

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

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 17. juna 2021., na osnovu člana 94. Statuta Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, doneta je odluka o imenovanju komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom: „Hemometrijski podržana karakterizacija hromatografskih sistema modifikovanih β -ciklodekstrinom sa odabranim model supstancama“ kandidata mag. farm. Nevene Đajić.

Izrada doktorske disertacije na predloženu temu je odobrena na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, koja je održana 10. septembra 2019.

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Ana Protić, vanredni profesor – mentor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Beograd, Srbija
2. Dr sc. Biljana Otašević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Beograd, Srbija
3. Prof. dr Mira Zečević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Beograd, Srbija
4. Dr sc. Jelena Golubović, naučni saradnik, Viši naučnik – bioanalitičar, Fidelta Ltd., Zagreb, Hrvatska

je pročitala završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi sledeći Izveštaj.

Beograd, 7. jul 2021.

vanredni profesor Ana Protić, mentor

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mag. farm. Nevene Đajić (rođene Maljurić) pod nazivom „**Hemometrijski podržana karakterizacija hromatografskih sistema modifikovanih β -ciklodekstrinom sa odabranim model supstancama**“ napisana je na 140 stranica, sadrži 33 slike i 13 tabela. Sastoji se od sledećih poglavlja: Uvod, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura, Prilozi i Biografija.

Uvodni deo rada je napisan na 35 stranica i sastoji se iz 7 manjih celina, odnosno potpoglavlja. U prvom potpoglavlju uvoda dat je istorijski pregled otkrića i razvoja ciklodekstrina (CD), opis strukture različitih vrsta CD-a, kao i opis načina formiranja inkluzionih kompleksa sa različitim supstancama. Zatim je dat kratak pregled CD-modifikovanih RP-HPLC sistema, odnosno ono što je o njima bilo poznato do sada, uz poseban osvrt na karakterizaciju inkluzionih kompleksa sa CD-om u rastvoru, u pogledu određivanja stehiometrije, konstanti stabilnosti kompleksa i termodinamičkih parametara kompleksiranja. Dat je pregled analitičkih tehnika koje se koriste u karakterizaciji CD-skih kompleksa u rastvoru. U narednom potpoglavlju uvoda su predstavljeni modeli kvantitativnog odnosa strukture i retencionog ponašanja (eng. *Quantitative Structure-Retention Relationship* – QSRR), sa postupcima za izračunavanje i selektovanje ulaznih promenljivih, kao i tehnikama za građenje modela. Od dostupnih tehnika za građenje QSRR modela, veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Networks* – ANN) su detaljno objašnjene u posebnom potpoglavlju uvodnog dela disertacije. Zatim je predstavljen koncept ekološki prihvatljivih metoda tačne hromatografije, kao i dostupni alati za procenu ekološke prihvatljivosti. U poslednjem potpoglavlju uvoda prikazane su fizičko-hemijske karakteristike risperidona, olanzapina i njihovih srodnih supstanci, koji su odabrani kao model supstance i literaturno dostupne metode za njihovo određivanje.

Poglavlje **Ciljevi** napisano je na jednoj stranici i u njemu su kratko sažeta četiri cilja doktorske disertacije. Prvi cilj podrazumeva karakterizaciju inkluzionih kompleksa koji se formiraju između odabranih model supstanci i β -CD-a u pogledu određivanja stehiometrijskog odnosa, *in silico* predviđanja strukture formiranih inkluzionih kompleksa i njihove potvrde nuklearnom magnetno-rezonantnom spektroskopijom (eng. *Nuclear Magnetic Resonance* – NMR). Drugi cilj obuhvata uspostavljanje QSRR modela uz primenu ANN u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Ovaj model je omogućio predviđanje retencionog ponašanja risperidona, olanzapina i njihovih srodnih supstanci, i bio primenjen u razvoju ekološki prihvatljivih metoda tačne hromatografije za razdvajanje ispitivanih model supstanci. Osim toga, cilj je da model bude primenjen i za izračunavanje konstanti stabilnosti formiranih inkluzionih kompleksa i termodinamičkih parametara kompleksiranja. Treći cilj predstavlja ispitivanje potencijala primene detektora naelektrisanja u aerosolu (eng. *Charged Aerosol Detector* – CAD) u ispitivanju hromatografske retencije i određivanju konstanti stabilnosti kompleksa. Četvrti cilj podrazumeva uspostavljanje proširenog QSRR-ANN modela, koji je poslužio za identifikaciju strukturnih karakteristika od značaja za retenciju u ovakvoj vrsti

hromatografskog sistema, kao i procenu doprinosa količine adsorbovanog β -CD-a na stacionarnu fazu prediktivnim mogućnostima modela.

Eksperimentalni deo je napisan na 13 stranica. Sadrži pregled svih referentnih standardnih supstanci, rastvarača, reagenasa, opreme i računarskih programa koji su korišćeni u istraživanju. Detaljno su opisane procedure pripreme uzoraka za svaki segment izvođenja eksperimenata i dati su hromatografski uslovi, kao i uslovi za izvođenje eksperimenata iz domena masene spektrometrije i NMR. Takođe, prikazano je izračunavanje molekulskih deskriptora i deskriptora koji opisuju nastale inkluzione komplekse.

Poglavlje **Rezultati i diskusija** je napisano na 66 stranica. Sadrži prikaz svih rezultata dobijenih sprovedenim eksperimentima i diskusiju o dobijenim rezultatima. Detaljan prikaz ovog poglavlja dat je u narednom delu izveštaja.

Poglavlje **Zaključak** je prikazano na 4 stranice. Sadrži sve zaključke u skladu sa postavljenim ciljevima doktorske disertacije.

Poglavlje **Literatura** je napisano na 12 stranica i sadrži 200 citiranih literaturnih referenci.

Poglavlje **Prilozi** sadrži listu skraćenica i spisak publikacija koje su obuhvaćene doktorskom disertacijom.

U poglavlju **Biografija** data je kratka narativna biografija kandidata.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U prvom delu doktorske disertacije izvršena je karakterizacija inkluzionih kompleksa formiranih između β -CD-a i odabranih model supstanci. Prvo je masenom spektrometrijom sa elektrosprej jonizacijom (eng. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* – ESI-MS) utvrđen 1:1 stehiometrijski odnos u kompleksu, a zatim je sprovedena molekulska doking studija kojom su predviđene najverovatnije strukture formiranih kompleksa. U službi *in silico* ispitivanja kompleksiranja su korišćene model supstance u dominantnoj konformaciji pri ispitivanom opsegu pH vrednosti od 2,00 do 5,00, sa najmanjim ukupnim sadržajem energije. Energija vezivanja u nastalom inkluzionom kompleksu, kao i razlika u toploti formiranog inkluzionog kompleksa i slobodnog molekula su korišćene za izbor najstabilnije strukture inkluzionog kompleksa. Na osnovu dobijenih struktura izračunati su određeni parametri, koji su označeni kao deskriptori inkluzionih kompleksa i koji su korišćeni u QSRR-ANN modelovanju. Kako bi se potvrdila validnost *in silico* pristupa, sprovedena je NMR studija i određene su $^1\text{H} - ^1\text{H}$ dipolarne interakcije između β -CD-a i ispitivanih model supstanci primenom 2D ROESY metode. ROESY kružni signali (eng. *Cross-peaks*) su ukazali na isti način vezivanja β -CD-a i model supstanci, kao i doking studija, gde lipofilniji deo strukture ulazi u CD-sku šupljinu. U slučaju risperidonove srodne supstance 2 i srodne supstance 3, doking studija je dala prioritet drugačijem načinu vezivanja, na osnovu najmanjeg sadržaja energije. Međutim, ukoliko se posmatraju konformacije kompleksa sa neznatno višim sadržajem energije, uočava se njihova komplementarnost sa strukturama, koje su dobijene izvođenjem NMR eksperimenata.

U drugom delu doktorske disertacije uspostavljen je QSRR-ANN model u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu sa ciljem opisivanja retencionog ponašanja i razvoja metoda za razdvajanje odabranih model supstanci. Primena β -CD-a kao aditiva mobilne faze omogućila je skraćenje retencionog vremena ispitivanih supstanci, što je uslovalo smanjenje utroška acetonitrila. Korišćenjem ove strategije razvoja metode zajedno sa njenom optimizacijom uz pomoć QSRR-ANN modela, razvijene su ekološki prihvatljive RP-HPLC metode za razdvajanje risperidona i srodnih supstanci, kao i olanzapina i srodnih supstanci. Prilikom građenja QSRR-ANN modela kao ulazne promenljive su korišćeni molekularni deskriptori, deskriptori inkluzionih kompleksa i eksperimentalni parametri. Preliminarni izbor molekularnih deskriptora je izvršen na osnovu Abrahamove teorije linearne korelacije solvatohromnih energija solvatacije (eng. *Linear Solvation Energy Relationship* – LSER).

Eksperimentalni parametri su varirani prema planu eksperimenata koji je dobijen primenom metodologije eksperimentalnog dizajna, odnosno centralnog kompozicionog dizajna (eng. *Central Composite Design* – CCD). Utvrđeno je da su udeo acetonitrila kao organskog modifikatora mobilne faze (% v/v), pH vrednost vodenog dela mobilne faze, koncentracija β -CD-a u vodenom delu mobilne faze (mM) i temperatura kolone ($^{\circ}$ C) imali statistički značajan uticaj na retenciono ponašanje odabranih model supstanci u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Iz tog razloga su oni varirani u odgovarajućim opsezima, kako bi se na adekvatan način opisao eksperimentalni prostor.

Prilikom građenja QSRR-ANN modela nisu svi deskriptori odjednom uključeni u model, već je primenjen pristup postepenog uključivanja deskriptora. ANN sa najboljim performansama je dobijena kada su istovremeno uključeni molekularni deskriptori, deskriptori koji opisuju inkluzione komplekse i eksperimentalni hromatografski parametri. Ulazne promenljive modela su bile polarizabilnost (eng. *Polarizability* – POL), zapremina nedostupna rastvaraču (eng. *Solvent-excluded Volume* – SEV), logaritam oktanol-voda particionog koeficijenta (logP), dipol-dipol energija (eng. *dipole-dipole energy* – DEN), energija vezivanja u kompleksu (eng. *Energy of Binding* – BE), elektrostatička energija (eng. *Electrostatic Energy* – EE) i nevezana energija sistema (eng. *Unbound system's Energy* – UE), udeo acetonitrila u mobilnoj fazi (% v/v), koncentracija β -CD u vodenom delu mobilne faze (mM), pH vrednost vodenog dela mobilne faze i temperatura kolone ($^{\circ}$ C). Najboljom se pokazala višeslojna nerekurentna mreža sa 11-8-1 topologijom, trenirana algoritmom povratnog prolaska greške. Kvadratni koren srednje vrednosti sume kvadrata greške (eng. *Root Mean Square Error* – RMSE) za trening, validacioni i test set podataka je redom iznosio 0,2954, 0,3633 i 0,4864. Koeficijent determinacije (R^2) između eksperimentalno dobijenih i ANN predviđenih vrednosti retencionog faktora je iznosio 0,9962 za trening, 0,9927 za validacioni i 0,9829 za test set podataka. Visoke vrednosti R^2 i niske vrednosti RMSE za trening i validacioni set podataka ukazuju na dobre deskriptivne sposobnosti modela, dok visoke vrednosti R^2 i niske vrednosti RMSE test seta podataka reflektuju dobre prediktivne sposobnosti modela. Utvrđeno je i odlično slaganje između vrednosti retencionog faktora dobijenih eksperimentalno i onih koji su predviđeni ANN modelom. Dobijeni rezultati su ukazali na činjenicu da hromatografsko ponašanje nije moguće adekvatno opisati uz pomoć samo molekularnih deskriptora ili samo deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse. Prema tome, obe grupe deskriptora treba da budu uključene u model sa jednakom važnošću, ukoliko se predviđa retencija u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Postavljen QSRR-ANN model

uspešno je primenjen u optimizaciji hromatografskih uslova za razdvajanje odabranih model supstanci putem metodologije površine odgovora (eng. *Response surface methodology*). Cilj optimizacije je bio da se postigne optimalno razdvajanje između supstanci koji sledstveno eluiraju, kao i da vrednost retencionog faktora za olanzapin i njegovu srodnu supstancu C bude iznad 1 jer su ove supstance pokazale tendenciju neretencionog ponašanja. Takođe, srodna supstanca B se kao veoma lipofilna dugo zadržavala na stacionarnoj fazi, te je cilj bio da se eluira u što kraćem vremenskom periodu. Nakon detaljne analize površina odgovora koje pokrivaju opseg pH vrednosti od 2,00 do 5,00 i udela acetonitrila u mobilnoj fazi od 15% do 25% (v/v), optimalna kombinacija faktora koja dovodi do zadovoljenja postavljenih ciljeva obuhvatala je: 22% acetonitrila u mobilnoj fazi (v/v), pH vodenog dela mobilne faze 5,00, temperatura kolone 35 °C i koncentracija β -CD-a u vodenom delu mobilne faze od 10 mM. Optimalni uslovi koji su doveli do adekvatnog razdvajanja risperiodona i srodnih supstanci su 17,5 % acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze 2,40, temperatura kolone 35 °C i koncentracija β -CD u mobilnoj fazi od 10 mM. Kako temperatura kolone i koncentracija β -CD u mobilnoj fazi nisu imali značajan uticaj na postavljene ciljeve optimizacije, izabrano je da budu držani na srednjem nivou.

Sprovedeni su i eksperimenti bez dodatka β -CD-a u mobilnu fazu. Uočeno je evidentno skraćenje retencionog vremena svih model supstanci sa dodatkom β -CD u mobilnu fazu, čime je potvrđen uticaj kompleksiranja na retenciju. Kraće vreme trajanja hromatografske analize je omogućilo manju potrošnju acetonitrila, zbog čega se modifikacija RP-HPLC metoda CD-om koristi kao strategija za razvoj ekološki prihvatljivih metoda. Razvijene metode su validirane i njihova ekološka prihvatljivost je ispitana izračunavanjem analitičkog ekološkog skora, koji je iznosio 92/100.

QSRR-ANN model je uspešno predviđao promene vrednosti retencionog faktora sa promenama koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi, u definisanom eksperimentalnom prostoru. Prema tome, ispitana je njegova primenjivost u izračunavanju konstanti stabilnosti kompleksa i termodinamičkih parametara kompleksiranja. Međutim, očekivani pad vrednosti retencionog faktora sa porastom koncentracije β -CD nije uvek pri svim eksperimentalnim uslovima, što je bio osnovni preduslov da bi konstante stabilnosti mogle da se izračunaju. U slučaju risperidona i njegovih srodnih supstanci, konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa su uspešno izračunate pri udelu acetonitrila u mobilnoj fazi od 15% (v/v) u celom opsegu ispitivanih pH vrednosti (2,00-5,00). Kada je koncentracija acetonitrila iznosila 20% (v/v) bilo je moguće izračunati konstante stabilnosti kompleksa pri pH vrednosti vodene faze od 2,0. Slično retenciono ponašanje pokazuju i inkluzioni kompleksi koje risperidonove srodne supstance formiraju sa β -CD-om. Ovaj fenomen se može dovesti u vezu sa strukturom formiranih inkluzionih kompleksa. Međutim, treba uzeti u obzir i mogućnost formiranja sekundarnih interakcija između slobodnih silanolnih grupa stacionarne faze i dela strukture ispitivane supstance koji ostaje izvan šupljine β -CD-a, odnosno sa veoma kompleksnim retencionim mehanizmima u ovim hromatografskim sistemima. Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa koji se formiraju između olanzapina i β -CD-a su izračunate samo ukoliko je udeo acetonitrila 15% (v/v) i pH vrednost vodene faze 2,0. Konstante stabilnosti kompleksa između srodne supstance B i β -CD-a su uspešno izračunate u celokupnom ispitivanom opsegu pH vrednosti, ukoliko je udeo acetonitrila 15% (v/v) i pri pH vrednostima 2,0 i 3,5 ukoliko je udeo acetonitrila 20% (v/v). Konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa

srodne supstance C i β -CD-a su uspešno izračunate ukoliko je pH vrednost podešena na 2,0 ili 3,5, nezavisno od udela acetonitrila u mobilnoj fazi. Do sada su u literaturi pronađene studije u kojima povećanjem udela β -CD u mobilnoj fazi isključivo dolazi do smanjenja retencionog faktora ispitivanih supstanci. Ovo je logično, jer se povećanjem udela β -CD povećava i stvaranje inkluzionih kompleksa koji su rastvorljiviji u vodi od ispitivanih supstanci, što posledično dovodi do smanjenja vremena zadržavanja u hromatografskom sistemu. Shodno tome, u drugim studijama uvek je bilo moguće izračunati konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa. Kako bi kandidatkinja dokazala da se ovakvo nepredviđeno ponašanje supstanci u β -CD-modifikovanim sistemima zaista dešava, i da nije posledica greške predviđanja QSRR-ANN modela, u okviru svog istraživanja sprovedla je HPLC eksperimenti u okviru istog eksperimentalnog prostora. Promena vrednosti retencionog faktora je ispitivana na tri različite pH vrednosti vodenog dela mobilne faze (2,0 3,5 i 5,0) i pri udelu acetonitrila od 15% do 20% (v/v). HPLC eksperimenti su potvrdili rezultate dobijene iz QSRR-ANN modela. Formiranje inkluzionih kompleksa i njihove stehiometrije je potvrđeno masenom spektrometrijom. Međutim, u cilju potvrde da navedena metodologija dobro predviđa konstante stabilnosti kompleksa, one su određene i UV/Vis spektrofotometrijom, na osnovu razlika u apsorbciji ispitivane supstance pre i posle kompleksiranja. Vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa dobijene primenom UV/Vis spektrofotometrije pokazuju isti trend ponašanja kao i vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa koje su dobijene HPLC eksperimentima i QSRR-ANN modelom.

U trećem delu doktorske disertacije, β -CD nije dodat u rastvor mobilne faze, već samo u uzorak, kako bi se postigao brz dinamički ekvilibrijum. U ovakvom sistemu supstanca se raspedeljuje između inkluzionog kompleksa i slobodne forme, te je fokus stavljen na ispitivanje razlike u retenciji inkluzionog kompleksa sa β -CD i slobodne supstance. Za detekciju je korišćen CAD, kao univerzalni detektor koji može odrediti i supstance koji nemaju UV/VIS apsorpcione karakteristike. Prilikom analiziranja smeše srodne supstance B i β -CD-a sa mobilnom fazom koja sadrži 50% (v/v) acetonitrila, na CAD hromatogramu se uočavaju tri pika, od kojih prvi potiče od slobodnog β -CD-a, zatim sledi pik inkluzionog kompleksa praćen pikom slobodne srodne supstance B. Konstante stabilnosti kompleksa su izračunate kao konstante ekvilibrijuma između kompleksirane, slobodne supstance i β -CD-a. Porast koncentracije β -CD-a trebao bi da doprinosi formiranju inkluzionog kompleksa, dok istovremeno opada koncentracija slobodne supstance, koja sa β -CD-om formira inkluzioni kompleks. Izračunavanja konstante stabilnosti kompleksa su bazirana na jednačini sličnoj *Benesi-Hildebrand* jednačini, koja koreliše uočene razlike u relativnom intenzitetu kompleksa (ΔI_r) sa inicijalnim ukupnim koncentracijama ispitivane supstance i β -CD-a. Ukoliko se primenjuje CAD, intenziteti kompleksa su izraženi kao površine pikova koji odgovaraju formiranim inkluzionim kompleksima. Koncentracija srodne supstance B u uzorku je bila konstanta, dok je koncentracija β -CD-a postepeno povećavana kako bi se postigao odnos između srodne supstance B i β -CD-a u opsegu od 1:5 do 1:45. Zatim su konstruisani grafici zavisnosti $1/\Delta I_r$ od $1/[\beta\text{-CD}]$, koji su omogućili izračunavanje konstanti stabilnosti kompleksa deljenjem odsečka na ordinati i nagiba dobijenih linearnih pravih. Korišćenjem dobijenog grafika zavisnosti $1/\Delta I_r$ od $1/[\beta\text{-CD}]$, izračunata je konstanta stabilnosti inkluzionog kompleksa koji se formira između srodne supstance B i β -CD-a, i ona je iznosila $449,81 \text{ M}^{-1}$.

Kod supstanci gde pik koji potiče od slobodne supstance nije uspešno razdvojen od pika koji potiče od inkluzionog kompleksa, pa površina pika inkluzionog kompleksa ne može lako da se odredi, predložen je modifikovan pristup za izračunavanje konstanti stabilnosti kompleksa, čija validnost je potvrđena na ispitivanoj model smeši.

U poslednjem delu doktorske disertacije razvijen je prošireni QSRR-ANN model, gde je korišćen opsežan set molekulskih deskriptora, umesto oslanjanja isključivo na LSER teoriju. Zadržani su molekulski deskriptori, koji su se u prethodnom delu istraživanja pokazali kao značajni (POL, SEV, logP i DEN), i obogaćeni su velikim brojem teorijskih deskriptora. Nakon ispitivanja međusobne korelacije, 279 molekulskih deskriptora je preostalo za dalju analizu. Uzajamno nekorelisanih 279 molekulskih deskriptora, zajedno sa četiri molekulska deskriptora, koja su se pokazala značajnim u prethodnom istraživanju (POL, SEV, logP i DEN), tri deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse (BE, EE i UE) i eksperimentalni parametri su podvrgnuti multiploj linearnoj regresiji, kako bi se identifikovali oni sa najznačajnijim doprinosom retencionom faktoru. Ulazne promenljive koje su bile u značajnoj korelaciji sa retencionim faktorom su svi eksperimentalni parametri, UE kao deskriptor koji opisuje inkluzione komplekse i navedeni molekulski deskriptori: Mor04m (*signal 04/weighted by mass*), Mor04v (*signal 04/weighted by van der Waals volume*), RDF120m (*radial distribution function – 120/weighted by mass*), RDF075m (*radial distribution function – 075/weighted by mass*), CATS2D_08_PL (*CATS2D positive-lipophilic at lag 08*) i SsssNH+ (*sum of sssNH+ E-states*). Navedene ulazne promenljive su korišćene za posledično formiranje QSRR-ANN modela.

Činjenica da koncentracija β -CD u mobilnoj fazi i adsorbovanog na površinu stacionarne faze (β -CD_A) u velikoj meri korelišu onemogućila je njihovu zajedničku upotrebu kao ulaznih promenljivih istog modela. Pored prepoznate korelacije ove dve promenljive, njihovo simultano uključivanje u model može da ugrozi interpretaciju njihovih pojedinačnih uticaja na retenciju u kompleksnom sistemu kao što je β -CD-modifikovan RP-HPLC. Prema tome, konstruisane su dve neuronske mreže. Višeslojna nerekurentna mreža sa 11-7-1 topologijom je pokazala najbolje performanse, nezavisno od toga da li je kao ulazna promenljiva korišćena koncentracija β -CD-a u mobilnoj fazi ili β -CD_A. Kod prve ANN dobijene RMSE vrednosti iznose 0,3884, 0,2666 i 0,3401 za trening, validacioni i test set podataka, redom. Dobijene su i visoke R² vrednosti (0,9912 za trening, 0,9959 za validacioni i 0,9953 za test set podataka). Druga mreža, sa β -CD_A umesto koncentracijom β -CD-a u mobilnoj fazi, takođe pokazuje zadovoljavajuće prediktivne i deskriptivne sposobnosti, izražene kroz RMSE vrednosti od 0,4863 za trening, 0,4545 za validacioni i 0,3620 za test set podataka i R² vrednosti koje iznose 0,9873 za trening, 0,9883 za validacioni i 0,9852 za test set podataka. Otkrivanje strukturnih karakteristika koje imaju najizraženiji uticaj na retenciju u ovakvoj vrsti hromatografskih sistema je jedan od glavnih ciljeva sprovedenog istraživanja, pa su svi molekulski deskriptori uključeni u model detaljno analizirani. ANN sa koncentracijom β -CD-a kao ulaznom promenljivom, koja pokazuje malo bolje performanse u odnosu na drugu ANN, primenjena je kako bi se procenili individualni uticaji svakog od deskriptora, uzimajući u obzir razliku između najveće i najmanje vrednosti retencionog faktora u ispitivanom opsegu vrednosti deskriptora. Izračunati odnosi najveće i najmanje vrednosti retencionog faktora u ispitivanom opsegu vrednosti molekuskog deskriptora su iznosili: 11,18 za RDF075m, 7,10

za UE, 3,70 za Mor04v i 3,29 CATS2D_08_PL. Deskriptori koji imaju najveće vrednosti izračunatog odnosa su najznačajniji za retenciono ponašanje odabranih supstanci u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu.

C. UPOREDNA ANALIZA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Pretragom literature se dolazi do podataka da autori neretko pretpostavljaju 1:1 stehiometriju između molekula „gosta“ i CD-a, što može imati posledice po tačnost određivanje stabilnosti formiranih kompleksa [1, 2]. Od eksperimentalnih pristupa, u određivanju stehiometrije inkluzionih kompleksa najčešće se koristi ^1H NMR, odnosno njena metoda kontinuiranih varijacija [3, 4]. Takođe, ista metoda korišćenjem fluorescentne spektroskopije može da se pronađe u literaturi [5, 6]. Iako se karakterišu kao pouzdane, ove metode ne predstavljaju prvi izbor prilikom određivanja stehiometrije, jer zahtevaju velike količine supstance za pripremu uzoraka, a njihova dugotrajnost izvođenja je takođe jedan od nedostataka. ESI-MS predstavlja metodu izbora za određivanje stehiometrije kompleksa, jer omogućava transfer jona iz rastvora u gasnu fazu, uz očuvanje nekovalentnih interakcija kao vodećih interakcija koje učestvuju u kompleksiranju [7, 8]. Na osnovu prednosti i mana tehnika za određivanje stehiometrije, koje su navedene u literaturi, u ovoj disertaciji izbor je sveden na ESI-MS. Što se tiče određivanja strukture formiranih kompleksa, NMR spektroskopija nadmašuje druge metode za ispitivanje fenomena kompleksiranja, zbog svoje sposobnosti da istovremeno posmatra sve molekule u kompleksu na atomskom nivou i u literaturi se najčešće sreće [9-12]. Još jedna od karakteristika NMR tehnike, koja joj ide u prilog kada je u pitanju ispitivanje inkluzionih kompleksa, ogleda se u korišćenju rastvarača, čime mogu da se verodostojno ilustruju uslovi mobilne faze u tečnoj hromatografiji [10]. Pored eksperimentalnog pristupa, struktura kompleksa može da se predviđa i različitim *in silico* pristupima, među kojima se izdvaja studija molekuskog dokinga. Iako studija molekuskog dokinga nije prvi put upotrebljena za predviđanje najverovatnije strukture formiranog kompleksa, ovo je prvi put da su na osnovu sprovedene doking studije izračunate karakteristike kompleksa, koje su iskorišćene kao njihovi deskriptori u QSRR-ANN modelovanju. Uobičajeni pristup modelovanju retencije u RP-HPLC sistemima obuhvata primenu metodologije eksperimentalnog dizajna [13, 14] ili QSRR modelovanje gde se promena vrednosti retencionog faktora posmatra u zavisnosti od molekulskih deskriptora ili eksperimentalnih parametara [15, 16]. Međutim, modelovanje retencije u CD-modifikovanim RP-HPLC sistemima zahteva malo drugačiji pristup zbog toga što je retencija pod sinergističkim uticajem kompleksirajućeg i adsorpcionog ekvilibrijuma. Prema tome, u ovom istraživanju je prvi put predložen QSRR model, koji pored molekulskih deskriptora i eksperimentalnih parametara sadrži i deskriptore koji opisuju formirane inkluzione komplekse, kao ulazne promenljive modela. Razvijeni QSRR-ANN model je omogućio razvoj ekološki prihvatljivih β -CD-modifikovanih RP-HPLC metoda za razdvajanje risperiodna i srodnih supstanci, kao i olanzapina i srodnih supstanci. Primena β -CD-a kao aditiva mobilne faze je već prepoznata u literaturi kao strategija za razvoj ekološki prihvatljivih RP-HPLC metoda, jer stvaranjem inkluzionih kompleksa dolazi do skraćenja retencionog vremena i posledičnog smanjenja potrošnje organskog rastvarača, ali bez gubitka efikasnosti razdvajanja [17-19]. Takođe, razvoj metoda uz pomoć QSRR-ANN modela dodatno doprinosi konceptu održivosti.

Konstanta stabilnosti formiranih inkluzionih kompleksa je jedna od njihovih najznačajnijih karakteristika i može se određivati primenom različitih analitičkih tehnika [20]. HPLC je moćna tehnika za određivanje stehiometrije i konstante stabilnosti kompleksa, ali često zahteva dugotrajnu pripremu uzoraka, kao i strogu kontrolu eksperimentalnih uslova, kako bi se obezbedila reproduktivnost podataka [21-23]. Hromatografsko određivanje konstante stabilnosti je bazirano na postulatu da sa porastom koncentracije CD-a u mobilnoj fazi dolazi do smanjenja vrednosti retencionog faktora, i upravo ta razlika u retencionom vremenu je mera kompleksiranja [4, 24]. Ovaj pristup je poželjan i iz razloga što omogućava istovremeno određivanje termodinamičkih parametara kompleksiranja, ukoliko se eksperimenti izvode na različitim temperaturama [25].

Kako bi se u potpunosti ostvarili benefiti od potencijala CD-a da grade inkluzione komplekse, neophodne su tehnike koje će tačno i u kratkom vremenskom roku odrediti konstante stabilnosti kompleksa, kao indikatore jačine vezivanja molekula „gosta“ i CD-ske šupljine. Većina analitičkih tehnika koje se koriste u karakterizaciji i ispitivanju stabilnosti inkluzionih kompleksa su vremenski zahtevne, pa postoji potreba za razvojem brzih i ekonomski isplativih metoda, pogotovo metoda koje će koristiti *in silico* pristupe. Kao odgovor na ovaj prepoznati zahtev, u doktorskoj disertaciji je ispitana mogućnost primene QSRR-ANN modela u predviđanju promene retencionog faktora, kao indikatora kompleksiranja, i posledičnom izračunavanju konstanti stabilnosti i termodinamičkih parametara kompleksiranja. U literaturi mogu da se pronađu različiti matematički modeli koji su namenjeni predviđanju retencionog i kompleksirajućeg ponašanja u sistemima koji su modifikovani CD-om [26-31]. Međutim, nijedna dosadašnja studija nije prikazala značaj deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse u opisivanju retencije, niti uključila iste u građenje modela. Dodatno, u ovoj doktorskoj disertaciji prvi put je ovakav tip QSRR-ANN modela primenjen u izračunavanju konstanti stabilnosti kompleksa.

Takođe, ovo je prvo istraživanje u kome je CAD iskorišćen u tumačenju retencije slobodnih supstanci, slobodnog β -CD-a i formiranih inkluzionih kompleksa. Modifikacija pristupa koji je u literaturi korišćen za određivanje konstanti stabilnosti kompleksa primenom masene spektrometrije [7] je u ovom istraživanju primenjen za izračunavanje konstanti stabilnosti uz pomoć CAD-a.

Proces formiranja inkluzionog kompleksa sa CD je veoma brz i praćen disocijacijom do postizanja ekvilibrijuma. Prema tome, CD ostvaruje interakcije sa supstancom, ali i sa rastvaračima i ostalim komponentama mobilne faze, kao i sa površinom stacionarne faze [12, 32, 33]. Posledično, retencija u ovakvom hromatografskom sistemu je rezultat distribucije supstance između CD rastvorenog u mobilnoj fazi, slobodnog CD, formiranog inkluzionog kompleksa koji može da se adsorbuje na stacionarnu fazu, kao i same stacionarne faze. Iz tog razloga, prethodno razvijen model je dopunjen promenljivom koja predstavlja količinu adsorbovanog β -CD-a na stacionarnu fazu, kako bi se procenio njen uticaj na prediktivne performanse modela. Dodatno, set molekulskih deskriptora je obogaćen velikim brojem teorijskih deskriptora, kako bi se ispitale sve osobine, koje mogu biti od značaja za formiranje inkluzionog kompleksa sa β -CD-om i posledično retenciono ponašanje, što do sada nije pronađeno u literaturi.

Hipoteze i teorijska osnova ove doktorske disertacije postavljene su na osnovu opsežnog pregleda dostupne literature. Primenom odgovarajućih teorijskih i eksperimentalnih metoda dobijeni su rezultati čiji se značaj se ogleda u naučnom doprinosu izučavanju β -CD-modifikovanih RP-HPLC sistema.

1. Uekama K, Hirayama F, Ikeda K, Inaba K. Utilization of cyclodextrin complexation for separation of E, A, and B prostaglandins by ion-exchange liquid chromatography. *J Pharm Sci.* 1977;66(5):706-10.
2. Armstrong DW, Nome F, Spino LA, Golden TD. Efficient detection and evaluation of cyclodextrin multiple complex formation. *J Am Chem Soc.* 1986;108(7):1418-21.
3. Danel C, Azaroual N, Brunel A, Lannoy D, Vermeersch G, Odou P, et al. Study of the complexation of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with cyclodextrin hosts using affinity capillary electrophoresis and ^1H NMR spectroscopy. *J Chromatogr A.* 2008;1215(1):185-93.
4. Moraes CM, Abrami P, de Paula E, Braga AF, Fraceto LF. Study of the interaction between S (-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm.* 2007;331(1):99-106.
5. Tablet C, Matei I, Hillebrand M. The determination of the stoichiometry of cyclodextrin inclusion complexes by spectral methods: possibilities and limitations. *Stoichiometry and Research–The Importance of Quantity in Biomedicine.* 2012:47-76.
6. Condict L, Hung A, Ashton J, Kasapis S. High-temperature binding parameters and molecular dynamics of 4-hydroxybenzoic acid and β -casein complexes, determined via the method of continuous variation and fluorescence spectroscopy. *Food Hydrocolloids.* 2021;114:106567.
7. Dotsikas Y, Loukas YL. Efficient determination and evaluation of model cyclodextrin complex binding constants by electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003;14(10):1123-9.
8. Gabelica V, Galic N, De Pauw E. On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002;13(8):946-53.
9. Waibel B, Scheiber J, Meier C, Hammitzsch M, Baumann K, Scriba GK, et al. Comparison of cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes in the absence and presence of urea by means of capillary electrophoresis, nuclear magnetic resonance and molecular modeling. *Wiley Online Library;* 2007.
10. Krait S, Salgado A, Chankvetadze B, Gago F, Scriba GK. Investigation of the complexation between cyclodextrins and medetomidine enantiomers by capillary electrophoresis, NMR spectroscopy and molecular modeling. *J Chromatogr A.* 2018;1567:198-210.
11. Salgado A, Chankvetadze B. Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy for the understanding of enantiomer separation mechanisms in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 2016;1467:95-144.
12. Dodziuk H. *Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications:* John Wiley & Sons; 2006.
13. Imam SS, Aqil M, Akhtar M, Sultana Y, Ali A. Optimization of mobile phase by 3 2-mixture design for the validation and quantification of risperidone in bulk and pharmaceutical formulations using RP-HPLC. *Analytical Methods.* 2014;6(1):282-8.
14. Cutroneo P, Beljean M, Luu RPT, Siouffi A-M. Optimization of the separation of some psychotropic drugs and their respective metabolites by liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(2):333-40.

15. Golubović J, Protić A, Zečević M, Otašević B, Mikić M, Živanović L. Quantitative structure–retention relationships of azole antifungal agents in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Talanta*. 2012;100:329-37.
16. Golubović JB, Protić AD, Zečević ML, Otašević BM. Quantitative structure retention relationship modeling in liquid chromatography method for separation of candesartan cilexetil and its degradation products. *Chemometrics Intellig Lab Syst*. 2015;140:92-101.
17. Armenta S, Garrigues S, De la Guardia M. Green analytical chemistry. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2008;27(6):497-511.
18. Płotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupska M, Górecki T, Namieśnik J. Green chromatography. *J Chromatogr A*. 2013;1307:1-20.
19. González-Ruiz V, León AG, Olives AI, Martín MA, Menéndez JC. Eco-friendly liquid chromatographic separations based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives. *Green Chemistry*. 2011;13(1):115-26.
20. Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;101:238-50.
21. Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*. 2004;39(9):1033-46.
22. Ceborska M, Szwed K, Asztemborska M, Wszelaka-Rylik M, Kicińska E, Suwińska K. Study of β -cyclodextrin inclusion complexes with volatile molecules geraniol and α -terpineol enantiomers in solid state and in solution. *Chem Phys Lett*. 2015;641:44-50.
23. Asztemborska M, Bielejewska A, Duszczyk K, Sybilska D. Comparative study on camphor enantiomers behavior under the conditions of gas–liquid chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography systems modified with α - and β -cyclodextrins. *J Chromatogr A*. 2000;874(1):73-80.
24. Ravelet C, Geze A, Villet A, Grosset C, Ravel A, Wouessidjewe D, et al. Chromatographic determination of the association constants between nimesulide and native and modified β -cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;29(3):425-30.
25. Rozou S, Michaleas S, Antoniadou-Vyza E. Study of structural features and thermodynamic parameters, determining the chromatographic behaviour of drug–cyclodextrin complexes. *J Chromatogr A*. 2005;1087(1):86-94.
26. Pérez-Garrido A, Helguera AM, Cordeiro MND, Escudero AG. QSPR modelling with the topological substructural molecular design approach: β -cyclodextrin complexation. *J Pharm Sci*. 2009;98(12):4557-76.
27. Ahmadi P, Ghasemi JB. 3D-QSAR and docking studies of the stability constants of different guest molecules with beta-cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2014;79(3-4):401-13.
28. Steffen A, Apostolakis J. On the ease of predicting the thermodynamic properties of beta-cyclodextrin inclusion complexes. *Chemistry Central Journal*. 2007;1(1):1-11.
29. Ghasemi J, Saaidpour S. QSPR modeling of stability constants of diverse 15-crown-5 ethers complexes using best multiple linear regression. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2008;60(3-4):339-51.
30. Ghasemi JB, Rofouei M, Salahinejad M. A quantitative structure–property relationships study of the stability constant of crown ethers by molecular modelling: new descriptors for lariat effect. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2011;70(1-2):37-47.
31. Šoškić M, Porobić I. Interactions of Indole Derivatives with β -Cyclodextrin: A Quantitative Structure-Property Relationship Study. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154339.
32. Szente L, Szemán J, Sohajda T. Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;130:347-65.
33. Jin Z-Y. *Cyclodextrin chemistry: Preparation and application*: World Scientific; 2013.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima

- 1) **Djajić N**, Petković M, Zečević M, Otašević B, Malenović A, Holzgrabe U, Protić A. A comprehensive study on retention of selected model substances in β -cyclodextrin-modified high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2021;1645:462120
 - a. **Naziv časopisa:** Journal of Chromatography A
 - b. **Impakt faktor (2020):** 4,759
 - c. **Kategorija:** M21
 - d. **Rang časopisa u oblasti *Chemistry Analytical*:** 17/83

- 2) **Dajić N**, Otašević B, Malenović A, Zečević M, Holzgrabe U, Protić A. Corona Charged Aerosol Detector in studying retention and β -cyclodextrin complex stability using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113711
 - a. **Naziv časopisa:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
 - b. **Impakt faktor (2020) =** 3,935
 - c. **Kategorija:** M21
 - d. **Rang časopisa u oblasti *Chemistry Analytical*:** 24/83

- 3) **Maljurić N**, Otašević B, Malenović A, Zečević M, Protić A. Quantitative structure retention relationship modeling as potential tool in chromatographic determination of stability constants and thermodynamic parameters of β -cyclodextrin complexation process. *Journal of Chromatography A*. 2020;1619:460971
 - a. **Naziv časopisa:** Journal of Chromatography A
 - b. **Impakt faktor:** 4,759
 - c. **Kategorija:** M21
 - d. **Rang časopisa u oblasti *Chemistry Analytical*:** 17/83

- 4) **Maljurić N**, Golubović J, Otašević B, Zečević M, Protić A. Quantitative structure–retention relationship modeling of selected antipsychotics and their impurities in green liquid chromatography using cyclodextrin mobile phases. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2018;410(10):2533-50
 - a. **Naziv časopisa:** Analytical and bioanalytical chemistry
 - b. **Impakt faktor (2020):** 4,142
 - c. **Kategorija:** M21
 - d. **Rang časopisa u oblasti *Chemistry Analytical*:** 22/83

Spisak radova saopštenih na naučnim skupovima i objavljenih u izvodu ili u celosti

- 1) **Nevena Maljurić**, Biljana Otašević, Jovana Krmar, Mira Zečević, Ana Protić. Insight in Retention Mechanisms of Basic Analytes in β -Cyclodextrin Modified HPLC. 13th

Mass Spectrometry School in Biotechnology and Medicine (MSBM). Dubrovnik, Croatia. 7-13. Jul 2019. (M34)

- 2) **Nevena Maljurić**, Biljana Otašević, Jovana Krmar, Mira Zečević, Ana Protić. Primena HPLC metode u određivanju konstanti stabilnosti kompleksa β -ciklodekstrina sa odabranim antipsihoticima. VII kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 10-14. Oktobar 2018. (M62)
- 3) **Nevena Maljurić**, Miloš Petković, Jovana Krmar, Biljana Otašević, Mira Zečević, Ana Protić. Molecular docking studies and ¹H NMR spectroscopy in β -cyclodextrin complexes structure elucidation. 2nd International Symposium on Advances in Pharmaceutical Analysis – APA 2018, Lille, France. 12-13. Jul 2018. (M34)
- 4) **Nevena Maljurić**, Ana Protić, Biljana Otašević, Jelena Golubović, Mira Zečević, Jovana Krmar. Stoichiometry and stability constants determination of β -cyclodextrin – drug complexes. 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC-2017). Prague, Czech Republic. 18-22. Jun 2017. (M34)
- 5) **Nevena Maljurić**, Ana Protić, Biljana Otašević, Jelena Golubović, Jovana Krmar, Mira Zečević. Investigation of chromatographic behavior of aripiprazole and its five impurities. 6th Congress of Pharmacy in Macedonia with international participation, Ohrid, Macedonia, 1-5. Jun 2016. (M33)

E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati doktorske disertacije obuhvataju uspešno sprovedenu karakterizaciju inkluzionih kompleksa koji se formiraju između risperidona, olanzapina i njihovih srodnih supstanci i β -CD-a. Prvi put je uspostavljen QSRR-ANN model koji kvantifikuje zavisnost retencije od molekulskih deskriptora, deskriptora inkluzionih kompleksa i eksperimentalnih parametara u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Dobijeni model primenjen je za opisivanje retencionog ponašanja model supstanci i ukazao je na doprinos uključivanja deskriptora koji opisuju inkluzione komplekse. Praktični doprinos QSRR-ANN modela se ogleda u optimizaciji metoda za razdvajanje risperidona i njegovih srodnih supstanci, kao i olanzapina i njegovih srodnih supstanci. Risperidon, olanzapin i njihove srodne supstance su izabrane na osnovu prethodno razvijenih metoda za određivanje, koje su zahtevale relativno velike udele organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Uopšteno, sve izabrane supstance su baznog karaktera, sa diverzitetom u pogledu lipofilnosti i sposobnosti jonizacije. Na ovaj način je pokriven odgovarajući hemijski prostor, a pružen je i odgovor na hromatografski i analitički izazov. Ostvarena je i značajna ekološka prihvatljivost razvijenih β -CD-modifikovanih RP-HPLC metoda.

Veliki značaj razvijenog QSRR-ANN modela ogleda su u njegovoj primenjivosti u predviđanju promene vrednosti retencionog faktora do koje dolazi usled kompleksiranja i izračunavanju konstanti stabilnosti i termodinamičkih parametara kompleksiranja na osnovu predviđene promene vrednosti retencionog faktora. Na ovaj način je redukovana potrošnja rastvarača i hemikalija, što ima dvostruke prednosti, kako u pogledu finansijskih ušteda, tako i uticaja na okolinu. Sprovedeni eksperimenti, kao i QSRR-ANN modelovanje su po prvi put

doveli u pitanje poznat postulat da sa porastom koncentracije β -CD-a u mobilnoj fazi dolazi do skraćenja retencionog vremena. Pokazano je da ispitivane supstance nemaju ovaj trend ponašanja pri svim ispitivanim eksperimentalnim uslovima. Slaganje rezultata dobijenih HPLC eksperimentima sa rezultatima dobijenim QSRR-ANN predviđanjem je podstaklo upotrebu *in silico* alata u određivanju konstanti stabilnosti kompleksa, smanjujući potrebu za opsežnim i vremenski zahtevnim eksperimentima. Takođe, uočeno neočekivano hromatografsko ponašanje navelo je autore da preispitaju pogodnost promene u retencionom faktoru kao parametra za izračunavanje konstanti stabilnosti inkluzionih kompleksa u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Rezultati su pokazali da konstante stabilnosti i termodinamički parametri kompleksiranja mogu da se izračunavaju uz pomoć korišćenih formula, ali ne pri širokom spektru eksperimentalnih uslova. U zavisnosti od strukture ispitivane supstance interakcije koje vode kompleksiranju nisu uvek sposobne da nadvladaju ostale interakcije u sistemu, pa reticioni faktor nije uvek idealan fizičko-hemijski parametar za procenu stabilnosti inkluzionih kompleksa.

Dodatno, omogućeno je razdvajanje pika slobodne supstance i inkluzionog kompleksa na primeru olanzapinu srodne supstance B kada se β -CD dodaje samo u uzorak, a ne i u mobilnu fazu. Primena CAD-a dovela je do uspešne detekcije ovih pikova i izračunavanja konstanti stabilnosti korišćenjem *Benesi-Hildebrand* jednačine. Međutim, ukoliko se slobodna supstanca i formirani kompleks eluiraju na istom retencionom vremenu, konstante stabilnosti kompleksa su izračunate pomoću novo-predloženog metodološkog pristupa, čija primenljivost je potvrđena na ispitivanoj model smeši.

U poslednjem delu istraživanja razvijen je prošireni QSRR-ANN model, koji je pokazao izuzetne performanse i omogućio otkrivanje za retenciju najznačajnijih faktora u β -CD-modifikovanom RP-HPLC sistemu. Izražen uticaj molekulske strukture na retenciju je najbolje opisan kroz RDF075m, UE, Mor04v i CATS2D_08_PL deskriptore. Ovi deskriptori su najviše udruženi sa promenama u retencionom faktoru, a među njima prednost se daje RDF075m deskriptoru. Takođe je pokazano da je uticaj koncentracije β -CD i udela acetonitrila u mobilnoj fazi na retenciju izraženiji kod supstanci sa većim vrednostima RDF075m deskriptora. Detaljna analiza značajnih deskriptora je ukazala na značajnu ulogu molekulskih dimenzija i oblika, kao i lipofilnosti u retencionom ponašanju. Dodatno, retencija je takođe vođena veličinom i lipofilnošću upotrebljenog CD-a, jer od njegovih karakteristika zavisi i strukturno uklapanje molekula koji sa CD-om formiraju komplekse.

Primena *in silico* alata, kao što je molekulski doking u određivanju strukture inkluzionih kompleksa i QSRR-ANN modeli u predviđanju retencionog ponašanja i izračunavanju konstanti stabilnosti kompleksa, doprinosi generalnom konceptu održivosti u RP-HPLC-u, jer dovodi do ušteda u vremenu, novcu i resursima. Rezultati ovog istraživanja daju preporuke za korišćenje dostupnih *in silico* pristupa u karakterizaciji β -CD-modifikovanih RP-HPLC sistema. Iako se proces kompleksiranja sa CD-inima godinama unazad istražuje, nije jednostavno prevideti koji tačno deo strukture određene supstance će se inkorporirati u šupljinu CD-a, kao i koliki je afinitet određenog molekula za vezivanje sa CD-om. Iz tog razloga ostaju određena pitanja bez odgovora, ali istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji svakako doprinose boljem razumevanju ovih sistema, dopunjuju prethodna znanja i otvaraju nove mogućnosti primene.

F. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu izveštaja iz programa *iThenticate* registrovano je 9% poklapanja sa 76 izvora. U svim izvorima je stepen podudarnosti iznosio < 1%, osim u jednom izvoru gde je ovaj stepen sličnosti iznosio 2% i tri izvora sa kojima je stepen sličnosti iznosio 1%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je tzv. opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata istraživanja kandidatkinje, koji su proistekli iz disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj iz programa *iThenticate* ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

G. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom podrazumeva detaljnu karakterizaciju β -CD-modifikovanog RP-HPLC sistema. Posredstvom veštačkih neuronskih mreža razvijeni su modeli, koji su omogućili predviđanje retencionog ponašanja odabranih model supstanci, kao i izračunavanje konstante stabilnosti inkluzionih kompleksa i pridruženih termodinamičkih parametara kompleksiranja. Zadati istraživački ciljevi su ispunjeni i dobijeni rezultati su doprineli boljem razumevanju ovakvog hromatografskog sistema. Rezultati ove disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Analitika lekova. Rad kandidata je odgovorio istraživačkim zahtevima, što je potkrepljeno sa **4 naučna rada** koji su objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima **M21 kategorije**, **4 saopštenja** sa međunarodnih skupova, štampana u izvodu ili celosti (kategorije **M33** i **M34**), kao i **1 saopštenja** sa nacionalnog skupa (kategorija **M62**). Uzevši u obzir prethodno navedeno, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji na temu „Hemometrijski podržana karakterizacija hromatografskih sistema modifikovanih β -ciklodekstrinom sa odabranim model supstancama“ i kandidatu mag. farm. Neveni Đajić odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije

kandidata mag. farm. Nevene Đajić

Dr sc. Ana Protić, vanredni profesor – mentor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
Katedra za analitiku lekova, Beograd, Srbija

Dr sc. Biljana Otašević, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
Katedra za analitiku lekova, Beograd, Srbija

Prof. dr Mira Zečević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
Katedra za analitiku lekova, Beograd, Srbija

Dr sc. Jelena Golubović, naučni saradnik,
Viši naučnik – bioanalitičar, Fidelta Ltd., Zagreb,
Hrvatska

Beograd, 7. jul 2021.