strukturnim modifikacijama dostupnih liganada, poboljšava se njihova selektivnost i postiže ciljani terapijski efekat.

Predviđanje retencionog ponašanja, sa manjim brojem predhodnih eksperimenata je značajan segment ispitivanja novosintetisanih liganada i njihovih strukturno srodnih jedinjenja. Različite statističke strategije se mogu koristiti u pronalaženju najpreciznijih zavisnosti eksperimentalno dobijenih retencionih parametara sa parametrima hromatografskog sistema, kao i sa strukturnim osobinama testiranih jedinjenja. Na taj način je omogućen napredak u polju fundamentalnog razumevanja retencionog procesa koji bi trebalo da dovode do bržeg i jednostavnijeg definisanja hromatografskih uslova razdvajanja, kao i njihove primene u *in vitro* biofarmaceutskim ispitivanjima.

Fizičko-hemijska složenost dualnih HILIC/RP sistema omogućuje ispitivanje strukturno različitih hemijskih grupa na istoj stacionarnoj fazi, ali istovremeno otežava definisanje opšte jednačine u cilju predviđanja retencije. U ovoj doktorskoj disertaciji predloženi su novi pristupi za modelovanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninских receptora i srodnih jedinjenja u sistemima sa dualnim HILIC/RP interakcijama, koji su zasnovani na definisanju: *i*) uticaja ukupne polarnosti mobilne faze *ii*) novih matematičkih modela za predviđanje retencionog ponašanja primenom *Box-Cox* transformacije *iii*) formula za izračunavanje *prevojne tačke* *iv*) novih parametara retencije (*deskriptori retencije*) *v*) QSRR modela za predviđanje vrednosti *prevojne tačke* i parametara retencije.

Aspekt razumevanja retencionog ponašanja na *mixed-mode* stacionarnoj fazi je proširen, kao i način na koji se može interpretirati pojava nelinearnosti u retencionom ponašanju. Tom prilikom, sagledane su matematičke karakteristike dobijenih troparametarskih  $\log k = f(\varphi)$  funkcija (regresioni koeficijenti, integral i minimum funkcije), kako bi se kvantifikovale karakteristike retencionog procesa i definisala veza sa strukturnim osobinama ispitivanih jedinjenja. S obzirom da novodefinisani parametri retencije zavise od fizičko-hemijskih osobina liganada imidazolinskih i serotoninских receptora, oni se mogu primeniti u svojstvu *retencionih deskriptora* (lipofilnost) prilikom *in vitro* biofarmaceutskih ispitivanja. Kao statističke tehnike za obradu retencionih podataka primenjene su: metoda kubne *spline* interpolacije, metoda analize glavnih komponenta i metoda hijerarhijskog klasterovanja. Rezultati su pokazali da se novodefinisani retencioni parametri ( $\log k_H$ ,  $\log k_R$ ,  $\log k_A$ ) i jednačine (IR, XR, LQ, II, IR) mogu uspešno primeniti u tumačenju dualnih retencionih mehanizama. Modeli SVM/QSRR i MLR/QSRR se mogu primeniti u pouzdanom predviđanju vrednosti *prevojne tačke* novosintetisanih liganada imidazolinskih i serotoninских receptora i strukturno srodnih jedinjenja.



U ovoj doktorskoj disertaciji retenciono ponašanje liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja je po prvi put ispitano u NA-HILIC i SFC sistemima na *mixed-mode diol* i diol stacionarnim fazama. Ispitane su i razlike između SFC i NA-HILIC retencionih mehanizama, koje dovode do pojave razlika u redosledu eluiranja i razdvajanju strukturno srodnih jedinjenja.

Dobijeni rezultati prikazuju retencione karakteristike u dva složena hromatografska sistema, na osnovu karakteristika mobilne i stacionarne faze. Može se uočiti, da su ispitivanjima obuhvaćeni komplementarni hromatografski uslovi zasnovani na uticaju nepolarne metanol/CO<sub>2</sub> naspram uticaja polarnije metanol/acetonitril mobilne faze. Takođe modifikovana *mixed-mode diol* u odnosu na klasičnu diol stacionarnu fazu, obezbeđuje dodatne hidrofobne interakcije u sistemu i nešto drugačiji mehanizam retencije.

Rezultati su pokazali da do značajnih promena u retencionim mehanizmima između NA-HILIC i SFC-a dolazi nakon dodatka kiseline mobilnoj fazi, što je posebno vidljivo na *mixed-mode* koloni. Razlike između NA-HILIC i SFC retencije su kvantifikovane definisanjem vrednosti parametra *S*, interpretacijom LSER jednačine i karakteristikama razdvajanja strukturno srodnih hemijskih parova. Rezultati QSRR modelovanja pokazuju da na retencioni proces u SFC i NA-HILIC najviše utiču polarne interakcije i vodonične veze. Metodom eksperimentalnog dizajna su definisane zavisnosti između retencionog faktora i parametara SFC sistema za pouzdano predviđanje retencionog ponašanja, kao i uslovi u kojima se postiže uspešno razdvajanje liganada serotoninskih receptora i strukturno srodnih jedinjenja.

Sagledavajući prikazane rezultate, može se zaključiti da je kandidat izveo detaljno istraživanje koje se ogleda u *i*) vizuelnoj/grafičkoj interpretaciji dobijenih retencionih podataka *ii*) karakterizaciji retencionih mehanizama kroz primenu standardnih retencionih modela, ali i definisanje novih nelinearnih zavisnosti *iii*) definisanju vrednosti *prevojne tačke*, novih parametara retencije i njihovoj karakterizaciji primenom PCA, HCA analize, kubne *spline* interpolacije *iv*) ispitivanju uticaja mobilne i stacionarne faze, kao i uticaja parametara hromatografskog sistema i *v*) primeni metoda kvantitativne veze strukture i retencije. Naučni doprinos obuhvata i uporednu analizu retencionog ponašanja liganada imidazolinskih u odnosu na ligande serotoninskih receptora u HILIC i RP, kao i u NA-HILIC i SFC sistemima.

Dobijeni rezultati omogućavaju predviđanje retencionih karakteristika nosivih jedinjenja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora u različitim hromatografskim uslovima, ali i dalju optimizaciju hromatografskog sistema za primenu u *in*

*vitro* biofarmaceutskim ispitivanjima. Takođe, dobijeni rezultati otvaraju put ka preciznijem sagledavanju fundamentalnog koncepta retencionog ponašanja, koje je važno za odabir odgovarajućih hromatografskih uslova i njihovu primenu u farmaceutskim ispitivanjima.

Rad **Obradović D**, *Oljačić S, Nikolić K, Agbaba D. Investigation and prediction of retention characteristics of imidazoline and serotonin receptor ligands and their related compounds on mixed-mode stationary phase. J Chromatogr A 2019; 1585: 92-104* u kome je publikovan deo rezultata ove disertacije do sada je citiran dva puta:

- Haddad PR, Taraji M, Szucs R. Prediction of analyte retention time in liquid chromatography. *Anal Chem.* 2021; 93: 228-256. (M21a)
- Uijl MJ den, Schoenmakers PJ, Pirok BWJ, Bommel MR van. Recent applications of retention modelling in liquid chromatography. *J Sep Sci.* 2020. (M22)

Takođe, rad **Obradović D**, *Komsta L, Agbaba D. Novel computational approaches to retention modelling in dual hydrophilic interactions/reversed-phase chromatography. J Chromatogr A 2020; 1619.* u kome je publikovan deo rezultata je citiran u:

- Uijl MJ den, Schoenmakers PJ, Pirok BWJ, Bommel MR van. Recent applications of retention modelling in liquid chromatography. *J Sep Sci.* 2020. (M22)

## 6. Provera originalnosti doktorske disertacije

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetskoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd, završena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za Similarity Index iznosi 16% kao posledica podudarnosti ličnih imena, naziva institucija, naziva analita, reagenasa, izraza korišćenih u opisu metodologije i primenjenih instrumentalnih metoda i tehnika, kao i navođenja uobičajnih fraza koje su korišćene u opisu rezultata istraživanja.

U skladu sa tim, može se zaključiti da je priložena doktorska disertacija kandidata mag. farm. Darije Obradović originalno naučno delo.

## 7. Zaključak i predlog komisije

Na osnovu svega obrazloženog, može se zaključiti da doktorska disertacija ispunjava zahteve savremenog naučnog istraživanja i da prikazani rezultati predstavljaju značajan i originalan naučni doprinos za oblast Farmaceutske-medicinske hemije. Rezultati su publikovani u 3 rada u časopisu vrhunskog međunarodnog značaja, *Journal of Chromatography A* (M21), 3 usmena izlaganja (M32) i 1 saopštenju sa međunarodnih skupova koje je štampano u celini (M34).

Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju magistra farmacije Darije Obradović i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

**„Modelovanje retencionog ponašanja liganada imidazolinskih i serotoninskih receptora i srodnih jedinjenja u različitim hromatografskim uslovima“**

Članovi komisije:

---

Dr Danica Agbaba-mentor, profesor emeritus,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Katarina Nikolić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Oleg Alekseevič Špigun, profesor dopisni član Ruske Akademije Nauka,  
Hemijski fakultet Moskovskog državnog univerziteta naziva M.V. Lomonosov

---

Dr Filip Andrić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Beograd, 05.04.2021.