

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

Odlukom Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 06.04.2017. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Valentine Radulović, pod naslovom:

„Elektrohemijsko proučavanje vareniklina i brimonidina, i razvoj elektroanalitičkih metoda za njihovo određivanje u različitim matriksima”

u sledećem sastavu:

1. Dr sc Vera Kapetanović, redovni profesor u penziji, mentor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet,
2. Dr sc Danica Agbaba, redovni profesor, mentor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet,
3. Dr sc Mara Aleksić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet,
4. Dr sc Dragan Manojlović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet,
5. Dr sc Miloš Jovanović, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Članovi Komisije pregledali su priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata diplomiranog farmaceuta Valentine Radulović pod nazivom „**Elektrohemijsko proučavanje vareniklina i brimonidina, i razvoj elektroanalitičkih metoda za njihovo određivanje u različitim matriksima**”, napisana je na 196 strana i sadrži 7 celina koje obuhvataju: (1) Uvod, (2) Cilj rada, (3) Eksperimentalni deo, (4) Rezultate i diskusiju, (5) Zaključak, (6) Literaturu i (7) Priloge. Na početku disertacije priložen je sažetak na srpskom i engleskom jeziku.

Doktorska disertacija napisana je jasnim i preglednim stilom i sadrži: 55 grafičkih prikaza (18 u uvodnom delu, 37 u rezultatima i diskusiji), 21 tabelu (1 u eksperimentalnom delu, 20 u rezultatima i diskusiji), 8 shema (u rezultatima i diskusiji) i 135 literaturnih navoda.

U **Uvodu** je sadržano 6 odeljaka od kojih svaki sadrži informacije koje su od značaja za predmet proučavanja doktorske disertacije. U njemu je dat pregled farmakoloških dejstava hinoksalinskih derivata, prvenstveno vareniklina i brimonidina. Istaknuta je važnost i dugotrajnost borbe protiv pušenja, s obzirom na ukazane štetne efekte ove zavisnosti. Samim tim ukazano je na važnost vareniklina - leka koji se primenjuje u terapiji odvikavanja od pušenja, i opisan njegov mehanizam dejstva kao parcijalnog agoniste. Takođe, opisana su farmakokinetička svojstva vareniklina. Brimonidin je predstavljen kao važan lek u terapiji glaukoma – drugog vodećeg uzroka nepovratnog gubitka vida, kao i njegov mehanizam dejstva. Opisana je fiziološka uloga očne vodice u oku i dat je prikaz farmakokinetičkog profila brimonidina. Prikazana su fizičko-hemijska svojstva vareniklina i brimonidina koja su korelirana sa hemijskom strukturom molekula. Navedeni su literaturni podaci o dosadašnjim analitičkim metodama za praćenje vareniklina i brimonidina u doziranim oblicima i biološkim uzorcima, sa postavljenim i/ili postignutim ciljevima njihovog određivanja tokom istraživanja. Detaljno su opisane voltometrijske metode primenjivane tokom rada, njihovi osnovni principi i mogućnosti primene, kao i karakteristike radnih elektroda, naročito čvrstih elektroda: elektrode od staklastog ugljenika (*glassy carbon electrode*,

GCE) i borom dopirane dijamantske elektrode (*boron doped diamond electrode*, BDDE). Prikazana je i objašnjena mogućnost ispitivanja interakcije DNK-lek primenom odgovarajuće adsorptivne transfer „*stripping*” tehnike (AdTS) voltametrijske tehnike na elektrodi viseće živine kapi (*hanging mercury drop electrode*, HMDE).

Cilj rada bio je detaljno proučiti elektrohemijsko ponašanje vareniklina i brimonidina kako bi se na osnovu dobijenog broja razmenjenih elektrona i protona i prirode procesa mogao postaviti redoks-mehanizam; zatim komparativnom analizom elektrohemijskog ponašanja definisati sličnosti i razlike u ponašanju u skladu sa hemijskim strukturama molekula vareniklina i brimonidina; postaviti nove elektroanalitičke metode za određivanje vareniklina i brimonidina u doziranim oblicima i odgovarajućim biološkim uzorcima i predložiti metodu izbora uz odgovarajuću radnu elektrodu; i ispitati potencijalnu interakciju DNK i vareniklina.

U **Eksperimentalnom delu** obuhvaćeni su: *Oprema*, korišćeni *Računarski programi*, *Hemikalije*, *Laboratorijski materijal* i *Procedure* primenjene tokom istraživanja.

Oprema obuhvata prvenstveno elektrohemijske sisteme i vrste elektroda, kao i drugu laboratorijsku opremu korišćenu tokom eksperimentalnog rada.

U delu *Računarski programi* navedeni su korišćeni programi koji podržavaju elektrohemijski sistem i programi primenjivani tokom obrade i prikaza rezultata.

Hemikalije obuhvataju supstance i reagense koji su korišćeni u eksperimentalnom radu.

U *Procedurama* opisani su postupci pripreme potrebnih rastvora: standardnih supstanci, doziranog oblika-tableta, bioloških uzoraka (plazme, očne vodice) korišćenih tokom elektrohemijskog proučavanja i kvantitativne analize. Detaljno je opisan postupak/protokol uzimanja biološkog materijala (očne vodice). Posebno su opisani postupci pripreme radnih, čvrstih elektroda (GCE i BDDE) koji se primenjuju pre voltametrijskih merenja, a koji podrazumevaju mehaničku (poliranje pomoću odgovarajućeg sredstva za tu namenu na odgovarajućoj podlozi) i elektrohemijsku pripremu. Detaljno je opisano ispitivanje adsorptivnih svojstava vareniklina na HMDE kao preduslova za ispitivanje potencijalne interakcije vareniklina i DNK odgovarajućom AdTS tehnikom.

Rezultati i Diskusija prikazani su na 98 strana, kroz sledeće odeljke: 1. *Elektrohemijsko ponašanje brimonidina i vareniklina*, 2. *Kvantitativna analiza vareniklina i brimonidina*, 3. *Interakcija DNK-vareniklin*. U svim navedenim odeljcima, prikazani su najpre detaljni rezultati rada, zatim i detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata.

Na kraju doktorske disertacije dat je **Zaključak** izveden na osnovu dobijenih rezultata istraživanja, njihove analize i tumačenja.

U poglavlju **Literatura** naveden je spisak referenci korišćenih u okviru doktorske disertacije.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati ove doktorske disertacije podeljeni su u tri celine, shodno postavljenim ciljevima.

U okviru prvog dela prikazani su rezultati elektrohemijškog proučavanja dve elektroaktivne vrste – vareniklina i brimonidina primenom polarografije jednosmerne struje (DCP) i ciklične voltometrije (CV). Polarografski rezultati dobijeni na kapljućoj živinoj elektrodi (*dropping mercury electrode*, DME) i logaritamska analiza polarografskih talasa ukazali su na broj razmenjenih elektrona i protona tokom procesa redukcije, kao i na izvesne sličnosti i razlike u elektrohemijškom ponašanju vareniklina i brimonidina. Sličnosti u ponašanju pripisane su postojanju hinoksalinskog jezgra u molekularnoj strukturi oba leka, a razlike utiču na supstituenata odnosno konjugovanog prstena na fizičko-hemijske karakteristike celokupnih molekula. Otuda je utvrđeno da se proces redukcije odvija lakše kod vareniklina (lakše prima elektrone) u odnosu na brimonidin. Ciklovoltametrijski rezultati na različitim elektrodama: HMDE (elektroda viseće živine kapi), BDDE (borom dopirana dijamantska elektroda) i GCE (elektroda od staklastog ugljenika), ukazali su na određene prirode elektrodnog procesa redukcije vareniklina i brimonidina. Kod oba leka u kiseljoj i baznoj sredini, na BDDE proces je kontrolisan difuzijom, a na GCE je utvrđeno prisustvo adsorpcije. Na HMDE u baznoj sredini dominira adsorpcija u oba slučaja, dok je u kiseljoj sredini kod vareniklina proces kontrolisan difuzijom, a kod brimonidina je prisutna adsorpcija. Step en reverzibilnosti procesa utvrđen je ne samo na osnovu dobijenih ciklovoltametrijskih rezultata, već i na

osnovu dodatnih proučavanja voltametrijom pravougaonih talasa (SWV). Broj učesnika elektrona i protona u procesima oksidacije utvrđen je ne samo na osnovu ciklovoltametrijskih rezultata na čvrstim elektrodama, već i dodatnim rezultatima dobijenim primenom diferencijalno pulsne voltametrije (DPV). Na osnovu prethodno pomenutih rezultata, postavljeni su odgovarajući redoks mehanizmi vareniklina i brimonidina. Redukcija vareniklina odvija se na C=N vezi hinoksalinskog jezgra uz učešće dva elektrona i dva protona u širokoj pH oblasti (2,0 – 11,0) do 1,4-dihidro-vareniklina i predstavlja proces čiji stepen reverzibilnosti raste sa porastom pH i najveći je u baznoj sredini. Pri $pH < 6,0$; vareniklin podleže dodatnom stepenu redukcije do 1,2,3,4-tetrahidro-vareniklina, a prvi stepen redukcije odvija se stupnjevito, pri čemu najpre dolazi do adicije jednog protona, a zatim transfera jednog elektrona po svakom stupnju uz nastajanje radikal-intermedijera. Oksidacija se odvija tek nakon redukcije, i predstavlja kvazireverzibilni proces uz učešće jednog elektrona i jednog protona, polazeći od 1,4-dihidro-vareniklina (nastalog produkta redukcije) do 2-hidroksi-1,4-dihidrovareniklina. Redukcija brimonidina predstavlja dvoelektronski proces uz učešće dva protona, na dvostrukoj C=N vezi hinoksalina, u širokom pH intervalu (2,0 – 11,0) do nastanka 1,4-dihidro-brimonidina. Polazeći od kisele sredine, stepen reverzibilnosti raste i najveći je u baznoj sredini. Dodatni stepen redukcije do 1,2,3,4-tetrahidro-brimonidina prisutan je samo u jako kiselj sredini ($pH = 2,0$ i $3,0$) takođe uz učešće dva elektrona i dva protona. Oksidacija brimonidina odvija se na dva elektroaktivna centra u molekulu, kao dva odvojena nezavisna procesa: 1) proces vezan za prethodnu redukciju i 2) proces nezavisan od prethodne redukcije. 1) Nakon što se prethodno odigrala redukcija, 1,4-dihidro-brimonidin (produkt redukcije) podleže kvazireverzibilnom procesu oksidacije uz učešće jednog elektrona i jednog protona do nastajanja 2-hidroksi-1,4-dihidrobromidina. 2) Oksidacija se odvija na sekundarnom aminu na poziciji C6 uz učešće jednog elektrona i jednog protona i predstavlja ireverzibilan proces, u kome nastaje *N-radikal* brimonidina.

U drugom delu predstavljeni su rezultati kvantitativne analize vareniklina i brimonidina u različitim matriksima primenom odgovarajućih optimizovanih elektroanalitičkih metoda. Za određivanje vareniklina u tabletama i opterećenoj plazmi razvijene su metode SWV/BDDE i SWV/GCE, zasnovane na redukcionom reverzibilnom piknu. Na osnovu: dobijenih statističkih parametara (koji ukazuju na

dovoljnu tačnost i preciznost metode, odnosno neznatan uticaj matriksa na kvalitet/intenzitet signala analita), jednostavnije i brže pripreme elektrode, bolje reproduktivnosti dobijenih rezultata u odnosu na GCE, kao metoda izbora izdvojena je SWV/BDDE. Za određivanje brimonidina u kapima za oči, razvijene su metode DPV/BDDE, SWV/BDDE i DPV/GCE, zasnovane na redukcionom reverzibilnom piku. Prema dobijenim statističkim parametrima i boljim svojstvima BDDE u odnosu na GCE (jednostavnija i brža priprema elektrode, bolja reproduktivnost rezultata), kao metoda izbora predložena je SWV/BDDE. Zasnovana na oksidacionom ireverzibilnom piku, uspešno je primenjena DPV/BDDE metoda za određivanje brimonidina u opterećenoj očnoj vodici, čime je postignuta visoka osetljivost, s obzirom na kompleksnost matriksa. Ispitivana stabilnost brimonidina pokazala je da nakon perioda zamrzavanja od dva meseca uzorak ne podleže značajnoj promeni, ali da se uzorak sa analitom može podvrgnuti samo jednom ciklusu zamrzavanja/odmrzavanja.

U trećem delu dati su rezultati ispitivanja potencijalne interakcije vareniklina i DNK, primenom adsorptivne transfer *stripping* tehnike (AdTS) na HMDE. Njima je ukazano na reverzibilnu interakciju vareniklina i DNK, tipa interkalacije. Na osnovu izračunatih odnosa vrednosti konstanti vezivanja redukovanog i oksidovanog oblika, zaključeno je da se redukovani oblik vareniklina jače vezuje za DNK od oksidovanog oblika vareniklina.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Proučavanje hinoksalinskih derivata izuzetno je aktuelno, jer je ustanovljeno da modifikacija osnovne hinoksalinske strukture rezultuje različitim biološkim aktivnostima (Pereira i sar., 2015). Elektrohemijским proučavanjem pojedinih hinoksalinskih derivata, utvrđen je korelacioni odnos između potencijala redukcije, uslovljenog molekulsom strukturom, i biološke aktivnosti (Moreno i sar., 2011). Iz korelacionog odnosa redoks potencijala, molekulske strukture i biološke aktivnosti proistekla je potreba za elektrohemijским proučavanjem hinoksalinskih derivata vareniklina i brimonidina i njihovom dodatnom karakterizacijom. Postavljanje redoks mehanizma od značaja je za objašnjenje pojedinih metaboličkih promena kojima

potencijalno podležu lekovi, vareniklin i brimonidin, s obzirom da oba predstavljaju elektroaktivne vrste. Obach i sar. (2006) utvrdili su prisustvo nekoliko metabolita u telesnim tečnostima među kojima i 2-hidroksi vareniklina u urinu primenom visokoeфикаsne tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS) i visokoeфикаsne tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom i nuklearnom magnetnom rezonancom (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry*, HPLC-MS-NMR). U tezi prikazani redoks mehanizam takođe objašnjava oksidaciju u položaju 2 i nastajanje 2-hidroksi-dihidrovareniklina kao potencijalnog metabolita, čime je jasno izražena mogućnost voltametrijske metode u predviđanju/potvrđivanju pojedinih produkata metabolizma leka. Ni i sar. (2007) ukazali su da se proces oksidacije brimonidina prvenstveno odvija na hinoksalinskom jezgru, što je u skladu sa predloženim redoks procesom u radu. U toku procesa oksidacije, odvojenog od prethodno pomenutog procesa, nastaje N-radikal brimonidina (Aleksic i sar., 2013), poput radikala pominjanih u literaturi (Golea i sar., 2012; Adenier i sar., 2004; Garido i sar.; 2004). S obzirom na izuzetnu nestabilnost i reaktivnost radikala, nastali radikal brimonidina predstavlja samo intermedijerni oblik na putu ka daljoj dimerizaciji/polimerizaciji (Adenier i sar., 2004; Compton i sar. 2011; Compton i sar., 2012).

Kako su farmakološka efikasnost i stepen bezbednosti primene leka u tesnoj vezi sa nivoom koncentracije leka u plazmi, urinu, ciljnom tkivu i u biološkim tečnostima na mestu lokalne primene, do sada su razvijene i primenjene različite analitičke metode za kvantitativnu analizu vareniklina i brimonidina u različitim vrstama uzoraka.

Visokoeфикаsnu tečnu hromatografiju (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) za određivanje vareniklin-tartarata u tabletama i za procenu stabilnosti primenom studije forsirane degradacije postavili su i uspešno primenili Kadi i sar. (2011). HPLC metodom dobijeni su granica (limit) detekcije, $LOD = 0,11 \mu\text{g ml}^{-1}$, i granica (limit) određivanja, $LOQ = 0,38 \mu\text{g ml}^{-1}$, a rezultati studije stabilnosti ukazali su na primenljivost metode (zadovoljeni kriterijumi ICH/FDA smernica) za određivanje vareniklina uprkos prisutnim degradacionim produktima, odakle sledi da se može primenjivati u industrijskim laboratorijama u rutinskoj kontroli kvaliteta. Sadržaj vareniklina u uzorcima krvne plazme nakon samo jedne primenjene oralne doze kod

populacije pušača i nepušača određivan je visokoefikasnom tečnom hromatografijom spregnutom sa masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, HPLC-MS) kako bi se utvrdila njegova farmakokinetička svojstva (maksimalna koncentracija u plazmi (C_{max}), vreme za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi (t_{max}), minimalna koncentracija u plazmi (C_{min}), poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$), uticaj doba dana aplikovanja i hrane na farmakokinetiku vareniklina) (Faessel i sar., 2006). Cilj Zhao i sar. (2011) primenom visokoefikasne tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS) bio je određivanje vareniklina u krvnoj plazmi radi: procene farmakokinetičkih osobina (maksimalna koncentracija u plazmi (C_{max}), vreme za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi (t_{max}), minimalna koncentracija u plazmi (C_{min}), poluvreme eliminacije - $t_{1/2}$), procene bezbednosti i podnošljivosti vareniklina nakon višestruke oralne primene kod starije populacije nepušača (65-85 godina). Primenom visokoefikasne tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS) i visokoefikasne tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom i nuklearnom magnetnom rezonancom (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry*, HPLC-MS-NMR), određivan je sadržaj vareniklina nakon oralne primene i utvrđeno prisustvo određenih metabolita u uzorcima seruma i krvne plazme životinja i ljudi, kao i da se najvećim delom u nepromenjenom obliku vareniklin eliminiše iz organizma putem urina (Obach i sar., 2006).

Za određivanje brimonidina u plazmi nakon lokalne primene na oku, primenjena je gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (primenjena hemijska jonizacija uz nastajanje negativnih jona) (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, GC-MS) (Acheampong i sar., 1995). Najniža izmerena koncentracija ovom metodom sa dovoljnom pouzdanošću iznosi $LOQ = 2 \text{ pg ml}^{-1}$, čime je pokazano da brimonidin dospeva u sistemsku cirkulaciju i to u merljivoj količini uprkos lokalnoj primeni. Tzovolou i sar. (2000) rukovođeni su ciljem da se primenom kapilarne elektroforeze (*Capillary Electrophoresis*, CE) za određivanje brimonidina u očnoj vodici i serumu korelira efikasnost u smanjenju intraokularnog pritiska (IOP) sa nivoom brimonidina, odakle je usledilo da optimalni period lokalne primene oznosi 6 h

(Tzovolou i sar., 2000). Karamanos i sar. (1999) primenom visokoefikasne tečne hromatografije (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) uspešno su odredili sadržaj brimonidina u serumu i očnoj vodici sa ciljem da se utvrdi vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije u njima. Shirke i sar. (2002) primenili su metodu visokoefikasne tečne hromatografije reverznih faza (*Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) za određivanje brimonidin-tartarata u doziranom obliku - kapima za oči. Radi utvrđivanja i poređenja nivoa koncentracija brimonidina u očnoj vodici nakon lokalne primene dva dozirana oblika različitih koncentracija brimonidina (0,1% i 0,15%), primenjena je visokoefikasna tečna hromatografija spregnuta sa tandem masenom spektrometrijom (*High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS). Utvrđeno je da su izmerene koncentracije brimonidina u očnoj vodici direktno proporcionalne koncentracijama ovog leka u primenjenim kapima za oči (Cantor i sar., 2008). Takamura i sar. (2015) su primenom tečne hromatografije spregnute sa tandem masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) određivali sadržaj brimonidina u očnoj vodici i staklastom telu nakon dvodnevne lokalne primene 0,1% kapi za oči u toku sedam dana pre operacije. Utvrđeni su stotruko veći nivoi koncentracija brimonidina u očnoj vodici u odnosu na staklasto telo, otuda je penetracija leka u staklasto telo slaba, ali dovoljna za ostvarivanje neuroprotektivnog efekta. Tečna hromatografija spregnuta sa tandem masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) primenjena je u svrhu kvantitativne analize brimonidina u tečnostima (u očnoj vodici $LOQ = 1 \text{ ng ml}^{-1}$) i tkivima oka (u staklastom telu najniži $LOQ = 1,6 \text{ ng ml}^{-1}$) (Jiang i sar., 2009). Za određivanje nečistoća brimonidina dobijenih nakon stres-uslova propisanih ICH smernicama, a u prisustvu brimonidin-tartarata, primenjena je metoda tečne hromatografije (*Liquid Chromatography*, LC) (Madhavi i sar., 2009).

Zasnovane na redukcionom reverzibilnom piku, za određivanje vareniklina u opterećenoj plazmi i tabletama, kao metoda izbora predložena je SWV/BDDE. Postignuti limit (granica) detekcije i limit (granica) određivanja vareniklina u plazmi iznose $LOD = 7,20 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ i $LOQ = 2,40 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (Aleksic i sar., 2012). Primenljivost predložene metode SWV/BDDE za kvantitativnu analizu brimonidina, zasnovane na redukcionom reverzibilnom piku, uspešno je proverena u doziranom obliku - kapima za

oči, pri čemu su dobijene vrednosti za tačnosti i preciznost određivanja, $recovery(\%) = 102 \%$ i $RSD = 2,14 \%$ (Radulovic i sar., 2013). Za određivanje brimonidina u opterećenom uzorku očne vodice, zasnovano na oksidacionom ireverzibilnom piku, predložena je DPV/BDDE metoda, kojom su dobijeni odgovarajući limit (granica) detekcije, $LOD = 1,94 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ i limit (granica) određivanja, $LOQ = 6,46 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Dobijene vrednosti jesu nešto veće od pominjanih u literaturi, ali s obzirom da se radi o kompleksnim biološkim uzorcima i doziranim oblicima, postignuti nivoi koncentracija su sasvim zadovoljavajući, a prednost predloženih voltametrijskih metode nad postojećim instrumentalnim ogleda se u: brzini izvođenja, ekonomičnosti, jednostavnosti pripreme uzorka, ekotoksikološkoj prihvatljivosti, neagresivnosti prema analiziranom uzorku (naknadna mogućnost analiziranja istog uzorka alternativnom metodom), mogućnosti izvođenja na sobnoj temperaturi (primenljivost i na termolabilna jedinjenja).

U literaturi se pominju različite analitičke metode za detekciju i/ili kvantifikaciju interakcije DNK-lek, kao što su: optičke (UV-Vis apsorpciona spektroskopija, fluorescentna spektroskopija, IR spektroskopija, nuklearna magnetna rezonancija (NMR), metoda zasnovana na merenju viskoziteta rastvora), ali sve aktuelnije postaju elektrohemijske (Aleksić i sar., 2014). Mogućnost primene elektrohemijske metode zasnovana je na činjenici da DNK predstavlja elektroaktivnu vrstu usled redoks svojstava purinskih/pirimidinskih baza (Paleček i sar. 1998; Teijeiro i sar., 2000; Krizkova i sar., 2008; Zanoni i sar., 2010). Za ispitivanje potencijalne interakcije jedinjenja (leka) i DNK koristi se adsorptivna transfer *stripping* tehnika (*Adsorptive Transfer Stripping Technique*, AdTS) zasnovana na svojstvu adsorpcije DNK na površini elektrode HMDE i na taj način formira se DNK-modifikovana elektroda, koja se prvenstveno primenjuje za proučavanje reverzibilnih (nekovalentnih) interakcija DNK i elektroaktivnog analita. Utvrđeno je da u slučaju hidrofobnih interakcija (tipa interkalacije) dolazi do pomeranja potencijala pika analita (leka) ka pozitivnijim vrednostima i smanjenja intenziteta struje pika leka u prisustvu DNK (Carter i sar., 1987; Carter i sar. 1989; Rodriguez i sar., 1990). S obzirom da su u literaturi interkalatori okarakterisani kao planarne aromatične strukture (Ravera i sar., 2007), očekivalo se da vareniklin koji u sebi sadrži hinoksalinsko jezgro (planarne, aromatične strukture) ostvari interakciju ovog tipa sa DNK. Kako je pokazano da je došlo do

pomeranja potencijala pika vareniklina ka pozitivnijim vrednostima i smanjenja intenziteta struje pika u prisustvu DNK, time je potvrđena interakcija tipa interkalacije. Na osnovu dobijenog odnosa konstanti površinskog vezivanja redukovanog i oksidovanog oblika vareniklina ($K_{VAR,Red}/K_{VAR,Ox}$) konstatovano je da se jače vezuje redukovani oblik vareniklina za DNK od oksidovanog (Radulović i sar., 2012).

Literatura

J.A. Pereira, A.M. Pessoa, M.N.D.S. Cordeiro, R. Fernandes, C. Prudêncio, J.P. Noronha, M. Vieira, Quinoxaline, its derivatives and applications: A State of the Art review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 97, 664-672.

E. Moreno, S. Pérez-Silanes, S. Gouravaram, A. Macharam, S. Ancizu, E. Torres, I. Aldana, A. Monge, P.W. Crawford, 1,4-*N*-oxide quinoxaline-2-carboxamide: Cyclic voltammetry and relationship between electrochemical behavior, structure and antituberculosis activity. *Electrochim. Acta* 2011, 56, 3270-3275.

R.S. Obach, A.E. Reed-Hagen, S.S. Krueger, B.J. Obach, T.N. O'Connell, K.S. Zandi, S.A. Miller, J.W. Coe, Metabolism and disposition of varenicline, a selective $\alpha_4\beta_2$ acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. *Drug Metab. Disp.* 2006, 34, 121-130.

J. Ni, J. Rowe, T. Heidelbaugh, S. Sinha, A. Acheampong, Characterization of benzimidazole and conjugative metabolites of brimonidine in vitro and in rats in vivo using on-line H/D exchange LC-MS/MS and stable isotope tracer techniques, *Xenobiotica* 2007, 37, 205-220.

M.M. Aleksic, V. Radulovic, D. Agbaba, V. Kapetanovic, An extensive study of electrochemical behavior of brimonidine and its determination at glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* 2013, 106, 75-81.

D.A. Golea, V.C. Diculescu, L. Tugulea, A.M. Oliveira-Brett, Proteasome inhibitor anticancer drug bortezomib redox behaviour at a glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 2012, 24, 1915-1921.

A. Adenier, M.M. Chehimi, I. Gallardo, J. Pinson, N. Vila, Electrochemical oxidation of aliphatic amines and their attachment to carbon and metal surfaces. *Langmuir* 2004, 20, 8243-8253.

J.M.P.J. Garrido, C. Delerue-Matos, F. Borges, T.R.A. Macedo, A.M. Oliveira-Brett, Voltammetric oxidation of drugs of abuse III. Heroin and metabolites. *Electroanalysis* 2004, 16, 1497-1502.

R.G. Compton, C.E. Banks, *Understanding Voltammetry, 2nd ed.*, Imperial College Press, Oxford 2011.

R.G. Compton, C. Batchelor-McAuley, E.J.F. Dickinson, *Understanding Voltammetry: Problems and Solutions*, Imperial College Press, Oxford 2012.

A.A. Kadi, M.S. Mohamed, M.G. Kassem, I.A. Darwish, A validated stability-indicating HPLC method for determination of varenicline in its bulk and tablets. *Chem. Cent. J.* 2011, 5, 30-36.

H.M. Faessel, B.J. Smith, M.A. Gibbs, J.S. Gobey, D.J. Clark, A.H. Burstein, Single-dose pharmacokinetics of varenicline, a selective nicotinic receptor partial agonist, in healthy smokers and nonsmokers. *J. Clin. Pharmacol.* 2006, 46, 991-998.

Q. Zhao, E. Schwam, T. Fullerton, M. O'Gorman, A. Burstein, Pharmacokinetics, safety and tolerability following multiple oral doses of varenicline under various titration schedules in elderly nonsmokers. *J. Clin. Pharm.* 2011, 51, 492-501.

R.S. Obach, A.E. Reed-Hagen, S.S. Krueger, B.J. Obach, T.N. O'Connell, K.S. Zandi, S.A. Miller, J.W. Coe, Metabolism and disposition of varenicline, a selective $\alpha_4\beta_2$

acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. *Drug Metab. Disp.* 2006, *34*, 121-130.

A. Acheampong, D.D.S. Tang-Liu, Measurement of brimonidine concentrations in human plasma by a highly sensitive gas chromatography/mass spectrometric assay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995, *13*, 995-1002.

D.N. Tzovolou, F. Lamari, E.K. Mela, S.P. Gartaganis, N.K. Karamanos, Capillary electrophoretic analysis of brimonidine in aqueous humor of the eye and blood sera and relation of its levels with intraocular pressure. *Biomed. Chromatogr.* 2000, *14*, 301-305.

S. Jiang, A.K. Chappa, J.W. Proksch, A rapid and sensitive LC/MS/MS assay for the quantitation of brimonidine in ocular fluids and tissues. *J. Chromatogr. B* 2009, *877*, 107-114.

Y. Takamura, T. Tomomatsu, T. Matsumura, Y. Takihara, S. Kozai, S. Arimura, S. Yokota, M. Inatani, Vitreous and aqueous concentrations of brimonidine following topical application brimonidine tartrate 0,1% ophthalmic solution in humans. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2015, *31*, 282-285.

N.K. Karamanos, F. Lamari, J. Katsimpris, S. Gartaganis, Development of an HPLC method for determining the α_2 -adrenergic receptor agonist brimonidine in blood serum and aqueous humor of the eye. *Biomed. Chromatogr.* 1999, *13*, 86-88.

R.R. Shirke, N.Pai, RP-HPLC determination of brimonidine tartrate in brimonidine tartrate eye drops. *Indian Drugs* 2002, *39*, 484-486.

L.B. Cantor, D. WuDunn, Y. Catoira-Boyle, C.W. Yung, Absorption of brimonidine 0,1% and 0,15% ophthalmic solutions in the aqueous humor of cataract patients. *J. Glaucoma* 2008, *17*, 529-534.

A. Madhavi, A. Naidu, D.V. Subba Rao, P. Srinivasu, Development and validation of a new LC method for analysis of brimonidine tartrate and related compounds. *Chromatographia* 2009, *69*, 1413-1419.

M.M. Aleksić, V. Radulović, N. Lijeskić, V. Kapetanović, Electrochemical response and determination of varenicline at boron doped diamond, glassy carbon and hanging mercury electrodes. *Curr. Anal. Chem.* 2012, *8*, 133-142.

V. Radulovic, M. Aleksic, D. Agbaba, V. Kapetanovic, An Electroanalytical approach to brimonidine at boron doped diamond electrode based on its extensive voltammetric study. *Electroanalysis* 2013, *25*, 230-236.

M.M. Aleksić, V. Kapetanović, An Overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA – Drug interactions. *Acta. Chim. Slov.* 2014, *61*, 555-573.

E. Paleček, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang, Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors & Bioelectronics* 1998, *13*, 621-628.

C. Teijeiro, E. de la Red, D. Marín, Electrochemical analysis of anthramycin: hydrolysis, DNA-interactions and quantitative determination. *Electroanalysis* 2000, *12*, 963-968.

S. Krizkova, I. Fabrik, V. Adam, J. Kukacka, R. Prusa, G.J. Chavis, L. Trnkova, J. Strnadel, V. Horak, R. Kizek, Utilizing of adsorptive transfer stripping technique Brdicka reaction for determination of metallothioneins level in melanoma cells, blood serum and tissues. *Sensors* 2008, *8*, 3106-3122.

M.V.B. Zanoni, E.I. Rogers, C. Hardacre, R.G. Compton, The electrochemical reduction of the purines guanine and adenine at platinum electrodes in several room temperature ionic liquids. *Anal. Chim. Acta* 2010, *659*, 115-121.

M.T. Carter, A.J. Bard, Voltammetric studies of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)cobalt(III) with DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, *109*, 7528-7530.

M.T. Carter, M. Rodriguez, A.J. Bard, Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, *111*, 8901-8911.

M. Rodriguez, A.J. Bard, Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA. Voltammetric and electrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of tris(2,2'-bipyridine)osmium(II) with DNA. *Anal. Chem.* 1990, *62*, 2658-2662.

M. Ravera, G. Bagni, M. Mascini, D. Osella, DNA-metallodrugs interactions signaled by electrochemical biosensors: An Overview. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2007, *2007*:91078.

V. Radulović, M.M. Aleksić, V. Kapetanović, An electrochemical study of the adsorptive behaviour of varenicline and its interaction with DNA. *J. Serb. Chem. Soc.* 2012, *77*, 1409-1422.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima

1. M.M. Aleksić, V. Radulović, N. Lijeskić, V. Kapetanović, Electrochemical response and determination of varenicline at boron doped diamond, glassy carbon and hanging mercury electrodes. *Current Analytical Chemistry* 2012, *8*, 133-142. (M23)

2. **V. Radulović**, M.M. Aleksić, V. Kapetanović, An electrochemical study of the adsorptive behaviour of varenicline and its interaction with DNA. Journal of the Serbian Chemical Society 2012, 77, 1409-1422. (M23)
3. **V. Radulovic**, M. Aleksic, D. Agbaba, V. Kapetanovic, An Electroanalytical approach to brimonidine at boron doped diamond electrode based on its extensive voltammetric study. Electroanalysis 2013, 25, 230-236. (M21)
4. Mara M. Aleksic, **Valentina Radulovic**, Danica Agbaba, Vera Kapetanovic, An extensive study of electrochemical behavior of brimonidine and its determination at glassy carbon electrode. Electrochimica Acta 2013, 106, 75-81. (M21)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. **V. Radulović**, V. Kapetanović, M.M. Aleksić, Electrochemical response and determination of novel nicotinic receptor agonist – varenicline at hanging mercury electrode. 16th European Conference on Analytical Chemistry, 11-15 September 2011, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p. 225.
2. **V. Radulović**, M.M. Aleksić, N. Lijeskić, V. Kapetanović, Electrochemical determination of varenicline at boron doped diamond and glassy carbon electrodes. 16th European Conference on Analytical Chemistry, 11-15 September 2011, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p. 226.
3. **V. Radulović**, M.M. Aleksić, V. Kapetanović, Voltammetric determination of varenicline and its interaction with DNA. 14th International Conference on Electroanalysis, 3-7 June 2012, Portorož, Slovenia, Book of Abstracts, p. 178.
4. M.M. Aleksić, **V. Radulović**, V. Kapetanović, The comparative study of electrochemical behaviour of varenicline and brimonidine at BDD and GC electrodes. 14th International Conference on Electroanalysis, 3-7 June 2012, Portorož, Slovenia, Book of Abstracts, p. 223.

5. **V. Radulović**, M.M. Aleksić, V. Kapetanović, An electroanalytical approach of two quinoxaline derivatives based on voltammetric study. 14th International Conference on Electroanalysis, 3-7 June 2012, Portorož, Slovenia, Book of Abstracts, p. 272.

E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu detaljne analize doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Valentine Radulović, članovi Komisije smatraju da prikazani rezultati, diskusija i zaključci predstavljaju značajan doprinos: u predviđanju i objašnjavanju potencijalnih metaboličkih redoks promena lekova vareniklina i brimonidina putem postavljenih redoks mehanizama; u kvantitativnoj analizi vareniklina i brimonidina u različitim matriksima (doziranim oblicima, biološkim uzorcima) primenom postavljenih jednostavnih, brzih, ekonomičnih specifičnih/selektivnih voltametrijskih metoda zadovoljavajućih granica određivanja; pri utvrđivanju potencijalno genotoksičnih karakteristika leka (redukovanog/oksidovanog oblika vareniklina). Otuda je doprinos značajan sa više aspekata: u definisanju izvesnih farmakokinetičkih (metaboličkih) karakteristika lekova vareniklina i brimonidina, primeni elektroanalitičkih metoda u rutinskoj kontroli kvaliteta doziranog oblika kao i tokom studija stabilnosti, preliminarnom ispitivanju i utvrđivanju potencijalne interakcije DNK i leka-vareniklina što otvara mogućnosti za ispitivanje/utvrđivanje eventualne primene vareniklina u druge terapijske svrhe.

Uvidom u postignute rezultate završene doktorske disertacije, konstatuje se da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potvrđeno objavljenim rezultatima disertacije putem četiri rada u međunarodnim časopisima.

Na osnovu svega izloženog, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati Izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom: **„Elektrohemijsko proučavanje vareniklina i brimonidina, i razvoj elektroanalitičkih metoda za njihovo određivanje u različitim matriksima”**, kandidata dipl. farm. Valentine Radulović.

U Beogradu, 05.05.2017.

Članovi Komisije:

Dr sc Vera Kapetanović, redovni profesor (u penziji),
mentor, predsednik Komisije,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc Danica Agbaba, redovni profesor, mentor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc Mara Aleksić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc Dragan Manojlović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Dr sc Miloš Jovanović, redovni profesor (u penziji),
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet