

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

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na sednici održanoj 2. 3. 2017. godine, donelo je Odluku (broj 363/2) kojom je imenovana **Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije** pod naslovom: „**Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke karakteristike derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina**“, kandidata **dipl. farm. Jelene Savić**, asistenta na Katedri za farmaceutsku hemiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Komisija u sastavu:

1. **Dr sc. Jasmina Brborić, vanredni profesor, mentor**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. **Dr sc. Sanda Dilber, docent, mentor**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. **Dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. **Dr sc. Marina Milenković, redovni profesor**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
5. **Dr sc. Silva Dobrić, redovni profesor**
Univerzitet odbrane u Beogradu – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

pročitala je završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

I Z V E Š T A J

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. farm. Jelene Savić pod nazivom „**Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke karakteristike derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina**“ napisana je na 209 strana standardnog formata (prored 1,5; font *Times New Roman* - 12).

Doktorska disertacija sadrži **Rezime** na srpskom i **Abstract** na engleskom jeziku, a sastoji se iz sledećih poglavlja: **1. Uvod**, **2. Cilj rada**, **3. Eksperimentalni deo i rezultati**, **4. Diskusija**, **5. Zaključak**, **6. Literatura**, **7. Prilozi**.

Disertacija sadrži 34 slike, 37 tabela i 265 literaturnih navoda.

U **Uvodu**, koji je napisan na 46 strana, pregledno su prikazani podaci iz literature od značaja za predmet proučavanja ove doktorske disertacije (*Inflamacija, istorijski razvoj i hemijska struktura nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), Ciklooksigenaza, Terapijski i neželjeni efekti, Kontraindikacije za primenu NSAIL, Molekulski doking, Reformatski reakcije, Ispitivanje i značaj osnovnih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih osobina farmakološki aktivnih jedinjenja, In vivo ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti, In vitro ispitivanje inhibicije ciklooksigenaze, Određivanje biohemijskih parametara*) i istaknuta je opravdanost ovih istraživanja, iz kojih proizilaze ciljevi ove doktorske disertacije.

U prvom delu *Uvoda* opisani su mehanizmi nastanka inflamacije, istorijski razvoj grupe NSAIL kao i pregled hemijskih struktura lekova u okviru ove grupe. Objasnjen je mehanizam delovanja NSAIL, dat je detaljan opis aminokiselinskog sastava aktivnog mesta obe izoforme enzima ciklooksigenaze (COX-1, COX-2) i naznačene su ključne razlike između izoformi. U ovom delu *Uvoda* su prikazani terapijski i neželjeni efekti, kontraindikacije i potencijalne indikacije za primenu NSAIL koje se i dalje istražuju.

U drugom delu *Uvoda* objašnjena je sinteza, kao i princip i značaj parametara koji se određuju eksperimentalnim procedurama. Objasnjena je metoda molekuskog dokinga, dat je prikaz Reformatski reakcije kao i njenih različitih modifikacija. Opisane su fizičko-hemijske (pK_a i $\log P$) kao i biofarmaceutske osobine (gastrointestinalna apsorpcija) koje su od izuzetnog značaja za farmakološki aktivno jedinjenje i dat je pregled metoda za njihovo određivanje sa akcentom na metodama koje su odabrane za eksperimentalni rad u ovoj doktorskoj disertaciji. U delu koji se odnosi na *in vivo* ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti, dat je pregled eksperimentalnih procedura sa posebnim osvrtom na test edema šapice pacova izazvanog karagenanom. U poglavlju koje se odnosi na *in vitro* ispitivanje inhibicije ciklooksigenaze nabrojane su različite metode određivanja IC_{50} vrednosti, među kojima i metoda na komercijalno dostupnim kitovima koja je vrlo zastupljena u novijim istraživanjima. U poslednjem poglavlju *Uvoda* objašnjen je značaj određivanja biohemijskih parametara sa aspekta gastrointestinalne podnošljivosti NSAIL, oksidativnog stresa u organizmu koji mogu da izazovu i uticaja na funkciju jetre.

U poglavlju *Cilj rada* prikazano je 5 glavnih ciljeva. Kao **prvi cilj** je postavljeno ispitivanje interakcija β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina sa aminokiselinama u aktivnom mestu COX-1 i COX-2 izoforme enzima uz pomoć doking studija. Planirano je da se proceni selektivnost derivata β -hidroksi- β -bifenilbuterne kiseline i derivata β -hidroksi- β , β -difenilpropionske kiseline prema COX-2 izoformi, kao i uticaj supstitucije bočnog niza metil grupom kod ovih derivata na inhibiciju COX-1 i COX-2. Pored toga, planirano je ispitivanje uticaja različitih supstituenata (nitro, trifluorometil, metil, dimetilamino, metoksi grupe i hlora) na benzenovom prstenu β -hidroksi- β , β -difenilpropionske kiseline na selektivnost prema COX-2 izoformi. U okviru ovog cilja je planirano i određivanje molekulske zapremine minimizovanih struktura ispitivanih kiselina, kao i dokovanih kiselina u njihovoj najboljoj prostornoj orijentaciji u aktivnom mestu izoforme COX-2 i poređenje sa molekulskom zapreminom ibuprofena. **Drugi cilj** podrazumeva sintezu odabranih derivata β -hidroksi- β -arilpropionske kiseline, prečišćavanje sintetisanih derivata, potvrdu čistoće i strukture odgovarajućim hromatografskim i spektroskopskim metodama. **Treći cilj** je bio ispitivanje osnovnih fizičko-hemijskih osobina odabranim hromatografskim metodama, kao i biofarmaceutskih osobina β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina odabranim *in vitro* metodama. U okviru ovog cilja je bilo i sprovođenje QSPR i QSRR studija na osnovu kojih bi se identifikovali molekulski deskriptori od značaja za gastrointestinalnu apsorpciju i dizajnirala nova jedinjenja sa većom gastrointestinalnom apsorpcijom. *In vivo* procena antiinflamatorne aktivnosti ispitivanih derivata β -hidroksi- β -arilpropionske kiseline je postavljena kao **četvrti cilj**. Pored toga, planirano je i određivanje relevantnih biohemijskih parametara kako bi se procenio uticaj ispitivanih jedinjenja na želudačnu sluzokožu, oksidativni stres i funkciju jetre eksperimentalnih životinja. Kao **peti cilj** je postavljeno *in vitro* ispitivanje selektivnosti odabranih jedinjenja prema ciklooksigenazi-2 u okviru koga je trebalo odrediti IC₅₀ vrednosti za pojedinačne izoforme enzima, kao i indeks selektivnosti prema COX-2 izoformi.

Poglavljje ***Eksperimentalni deo i rezultati*** obuhvata 7 potpoglavlja: *Doking studije, Sinteza derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina, Strukturna analiza sintetisanih jedinjenja, Osnovna fizičko-hemijska i biofarmaceutska ispitivanja β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina, Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti sintetisanih jedinjenja i procena neželjenih efekata, Biohemijska ispitivanja i In vitro ispitivanje inhibicije ciklooksigenaze.*

Na 95 strana teksta, kroz 19 slika i 33 tabele, dat je detaljan opis korišćenih materijala i opreme, primenjenih postupaka i metoda, kao i pregledan i jasan prikaz rezultata istraživanja.

Za izvođenje eksperimenata na ogleđnim životinjama dobijena je saglasnost Etičke

Komisije Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj rešenja: 323-06-5023/2013-05).

U poglavlju *Diskusija*, na 25 strana teksta, kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način analizirao, obrazložio i povezao dobijene rezultate sa dostupnim rezultatima drugih autora, a u poglavlju *Zaključak* prikazani su najznačajniji zaključci, proistekli iz diskusije eksperimentalnog rada i rezultata istraživanja, iz kojih se jasno vidi da su ostvareni postavljeni ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije.

U poglavlju *Literatura* navedeno je 265 relevantnih referenci.

Prilozi sadrže *Spisak objavljenih i saopštenih rezultata koji čine sastavni deo doktorske disertacije, Biografiju i odgovarajuće izjave (Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada, Izjavu o korišćenju).*

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U ovoj doktorskoj disertaciji doking studijama su ispitane interakcije α -nesupstituisanih, α -metil i dimetil supstituisanih β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina sa aminokiselinama u aktivnom mestu izoforme enzima ciklooksigenaza-1 (COX-1) i ciklooksigenaza-2 (COX-2). Ispitana su tri derivata β -hidroksi- β -bifenilbuterne kiseline i tri derivata β -hidroksi- β,β -difenilpropionske kiseline za koje su podaci o sintezi pronađeni u literaturi. Rezultati su pokazali da su derivati propionske kiseline jači i selektivniji inhibitori izoforme COX-2 od derivata buterne kiseline i da jače interakcije ostvaruju α -nesupstituisani od supstituisanih derivata. Odabrana je 3-hidroksi-3,3-difenilpropanska kiselina za dalje strukturne modifikacije u cilju ispitivanja uticaja različitih supstituenata (nitro, trifluorometil, metil, metoksi, dimetilamino grupe i hlora) u benzenovom prstenu na inhibiciju obe COX izoforme i selektivnost prema COX-2 izoformi. Rezultati ovih doking studija su pokazali da se najjača inhibicija COX-2 očekuje od derivata koji sadrže dimetilamino i nitro grupu u benzenovom prstenu. Za dokovana jedinjenja su izračunate molekulske zapremine dvema metodama i utvrđeno je da ispunjavaju uslov da su za minimalno 15 \AA^3 veće od molekulske zapremine ibuprofena, što ukazuje na to da su ova jedinjenja potencijalno selektivna za COX-2.

Modifikovanom Reformatski reakcijom sintetisano je sedam derivata 3-hidroksi-3,3-difenilpropanske kiseline sa supstituisanim jednim od benzenovih prstenova nitro, trifluorometil, metil grupom ili hlorom u *para* ili *meta* položaju. Dodatno, sintetisana su tri derivata β -hidroksi- β -bifenilbuterne kiseline i tri derivata β -hidroksi- β,β -difenilpropionske kiseline korišćena u doking studijama. Sinteza derivata kod kojih su oba benzenova prstena supstituisana hlorom, dimetilamino i metoksi grupom, kao i jedinjenja sa nitro grupom u *meta* položaju nije bila moguća. Modifikovana Reformatski reakcija se sastojala iz dve faze. U prvoj fazi su sintetisani 1-etoksi estri α -brom alkanskih kiselina iz α -brom sirćetne kiseline i etil-vinil etra. U drugoj fazi, sintetisani intermedijeri reaguju sa odgovarajućim ketonom u tetrahidrofuranu kao rastvaraču na temperaturi 65 °C u struji azota. Utvrđeno je da povišenje temperature značajno doprinosi skraćanju vremena trajanja reakcije (sa nekoliko dana na 17-24 sata). Jedinjenje sa nitro grupom u *para* položaju je sintetisano sa najnižim prinosom (24%), dok je jedinjenje sa hlorom u *para* položaju sintetisano u prinosu od 72%.

Čistoća sintetisanih jedinjenja je potvrđena hromatografskim tehnikama (TLC i HPLC), a njihove strukture određivanjem temperature topljenja i spektroskopskim metodama (UV/VIS, ATR-FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS TOF i MS-MS).

Konstante jonizacije ($\text{p}K_a$) su određene reverzno faznom visokoeffikasnom tečnom hromatografijom za derivate β -hidroksi- β,β -arilalkanskih kiselina. Dobijeni eksperimentalni rezultati su upoređeni sa vrednostima koje su predviđene računarskim programima MarvinSketch i ACD/I-Labs. Izračunat je procenat jonizacije ispitivanih jedinjenja na pH vrednostima karakterističnim za želudac i tanko crevo i upoređen je sa procentom jonizacije ibuprofena.

Eksperimentalno su određeni particioni koeficijenti ($\log P$) reverzno faznom visokoeffikasnom tečnom hromatografijom za prethodno sintetisane i novosintetisane derivate β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina. Dobijeni rezultati su upoređeni sa vrednostima koje su izračunate uz pomoć različitih računarskih programa (MarvinSketch, Molinspiration, KOWWIN, ALOGPS).

Gastrointestinalna apsorpcija je procenjena *in vitro* paralelnim testom permeabilnosti na veštačkim membranama (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA) i bioparticionom micelarnom hromatografijom (eng. *Biopartitioning Micellar Chromatography*, BMC) za sintetisane derivate β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina. Rezultati su pokazali da sva ispitivana jedinjenja imaju nižu gastrointestinalnu apsorpciju u odnosu na

ibuprofen. Analizirani su kvantitativni odnosi strukture i osobina (eng. *Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR) i kvantitativni odnosi strukture i retencije (eng. *Quantitative Structure-Retention Relationship*, QSRR) ispitivanih jedinjenja u cilju formiranja QSPR i QSRR modela koji uspostavljaju funkcionalnu zavisnost između geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora i odgovarajućih PAMPA (%T, $-\log P_{app}$) i BMC (k) parametara. Na osnovu odabranog QSPR ili QSRR modela i izvedenih doking studija dizajnirane su strukture jedinjenja za koje je procenjena veća gastrointestinalna apsorpcija od ispitivanih jedinjenja.

Antiinflamatorna aktivnost derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina i ibuprofena je procenjena *in vivo* korišćenjem testa edema šapice pacova izazvanog karagenanom. Za sva ispitivana jedinjenja je utvrđena ED_{50} vrednost. Najviši antiinflamatorni efekat je pokazalo jedinjenje koje je derivat β -hidroksi- β , β -difenilpropionske kiseline sa metil grupom kao supstituentom u α položaju bočnog niza ($ED_{50} = 14,79 \mu\text{mol/kg}$). Derivat β -hidroksi- β , β -difenilpropionske kiseline sa nitro grupom u *para* položaju je pokazao sličnu antiinflamatornu aktivnost ($ED_{50} = 47,76 \mu\text{mol/kg}$) kao i ibuprofen ($ED_{50} = 43,97 \mu\text{mol/kg}$). Najnižu antiinflamatornu aktivnost je pokazalo jedinjenje sa trifluorometil grupom u *meta* položaju benzenovog prstena ($ED_{50} = 139,28 \mu\text{mol/kg}$).

U cilju ispitivanja gastrične podnošljivosti ispitivanih jedinjenja, eksperimentalnim životinjama su nakon testa edema šapice uzorkovani želuci koji su makroskopski ispitani na prisustvo lezija i odmah zamrzavani kako bi se kasnije izvršila biohemijska ispitivanja uzoraka želudačnog tkiva. Rezultati makroskopskog ispitivanja su pokazali prisustvo minimalnih lezija (hiperemije i tačkasta krvarenja), a rezultati određivanja koncentracije biohemijskih parametara malonildialdehida (MDA) i glutationa (GSH) su pokazali da sva jedinjenja, sa izuzetkom onih koji sadrže trifluorometil grupu kao supstituent izazivaju manji oksidativni stres u želudačnom tkivu od ibuprofena.

Potencijal ispitivanih jedinjenja da izazovu oksidativni stres u plazmi posle akutne primene je procenjen određivanjem biohemijskih parametara kao što su totalni antioksidantni status (TAS) i totalni oksidantni status (TOS). Oksidativno-stresni indeks, izračunat kao odnos parametara TAS i TOS, je pokazao da ni jedno od ispitivanih jedinjenja ne izaziva veći oksidativni stres od ibuprofena. Vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa, kao i aktivnosti enzima paraoksonaze su pokazale da ni jedno od ispitivanih jedinjenja ne izaziva veći oksidativni stres u plazmi eksperimentalnih životinja od ibuprofena.

Efekat ispitivanih jedinjenja na funkciju jetre eksperimentalnih životinja je procenjen određivanjem koncentracije jetrenih enzima: alkalne fosfataze (ALP), aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) u hepariniziranoj plazmi. Koncentracije ovih enzima su bile statistički značajno povišene u grupama životinja koje su tretirane jedinjenjima sa trifluorometil grupom, dok kod grupa životinja tretiranih ostalim jedinjenjima nije bilo statistički značajnog porasta u odnosu kontrolnu grupu. U odnosu na grupu životinja tretiranu ibuprofenom nije bilo statistički značajnog porasta posmatranih enzima ni kod jedne od grupa tretiranih ispitivanim jedinjenjima.

Odabrano je šest jedinjenja za *in vitro* ispitivanje inhibicije COX-1 i COX-2 izoforme na komercijalnom kitu. Nakon određivanja IC_{50} vrednosti, izračunat je indeks selektivnosti za inhibiciju COX-2 izoforme. Najbolju selektivnost prema inhibiciji COX-2 izoforme pokazalo je jedinjenje sa polarnom nitro grupom u *para* položaju benzenovog prstena.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Najvažniji efekti nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) su analgetički, antipiretički i antiinflamatorni. NSAIL se koriste u tretmanu različitih akutnih i hroničnih oboljenja kao što su blag do umeren bol izazvan inflamatornim procesom ili povredom tkiva, uganuća zglobova, istegnuća mišića, reumatizam, bolovi u leđima, išijas, osteoartritis, reumatoidni artritis, akutna kostobolja, inflamatorne artropatije, dismenoreja, glavobolja, postoperativni bol, bubrežne i žučne kolike, povišena telesna temperatura.¹ NSAIL je veoma brojna grupa strukturno različitih lekova koji su veoma zastupljeni u terapiji u najširoj populaciji. Ovi lekovi ostvaruju svoj efekat inhibicijom enzima ciklooksigenaze (COX). Postoje dve COX izoforme: COX-1 izoforma, koja se smatra konstitutivnom, fiziološkom i COX-2, koja se smatra inducibilnom i patološkom.² Potreba za pronalaženjem novih struktura NSAIL je i danas aktuelna^{3,4} zbog toga što neselektivni NSAIL mogu da izazovu različite neželjene efekte, pre svega gastrointestinalne,⁵ dok se neki selektivni lekovi iz grupe koksiba dovode u vezu sa kardiovaskularnim neželjenim efektima sa smrtnim ishodom.⁶ Potencijalne indikacije za primenu NSAIL kao što su Alchajmerova bolest⁷ i neki oblici kancera⁸ takođe predstavljaju razlog za istraživanje novih jedinjenja sa antiinflamatornom aktivnošću.

Većina neselektivnih NSAIL u svojoj strukturi sadrži karboksilnu grupu. Do otkrića lumirakoksiba se smatralo da je odsustvo karboksilne grupe uslov za selektivnost prema COX-2 izoformi.⁹ Mnogi selektivni COX-2 inhibitori su sulfoni ili sulfonamidi. Ibuprofen, neselektivni COX inhibitor i jedan od najčešće korišćenih NSAIL, je derivat propionske kiseline i vrlo često se koristi u istraživanjima kao polazno jedinjenje za strukturne modifikacije i kao standard sa kojim se upoređuje antiinflamatorna aktivnost ispitivanih jedinjenja. U literaturi su pronađeni podaci o sintezi β -hidroksi- β -arilakanskih kiselina koje su derivati β -hidroksi- β -bifenilbuterne kiseline i β -hidroksi- β,β -difenilpropionske kiseline.¹⁰ Ovi derivati u strukturi sadrže fenilpropionsku kiselinu poput nekih NSAIL kao što su ibuprofen, ketoprofen i fenoprofen, pa su odabrana za ispitivanje njihove antiinflamatorne aktivnosti.

Doking studije predstavljaju *in silico* metodu za ispitivanje interakcija odabranog liganda sa aminokiselinama u aktivnom mestu ciklooksigenaze.^{11,12} Ova kompjuterska metoda je iskorišćena kako bi se ispitaio uticaj supstitucije (jednom ili dvema metil grupama) bočnog niza derivata β -hidroksi- β -bifenilbuterne kiseline i β -hidroksi- β,β -difenilpropionske kiseline na inhibiciju COX-1 i COX-2, kao i na selektivnost prema inhibiciji COX-2 izoforme. Na osnovu dobijenih rezultata je odabrana struktura 3-hidroksi-3,3-difenilpropionske kiseline na kojoj su vršene dalje strukturne modifikacije. Jedan od benzenovih prstenova je supstituisan različitim supstuentima u *para* ili *meta* položaju (nitro, trifluorometil, hlor, metil) sa ciljem da se u doking studijama ispita njihov uticaj na selektivnost prema COX-2 inhibiciji. Ispitane su interakcije derivata 3-hidroksi-3,3-difenilpropionske kiseline kod kojih su oba benzenova prstena simetrično supstituisana u *para* položaju hlorom, dimetilamino i metoksi grupom sa aminokiselinama u aktivnom mestu COX-1 i COX-2.

Aktivno mesto COX-2 ima veću 25% zapreminu od aktivnog mesta COX-1, tako da selektivniji COX-2 inhibitori moraju imati i veću molekulsku zapreminu od neselektivnih.¹³ Molekulska zapremina je određena dvema različitim kompjuterskim metodama i u oba slučaja su sva jedinjenja ispunila uslov da su za minimalno 15 \AA^3 veća od molekulske zapremine ibuprofena¹⁴ što ih čini potencijalno selektivnim inhibitorima COX-2.

Reformatski reakcija¹⁵ je jedna od fundamentalnih reakcija u građenju C-C veze. U cilju povećanja prinosa i izbegavanja nastajanja sporednih proizvoda česte su modifikacije ove reakcije.¹⁶ Za sintezu derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina odabrana je modifikovana Reformatski reakcija kojom su prethodno Dilber i saradnici sintetisali 6 derivata ovih kiselina koji su korišćeni u doking studijama.¹⁰ Reakcija je dodatno optimizovana povišenjem temperature na 65°C u drugoj fazi, što je kao rezultat imalo skraćenje vremena trajanja

reakcije (sa nekoliko dana na 17-24 sata) i povećanje čistoće sintetisanih jedinjenja. Jedinjenja su prečišćavana prekrizacijom, čistoća je potvrđena hromatografskim tehnikama (TLC i HPLC), a struktura određivanjem temperature topljenja i spektroskopskim tehnikama (UV/VIS, ATR-FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR, MS TOF i MS-MS).

Konstanta jonizacije je važna fizičko-hemijska karakteristika farmakološki aktivnog jedinjenja sa aspekta odabira adekvatnih uslova za analizu jedinjenja, farmakokinetičkih parametara i ostvarivanja interakcija sa receptorom. Konstante jonizacije (pK_a) prethodno sintetisanih i novosintetisanih derivata β -hidroksi- β -arilakanskih kiselina su određene metodom reverzno-fazne visokoeфикаsne tečne hromatografije koju su Oumada i saradnici¹⁷ primenili na nekim NSAIL (ibuprofen, diklofenak, flurbiprofen, naproksen, butibufen, fenbufen). Sa razvojem visokoeфикаsne tečne hromatografije različite RP-HPLC metode su se nametnule kao optimalni izbor za određivanje pK_a vrednosti zbog reproduktivnosti, osetljivosti i brzine izvođenja. Vrednosti pK_a je moguće predvideti odgovarajućim računarskim programima, ali se dobijene vrednosti za isto jedinjenje mogu znatno razlikovati što je posledica različitih algoritama za izračunavanje koji su inkorporirani u računarski program.¹⁸ Računarskim programima MarvinSketch i ACD/I-Labs predviđene su pK_a vrednosti ispitivanih β -hidroksi- β -arilakanskih kiselina. Ni jednim od korišćenih softvera nisu dobijeni rezultati koji su u zadovoljavajućoj korelaciji sa eksperimentalno dobijenim rezultatima, što nije neuobičajen slučaj i objašnjava se neadekvatnim algoritmima. Zaključeno je da se ni jedan od pomenutih softvera ne može koristiti za predviđanje pK_a vrednosti ispitivanih β -hidroksi- β -arilakanskih kiselina. Poređenje rezultata izračunavanja procenta jonizacije ispitivanih jedinjenja i ibuprofena na pH vrednostima karakterističnim za želudac i tanko crevo je pokazalo da ne postoji značajna razlika koja bi uticala na apsorpciju u ovim organima.

Particioni koeficijenti (logP) ispitivanih β -hidroksi- β -arilakanskih kiselina su određeni RP-HPLC metodom koju su koristili autori Benhaim i Grushka¹⁹ za određivanje log P nekoliko NSAIL. Standardna metoda za određivanje logP, *shake flask* poseduje izvesne nedostatke, pa je odabrana RP-HPLC metoda. Vrednosti logP za ispitivana jedinjenja su predviđene korišćenjem računarskih programa (Molinspiration, KOWWIN, ALOGPS, MarvinSketch). Utvrđena je zadovoljavajuća korelacija između eksperimentalno dobijenih i predviđenih logP vrednosti računarskim programom KOWWIN ($R^2 = 0,8864$), pa se zaključuje da se ovaj softver može koristiti za predviđanje logP vrednosti β -hidroksi- β -arilakanskih kiselina.

Postoji potreba da se u najranijim fazama razvoja leka izvrši biofarmaceutska karakterizacija jer su neodgovarajuće biofarmaceutske osobine glavni razlog isključivanja farmakološki aktivnog jedinjenja iz daljeg procesa razvoja.²⁰ Jedna od najvažnijih biofarmaceutskih osobina je gastrointestinalna apsorpcija. PAMPA je *in vitro* metoda kojom se na veštačkim membranama odabirom odgovarajućih uslova može proceniti permeacija kroz biološke membrane. Za procenu gastrointestinalne apsorpcije se mogu koristiti jednokomponentne, dvokomponentne ili trokomponentne membrane,²¹ a moguće je sintetisati i pojedina fosfolipidna jedinjenja kako bi se dobile veštačke membrane koje bi što vernije imitirale biološke membrane.²² Za poređenje apsorpcije ispitivanih β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina sa apsorpcijom ibuprofena u tankom crevu odabrani su najjednostavniji PAMPA uslovi (jednokomponentna membrana sastavljena od lecitina jajeta, izokraski pH, sobna temperatura). Rezultati su pokazali da svi ispitivani derivati β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina pokazuju nižu gastrointestinalnu apsorpciju od ibuprofena.

BMC je *in vitro* tehnika kojom se, odabirom odgovarajućih hromatografskih uslova, može proceniti permeabilnost kroz različite biološke membrane.²³ Za procenu gastrointestinalne apsorpcije kao stacionarna faza je korišćena C18 kolona, a kao mobilna faza rastvor nejonskog surfaktanta polioksietilen(23)lauril etra (Brij35) u puferu pH = 5,5 i acetonitril (80:20, v/v).²⁴ Rezultati retencionog ponašanja ispitivanih jedinjenja pokazuju niže vrednosti retencionog faktora (k) za sve derivate β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina u poređenju sa ibuprofenom, tako da se za ispitivana jedinjenja očekuje i niža gastrointestinalna apsorpcija od ibuprofena.

Primenom QSPR analize rezultata PAMPA²⁵ i QSRR analize rezultata BMC²⁶ se mogu identifikovati funkcionalne grupe koje imaju najveći uticaj na gastrointestinalnu apsorpciju. Formirani su QSPR i QSRR modeli koji se mogu koristiti za predviđanje gastrointestinalne apsorpcije β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina. Na osnovu QSPR i QSRR studija uz korišćenje zaključaka doking studija dizajnirana su jedinjenja koja bi trebalo da imaju veću gastrointestinalnu apsorpciju u odnosu na ispitivana jedinjenja.

Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina je izvršeno testom edema šapice izazvanog karagenanom.²⁷ Za sva ispitivana jedinjenja je utvrđena ED₅₀ aktivnost. Najveći antiinflamatorni efekat je pokazao derivat β -hidroksi- β , β -difenilpropionske kiseline sa metil grupom kao supstituentom u α položaju bočnog niza (ED₅₀ = 14,79 μ mol/kg), dok je derivat β -hidroksi- β , β -difenilpropionske kiseline sa nitro grupom u *para* položaju pokazao sličan antiinflamatorni efekat (ED₅₀ = 47,76 μ mol/kg) kao i ibuprofen

(ED₅₀ = 43,97 μmol/kg). Jedinjenje sa trifluorometil grupom u *meta* položaju benzenovog prstena je pokazalo najmanji antiinflamatorni efekat (ED₅₀ = 139,28 μmol/kg).

Nakon ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti oglednim životinjama kojima je primenjena najveća doza ispitivanih jedinjenja (96,96 μmol/kg) su uzorkovani krv i želuci kako bi se ispitali gastrointestinalna podnošljivost, oksidativni stres i funkcija jetre.

Gastrointestinalna podnošljivost ispitivanih jedinjenja je procenjena makroskopski, posmatranjem želudačne sluznice pod lupom uvećanja 3x i primećeno je prisustvo minimalnih lezija kao što su hiperemije i tačkasta krvarenja (petehije), što ispitivana jedinjenja prema Adami-jevoj skali (0-8) svrstava na nivo 1. Gastrointestinalna podnošljivost je procenjena na istom želudačnom tkivu određivanjem koncentracije biohemijskih parametara: malonildialdehida (MDA) i glutationa (GSH). Rezultati su pokazali da nijedan od ispitivanih derivata β-hidroksi-β-arilalkanskih kiselina ne izaziva statistički značajnije povećanje koncentracije MDA i statistički značajnije sniženje koncentracije GSH od ibuprofena.

Određivanjem biohemijskih parametara totalnog antioksidantnog statusa (TAS) i totalnog oksidantnog statusa (TOS) se može proceniti potencijal ispitivanih jedinjenja da izazovu oksidativni stres u plazmi oglednih životinja posle akutne primene.²⁸ Odnos TAS/TOS koji se označava kao oksidativno-stresni indeks je pokazao da ni jedan od derivata β-hidroksi-β-arilalkanskih kiselina ne izaziva veći oksidativni stres od ibuprofena. Dobijene vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa i aktivnosti enzima paraoksonaze su pokazale da ispitivani derivati β-hidroksi-β-arilalkanskih kiselina ne izazivaju veći oksidativni stres u plazmi eksperimentalnih životinja od ibuprofena.

Uticaj jedinjenja na funkciju jetre se može proceniti određivanjem koncentracije jetrenih enzima: alkalne fosfataze (ALP), aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) u hepariniziranoj plazmi.⁴ Pokazano je da u ranim fazama kliničkih studija na novim NSAIL obično nema znakova ozbiljne hepatotoksičnosti, ali se javljaju blaga povišenja koncentracije jetrenih enzima u plazmi.²⁹ Rezultati ispitivanja uticaja derivata β-hidroksi-β-arilalkanskih kiselina na funkciju jetre su pokazali da ni jedan derivat ne izaziva povećanje koncentracije jetrenih enzima u plazmi u poređenju sa ibuprofenom, a da neki derivati čak izazivaju sniženje. Jedino je kod jedinjenja sa trifluorometil grupom u *meta* položaju benzenovog prstena uočeno statistički značajno povećanje plazmatske koncentracije enzima AST u odnosu na kontrolnu grupu, dok ostala jedinjenja nisu dovela do statistički značajnog porasta koncentracije posmatranih enzima jetre u plazmi.

In vitro inhibicija COX-1 i COX-2, kao i selektivnost prema COX-2 izoformi se može odrediti primenom komercijalnih kitova koji sadrže goveđu COX-1 i humanu rekombinantnu COX-2 izoformu.³⁰ IC₅₀ vrednosti i odgovarajući indeks selektivnosti su određeni za šest odabranih derivata β-hidroksi-β-arilalkanskih kiselina. Najveću selektivnost prema inhibiciji COX-2 izoforme pokazalo je jedinjenje sa polarnom nitro grupom u *para* položaju benzenovog prstena, a najmanju jedinjenje sa trifluorometil grupom u *para* položaju.

CITIRANA RELEVANTNA LITERATURA:

1. British National Formulary, 52nd ed. London (UK): British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, **2005**, 513–522.
2. Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. *J. Annu. Rev. Pharm.* **1998**, *38*, 97-120.
3. Firke S.D., Bari S.B. Synthesis, biological evaluation and docking study of maleimide derivatives bearing benzenesulfonamide as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. *Bioorgan. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5273-5281.
4. Amir M., Kumar H., Javed S.A. Condensed bridgehead nitrogen heterocyclic system: synthesis and pharmacological activities of 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-thiadiazole derivatives of ibuprofen and biphenyl-4-yloxy acetic acid. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 2056-66.
5. Radi Z., Khan N. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract. *Exp. Tox. Path.* **2006**, *58*, 163-173.
6. Mason P.R., Walter M.F., Day C.A., Jacob R.F. A biological rationale for the cardiotoxic effects of rofecoxib in Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases, The COX-2 controversy. Springer, New York, **2007**.
7. Morales I., Guzmán-Martínez L., Cerda-Troncoso C., Farías G.A., Maccioni, R.B. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2014**, *8*(1).
8. Wang D., DuBois R. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 781-788.
9. Rainsford K.D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell. Biochem.* **2007**, *42*, 3-27.
10. Dilber S., Žižak Ž., Stanojković T., Juranić Z., Drakulić B., Juranić I. Antiproliferative activity of β-hydroxy-β-arylalkanoic acids. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 214-228.
11. Rosati O., Curini M., Marcotullio M. C., Macchiarulo A., Perfumi M., Mattioli L., Cravotto G. Synthesis, docking studies and anti-inflammatory activity of 4, 5, 6, 7-tetrahydro-2H-indazole derivatives. *Bioorgan. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3463-3473.
12. Magda A.A., Abdel-Aziz N. I., Alaa A.M., El-Azab A.S., Asiri Y.A., ElTahir K.E. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as

- selective COX-2 inhibitors: Molecular docking study. *Bioorgan. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3416-3424.
13. Rao P., Knaus E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2008**, *11*, 81s-110s.
 14. Habeeb A., Rao P., Knaus E. Design and synthesis of 4,5-diphenyl-4-isoxazolines: novel inhibitors of cyclooxygenase-2 with analgesic and anti-inflammatory activity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2921-2927.
 15. Reformatsky S. Neue Synthese zweiatomiger einbasischer Säuren aus den Ketonen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20*, 1210-1211.
 16. Ocampo R., Dolbier W.Jr. The Reformatsky reaction in organic synthesis. Recent advances. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9325-9374.
 17. Oumada F., Ràfols C., Rosés M., Bosch E. Chromatographic determination of aqueous dissociation constants of some water-insoluble nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 991-999.
 18. Liao C., Nicklaus M. Comparison of nine programs predicting pK_a values of pharmaceutical substances. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2801-28012.
 19. Benhaim D., Grushka E. Effect of n-octanol in the mobile phase on lipophilicity determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a modified silica column. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1209*, 111-119.
 20. Leucuta S.E. Selecting oral bioavailability enhancing formulations during drug discovery and development. *Expert. Opin. Drug Discov.* **2001**, *9*, 139-150.
 21. Kansy M., Avdeef A., Fischer H. Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 349-355.
 22. Yu H., Wang Q., Sun Y., Shen M., Li H., Duan Y. A new PAMPA model proposed on the basis of a synthetic phospholipid membrane. *PLoS One* **2015**, *10*, e0116502.
 23. Molero-Monfort M., Escuder-Gilabert L., Villanueva-Camanãs R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. Biopartitioning micellar chromatography: an *in vitro* technique for predicting human drug absorption. *J. Chromatogr. B* **2001**, *753*, 225-236.
 24. Beigi F., Gottschalk I., Häggglund C.L., Haneskog L., Brekkan E., Zhang Y., Österberg T., Lundahl P. Immobilized liposome and biomembrane partitioning chromatography of drugs for prediction of drug transport. *Int. J. Pharm.* **1998**, *164*, 129-137.
 25. Oja M., Maran U. Quantitative structure-permeability relationships at various pH values for acidic and basic drugs and drug-like compounds. *SAR QSAR Environ. Res.* **2015**, *26*, 701-719.
 26. Escuder-Gilabert L., Sagrado S., Villanueva Camanas R.M., Medina-Hernandez M.J. Quantitative structure relationships for ionic and non-ionic compounds in biopartitioning micellar chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **2005**, *19*, 155-168.
 27. Winter C.A., Risley E.A., Nus G.N. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **1962**, *111*, 544-547.
 28. Galati G., Tafazoli S., Sabzevari O., Chan T., O'Brien P. Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress. *Chemico-Biological Interact.* **2002**, *142*, 25-41.
 29. Boelsterli U.A. Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity: focus on nimesulide. *Drug Safety* **2002**, *25*, 633-648.
 30. Unsal-Tan O., Ozadali K., Piskin K., Balkan A. Molecular modeling, synthesis and screening of some new 4-thiazolidinone derivatives with promising selective COX-2 inhibitory activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 59-64.

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:

1. **Savić J.S.**, Dilber S.P., Marković B.D., Milenković M.T., Vladimirov S.M., Juranić I.O. Docking studies and α -substitution effects on the anti-inflammatory activity of β -hydroxy- β -arylpropionic acids. *Molecules* **2011**, *16*, 6645-6655. (M22)
2. **Savić J.**, Dilber S., Milenković M., Kotur-Stevuljević J., Vladimirov S., Brborić J. Docking studies, synthesis and biological evaluation of β -aryl- β -hydroxypropionic acids for anti-inflammatory activity. *Med. Chem.* **2017**, *13*, 186-195. (M23)
3. **Savić J.**, Dobričić V., Nikolic K., Vladimirov S., Dilber S., Brborić J. *In vitro* prediction of gastrointestinal absorption of novel β -hydroxy- β -arylalkanoic acids using PAMPA technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *100*, 36-41. (M21)
4. Dobričić V., **Savić J.**, Nikolic K., Vladimirov S., Vujić Z., Brborić J. Application of biopartitioning micellar chromatography and QSRR modeling for prediction of gastrointestinal absorption and design of novel β -hydroxy- β -arylalkanoic acids. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *100*, 280-284. (M21)

Usmena saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampana u izvodu (M32):

1. **Savić J.**, Brborić J., Dilber S., Vladimirov S. Docking studies of 3-hydroxy-3-arylpropionic acids as potentially selective COX-2 inhibitors. 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Belgrade, Serbia, 27-29 June 2013.

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u celini (M33):

1. Dobričić V., **Savić J.**, Vladimirov S., Brborić J. Prediction of gastrointestinal absorption of novel β -hydroxy- β -arylalkanoic acids by the use of biopartitioning micellar chromatography,

13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, 26-30 September, 2016.

2. Dobričić V., **Savić J.**, Nikolic K., Vladimirov S., Brborić J. *In vitro* prediction of gastrointestinal absorption of novel β -hydroxy- β -arylalkanoic acids using parallel artificial membrane permeability assay. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Belgrade, Serbia, 22-24 September, 2016.
3. **Savić J.**, Brborić J., Dilber S., Vladimirov S. Determination of logP of newly synthesized β -hydroxy- β -arylalkanoic acids using RP-HPLC method, 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, 22-26 September, 2014.

Radovi saopšteni na naučnim skupovima međunarodnog (M34) i nacionalnog značaja (M64) štampani u izvodu:

1. **Savić J.**, Milenković M., Kotur-Stevuljević J., Vujić Z., Vladimirov S., Brborić J. Oxidative stress index in rat stomach as a measure of gastric tolerability of newly synthesized anti-inflammatory compounds, 6th Congress of pharmacy in Macedonia with international participation, Ohrid, Macedonia 1-5 June, 2016.
2. **Savić J.**, Brborić J., Dilber S., Milenković M., Vladimirov S. Design, synthesis and evaluation of anti-inflammatory activity of β -aryl- β -hydroxypropanoic acids. VI Serbian Congress of Pharmacy, Belgrade, Serbia, 15-19 October, 2014.
3. **Savić J.**, Brborić J., Dilber S., Vladimirov S. Design and synthesis of β -hydroxy- β -arylpropanoic acid. 2nd Meeting of the Paul Erlich MedChem Euro-PhD Network, Ljubljana, Slovenia, 9-11 September 2012..
4. **Savić J.**, Kljajić N., Dilber S., Brborić J., Juranić I., Vladimirov S. RP-HPLC determination of dissociation constants of some novel β -hydroxy- β -arylalkanoic acids as potential anti-inflammatory agents. V Congress of Pharmacists of Serbia, Belgrade, Serbia, 13-17 October, 2010.
5. **Savić J.**, Marković B., Dilber S., Milenković M., Jovčić M., Đorđević B. Anti-inflammatory activity and docking studies of some β -hydroxy- β -arylpropanoic acids. 5th Congress of Pharmacy of Macedonia, Ohrid, 21-25 September 2011.

6. Čalija B., Cekić N., Savić S., Marković B., Savić J., Milić J. Swelling and drug release properties of naproxen-loaded Ca-alginate microparticles reinforced with chitosan oligosaccharide. 5th Congress of Pharmacy of Macedonia, Ohrid, Macedonia, 21-25 September, 2011.

4. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi imaju široku primenu u akutnoj i hroničnoj terapiji različitih oboljenja koja nastaju kao posledica inflamacije. Pored velikog broja NSAIL u upotrebi, i dalje postoji potreba za otkrivanjem novih struktura pre svega zbog neželjenih efekata poput gastrointestinalnih, hepatičnih, renalnih i kardiovaskularnih koji mogu biti vrlo ozbiljni, ali i zbog potencijalno novih indikacija kao što su Alchajmerova bolest i neke vrste kancera. Mehanizam delovanja NSAIL je inhibicija enzima ciklooksigenaze koji postoji u dve izoforme: COX-1 i COX-2. Smatra se da je COX-1 fiziološka, konstitutivna izoforma, dok je COX-2 inducibilna i patološka, tako da postoji potreba za sintezom novih, selektivnijih COX-2 inhibitora. Tvrdnje da selektivni COX-2 inhibitor ne sme u strukturi da sadrži karboksilnu grupu su opovrgnute otkrićem lumirakoksiba, trenutno najselektivnijeg COX-2 inhibitora u terapiji koji sadrži karboksilnu grupu.

U ovoj doktorskoj disertaciji je na osnovu *in silico*, *in vivo* i *in vitro* testiranja sveobuhvatno sagledan potencijal trinaest derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina kao antiinflamatornih jedinjenja, njihov efekat na gastričnu sluznicu, funkciju jetre i oksidativni stres. Sintetisano je šest poznatih derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina, čiji se podaci o sintezi mogu naći u literaturi i sedam novih derivata. Novosintetisani derivati su fizičko-hemijski okarakterisani, procenjena je gastrointestinalna apsorpcija i predložene su strukturne modifikacije za povećanje njihove gastrointestinalne apsorpcije.

Na osnovu doking studija prethodno sintetisanih β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina utvrđene su optimalne interakcije u aktivnom mestu COX i pretpostavljeni potrebni uslovi za selektivniju inhibiciju COX-2. Modifikovanom Reformatski reakcijom, koja je dodatno optimizovana povišenjem temperature, sintetisano je sedam novih derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina. Za prethodno sintetisane i novosintetisane derivate β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina određeni su fizičko-hemijski parametri korišćenjem reverzno-fazne visokoefikasne tečne hromatografije: konstante jonizacije (pK_a) i particioni koeficijenti ($\log P$). Vrednosti $\log P$ predviđene pomoću odgovarajućih računarskih programa su upoređene

sa eksperimentalno dobijenim vrednostima i izdvojen je program koji optimalno predviđa logP za ispitivane kiseline, dok je za predviđanje pKa vrednosti utvrđeno da korišćeni programi nisu adekvatni. Gastrointestinalna apsorpcija, koja može biti ograničavajući faktor za dalji razvoj farmakološki aktivnog jedinjenja, je procenjena *in vitro* korišćenjem PAMPA i BMC metode. QSPR i QSRR analizama rezultata dobijenih primenom PAMPA i BMC identifikovane su funkcionalne grupe derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina sa najvećim uticajem na gastrointestinalnu apsorpciju. Formirani su QSPR i QSRR modeli koji uspostavljaju funkcionalnu zavisnost između molekulskih deskriptora i PAMPA, odnosno BMC parametara, što pruža mogućnost predviđanja gastrointestinalne apsorpcije sličnih derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina bez eksperimentalnog testiranja. Uzimajući u obzir rezultate QSPR, QSRR i doking studija dizajnirana su jedinjenja koja bi bila potencijalno selektivniji COX-2 inhibitori sa povećanom gastrointestinalnom apsorpcijom u odnosu na ispitivane derivate. *In vivo* testiranjem derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina određene su ED₅₀ vrednosti na osnovu kojih je utvrđeno da derivat sa metil grupom u bočnom nizu pokazuje znatno bolji antiinflamatorni efekat od ibuprofena, što nije bilo u skladu sa doking predviđanjima, a da derivat sa nitro grupom ima sličan antiinflamatorni efekat kao ibuprofen, što je bilo u skladu sa rezultatima doking studija. Utvrđeno je da jedinjenje sa trifluorometil grupom u *meta* položaju pokazuje najniži antiinflamatorni efekat. Makroskopskim ispitivanjima i biohemijskim određivanjima koncentracije MDA i GSH u želudačnom tkivu je utvrđeno da je gastrična podnošljivost ispitivanih jedinjenja bolja od ibuprofena. Biohemijski parametri oksidativnog stresa koji su određivani u plazmi ogleđnih životinja su pokazali da ispitivana jedinjenja izazivaju niži oksidativni stres od ibuprofena. U poređenju sa ibuprofenom ni jedno od ispitivanih jedinjenja ne dovodi do statistički značajnog povišenja koncentracije jetrenih enzima ALT, AST i ALP. *In vitro* studijama odabranih derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina na komercijalnom COX kitu određene su IC₅₀ vrednosti za izoforme COX-1 i COX-2 i određen je indeks selektivnosti za inhibiciju COX-2. Najveći indeks selektivnosti je dobijen za jedinjenje sa nitro grupom, a najmanji za jedinjenje sa trifluorometil grupom u *para* položaju.

Zaključci dobijeni iz izvedenih *in silico*, *in vitro* i *in vivo* studija se mogu upotrebiti kao dobra osnova za dizajniranje novih derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina koji bi bili selektivniji COX-2 inhibitori sa dobrom gastrointestinalnom podnošljivošću i dobrom apsorpcijom.

5. Zaključak i predlog Komisije

Na osnovu izloženog, Komisija zaključuje da je kandidat dipl. farm. Jelena Savić uspešno realizovala postavljene ciljeve istraživanja i da rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Farmaceutске-medicinske hemije i strukturne analize.

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u 4 rada u časopisima međunarodnog značaja (2 rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), jedan rad u međunarodnom časopisu (M23)), 1 predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M32), 3 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u celini (M33), 4 saopštenja na međunarodnim (M34) i 2 saopštenja na nacionalnim skupovima (M64), štampana u izvodu.

Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju dipl. ph. Jelene Savić i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

**„Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke karakteristike
derivata β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina“**

Članovi Komisije:

1. _____
Dr sc. Jasmina Brborić, vanredni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. _____
Dr sc. Sanda Dilber, docent, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. _____
Dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. _____
Dr sc. Marina Milenković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
5. _____
Dr sc. Silva Dobrić, redovni profesor
Univerzitet odbrane u Beogradu- Medicinski fakultet
Vojnomedicinske akademije

U Beogradu, 04. 05. 2017.