

NASTAVNO – NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 02.04.2015. godine, predložena je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata diplomiranog farmaceuta Marije Popović, pod nazivom: **„Uticaj surfaktanata na protolitičke ravnoteže i izomerizaciju ACE inhibitora“**.

Izrada ove doktorske disertacije odobrena je na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, održanoj 18.02.2014. godine.

Komisija u sastavu:

Dr Gordana Popović, redovni profesor (mentor, predsednik komisije),

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Danica Agbaba, redovni profesor (mentor),

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Katarina Nikolić, docent,

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Živoslav Tešić, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Dr Slavica Filipić, docent,

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

pročitala je završenu doktorsku disertaciju, pregledala priloženu dokumentaciju i podnosi sledeći

IZVEŠTAJ

1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija diplomiranog farmaceuta Marije Popović, pod nazivom „Uticaj surfaktanata na protolitičke ravnoteže i izomerizaciju ACE inhibitora“ napisana je na 156 strana, kucanog teksta formata A4, fontom *Times New Roman*, veličine 12 i proredom 1,5.

Sastoji se od sledećih poglavlja: 1. Uvod, 2. Cilj rada, 3. Eksperimentalni deo, 4. Rezultati i diskusija, 5. Zaključak, 6. Literatura, 7. Prilog i 8. Biografija.

Na početku doktorske disertacije prikazan je rezime na srpskom i engleskom jeziku. Disertacija sadrži 50 slika, 26 tabela, 235 citiranih literaturnih navoda.

Poglavlje **Uvod** sastoji se od pet potpoglavlja u kojima su prikazane hemijske strukture, jonizujući centri i diastereoizomerija devet inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE) (kaptopril, cilazapril, enalapril, fosinopril, lizinopril, perindopril, ramipril, kvinapril, zofenopril). Objašnjen je značaj poznavanja pK_a vrednosti lekova. Prikazana su dosadašnja ispitivanja izomerizacije lekova sa prolinskom peptidnom vezom primenom reverzno fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC). Istaknut je značaj ispitivanja fizičko-hemijskih osobina lekova u micelarnim rastvorima surfaktanata. Predstavljen je pregled metoda molekuskog modeliranja koje se primenjuju za ispitivanje fizičko-hemijskih osobina farmakološki aktivnih supstanci.

U poglavlju **Cilj rada**, navedeni su ciljevi ove doktorske disertacije: određivanje pK_a vrednosti devet ACE inhibitora, bez i u prisustvu surfaktanata različitog naelektrisanja, ispitivanje uticaja surfaktanata na ravnotežu geometrijske izomerizacije ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom, teorijsko ispitivanje hidrofobnosti (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera primenom *Density functional theory* (DFT).

U poglavlju **Eksperimentalni deo**, navedena je korišćena oprema, hemikalije i kompjuterski programi. Opisani su postupci potenciometrijskog određivanja pK_a vrednosti, ispitivanja uticaja surfaktanata na izomerizaciju ACE inhibitora primenom RP-HPLC, kao i optimizacija strukture parova diastereoizomera i izračunavanje molekuskih deskriptora.

U Poglavlju **Rezultati i diskusija** prikazani su rezultati ispitivanja protolitičkih ravnoteža i izomerizacije ACE inhibitora dobijeni bez i u prisustvu surfaktanata, procenjen je uticaj micela na protolitičke ravnoteže i izomerizaciju ispitanih ACE inhibitora i pretpostavljene su interakcije ovih jedinjenja sa micelama. Upoređene su vrednosti *Connolly Solvent-Excluded Volume* (SEV) deskriptora (*Z*)- i (*E*)-izomera enalapрила i ramipрила i ustanovljeno slaganje teorijske studije sa eksperimentalnim podacima.

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

Poglavlje **Literatura** sadrži 235 bibliografskih navoda.

U poglavlju **Prilog** prikazane su tabele sa eksperimentalnim podacima, grafici dobijeni u Hyperquad programu, hromatogrami i strukture optimizovanih jedinjenja.

2. Opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji su proučene protolitičke ravnoteže i (Z)/(E)-izomerizacija ACE inhibitora u micelarnim rastvorima surfaktanata različitog naelektrisanja, anjonskog (natrijum-dodecilsulfat, SDS), katjonskog (cetiltrimetilamonijum-bromid, CTAB) i nejonskog (4-oktilfenolpolietoksilat, TX 100). ACE inhibitori su lekovi koji inhibiraju angiotenzin konvertujući enzim i koriste se u terapiji hipertenzije, srčane insuficijencije i dijabetičke defropatije. Zajednička strukturna karakteristika ispitanih ACE inhibitora je prisustvo amidske i slobodne karboksilne grupe. Karboksilna grupa u jonizovanom obliku ostvaruje interakciju sa protonovanom amino grupom arginina u katalitičkom centru enzima. U molekulima ACE inhibitora, pored karboksilne prisutne su i druge jonizujuće grupe sulfhidrilna, primarna i sekundarna amino grupa. Zbog prisustva većeg broja jonizujućih grupa, u vodenoj sredini ACE inhibitori učestvuju u složenim pH-zavisnim ravnotežama koje se kvantitativno mogu okarakterisati pK_a vrednostima. Pored toga, ACE inhibitori sa prolinskom peptidnom vezom, koja ispoljava delimičan karakter dvostruke veze, podležu (Z)/(E)-diastereoizomeriji.

U **prvom delu** doktorske disertacije ispitan je uticaj micelarnih rastvora surfaktanata, kao pojednostavljenih sistema biomembrana, na protolitičke ravnoteže devet ACE inhibitora (kaptopril, cilazapril, enalapril, fosinopril, lizinopril, perindopril, ramipril, kvinapril, zofenopril). S obzirom na prisutne jonizujuće grupe, ispitivani ACE inhibitori predstavljaju kiseline ili amfolite. Fosinopril i zofenopril sadrže po jedan kiseli centar – karboksilnu grupu. Kaptopril sadrži dva kisela centra, karboksilnu i sulfhidridnu grupu. Enalapril, perindopril, cilazapril, kvinapril i ramipril, sa jednim kiselim (karboksilna grupa) i jednim baznim centrom (sekundarna amino grupa) predstavljaju amfolite. Lizinopril je složen amfolit sa četiri jonizujuća centra, dve karboksilne grupe i dve amino grupe (primarna i sekundarna). pK_a vrednosti ispitivanih ACE inhibitora određene su potenciometrijski, bez i u prisustvu surfaktanata. Određivanja su izvedena na temperaturi 25°C i konstantnoj jonskoj sili rastvora 0,1 M (NaCl). Koncentracija surfaktanata (10^{-2} M) bila je značajno iznad kritične micelarne koncentracije (*Critical Micellar Concentration, cmc*), tako da se uticaj drugih supstanci prisutnih u rastvoru na cmc mogao zanemariti. Za obradu eksperimentalno dobijenih podataka u potenciometrijskim titracijama korišćen je kompjuterski program Hyperquad. Metoda potenciometrijske titracije uz kompjutersku podršku, omogućila je evaluaciju

preklopljenih kiselinsko-baznih ravnoteža, što je bio slučaj kod većine ispitivanih ACE inhibitora. Pored toga, primenom Hyperquad programa bilo je moguće određivanje pK_a vrednosti u složenim sistemima, kada je u rastvoru prisutno više supstanci koje mogu da jonuju (enalapril-maleat i perindopril-erbumin). Zbog male rastvorljivosti u vodi, jedino za fosinopril nije bilo moguće odrediti pK_a vrednost u „čisto“ vodenom rastvoru. Zbog toga su praktične pK_a^* vrednosti fosinoprila određene u smešama metanola i vode, različitog odnosa, i ekstrapolacijom na 0% metanola dobijena je vrednost koja odgovara „čisto“ vodenoj sredini. Određivanje pK_a vrednosti fosinoprila u prisustvu surfaktanata, izvedeno je na isti način kao i za ostala jedinjenja, jer su surfaktanti solubilizirajućim efektom obezbedili dovoljnu rastvorljivost fosinoprila.

Bez prisustva surfaktanata dobijene pK_a vrednosti karboksilne grupe iznosile su od 1,43 do 4,72, a sekundarne amino grupe od 5,40 do 7,20. Najveće pK_a vrednosti 10,90 i 9,99 dobijene su za primarnu amino grupu lizinoprila, odnosno sulfhidrilnu grupu kaptoprila.

Na osnovu vrednosti određenih u prisustvu surfaktanata uočeno je da dolazi do promene pK_a vrednosti (od -1,59 do +1,90). Najveće promene pK_a vrednosti primećene su u slučaju karboksilne grupe (od -0,92 do +1,90), dok je od primenjenih surfaktanata, SDS najizraženije uticao na promenu pK_a vrednosti (od -0,38 do +1,90). Dobijeni rezultati su jasno ukazali da micelarni rastvori sva tri primenjena surfaktanta značajno utiču na pomeranje protolitičkih ravnoteža ACE inhibitora. Na osnovu smera pomeranja ravnoteža, pretpostavljeni su tipovi interakcija sa micelama u koje su uključeni jonizujući centri ACE inhibitora.

Polazeći od činjenice da je bioraspoloživost leka u direktnoj korelaciji sa distribucijom ravnotežnih formi, na osnovu određenih pK_a vrednosti izračunati su dijagrami raspodele ravnotežnih oblika ispitanih ACE inhibitora u funkciji pH. Pored toga, izračunat je i procenat ravnotežnih oblika ACE inhibitora pri pH vrednostima od biofarmaceutskog značaja: 1,2 (pH kisele sredine želuca); 4,5 i 6,8 (pH u različitim delovima tankog creva); 7,4 (pH krvne plazme).

U drugom delu doktorske disertacije ispitan je uticaj micelarnih rastvora surfaktanata na ravnotežu (Z)/(E)-izomerizacije pet ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom (kaptopril, enalapril, lizinopril, perindopril, ramipril). Ispitivanja su izvedena primenom RP-HPLC. Optimizovani su hromatografski uslovi za razdvajanje diastereoizomera nakon uspostavljanja ravnoteže, u „čisto“ vodenim rastvorima i rastvorima koji su sadržali surfaktanate u koncentraciji 10^{-2} M. Kod izbora optimalnih uslova razdvajanja izomera vodilo

se računa o mogućoj interkonverziji diastereoizomera u koloni čime bi se narušilo ravnotežno stanje uspostavljeno neposredno pre injektovanja uzoraka u kolonu. Na osnovu fizičko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja i karakteristika prolinske peptidne veze, izabrani su eksperimentalni uslovi u kojima se povećava energetska barijera rotacije: temperatura 18°C (snižanjem temperature, u odnosu na sobnu, usporava se interkonverzija), pH 7 mobilne faze (prolinska peptidna veza ima izraženiji karakter dvostruke veze i otežava rotaciju). Dodatni uslov koji je uzet u obzir kod izbora sastava mobilne faze (fosfatni pufer – acetonitril) i brzine protoka bio je da surfaktanti imaju kraće retenciono vreme od diastereoizomera. Na ovaj način je izbegnut njihov eventualni uticaj na razdvajanje diastereoizomera i omogućena poredljivost rezultata dobijenih hromatografskom analizom rastvora, sa i bez surfaktanata. Rezultati ispitivanja uticaja surfaktanata na izomerizaciju ACE inhibitora pokazali su da je (Z)/(E)-ravnoteža enalapрила, ramipрила i perindopрила značajno pomerena u prisustvu anjonskog surfakta (SDS) i katjonskog surfaktanta (CTAB). Najmanji uticaj na ravnotežu izomerizacije ispitanih ACE inhibitora ispoljile su micelle nejonskog surfaktanta (TX 100).

Identifikacija pikova diastereoizomera izvršena je na osnovu vremenski zavisnih hromatograma ispitivanih ACE inhibitora. Rastvori ACE inhibitora su analizirani odmah nakon rastvaranja u vodi (prisutan samo (Z)-diastereoizomer), a zatim u intervalima od 2 do 6 minuta. Pik čija se površina smanjivala tokom vremena označen je kao (Z)-diastereoizomer. Na osnovu toga izveden je zaključak da kraće retenciono vreme imaju (E)-izomeri kaptopрила, enalapрила i perindopрила, i (Z)-izomeri lizinopрила i ramipрила. Zaključeno je da je redosled pojavljivanja pikova u hromatogramima uslovljen razlikom u lipofilnosti (Z)- i (E)-izomera. Diastereoizomer veće hidrofobne površine ispoljava izraženiju lipofilnost i ostvaruje snažnije interakcije sa stacionarnom fazom, zbog čega se duže zadržava u koloni. Kako je lipofilnost jedan od ključnih parametara koji definiše ne samo farmakokinetičko ponašanje već i inhibitornu aktivnost ACE inhibitora, ovakvi podaci mogu poslužiti i za poređenje njihovih afiniteta jer, na osnovu literaturnih podataka, samo (Z)-izomer ispoljava farmakološki efekat usled stereoselektivne interakcije sa enzimom.

Da bi se objasnile razlike u redosledu hromatografskog eluiranja izomera strukturno sličnih jedinjenja enalapрила i ramipрила, **u trećem delu rada** izvedena je teorijska analiza hidrofobnosti (Z)- i (E)-diastereoizomera. Geometrijska optimizacija parova (Z)- i (E)-diastereoizomera izvršena je primenom B3LYP/6-31G (d,p) u okviru DFT metode, pomoću *Gaussian* 09 programa, a zatim su molekularni deskriptori optimizovanih struktura izračunati primenom ChemBio3D Ultra 13.0 i Dragon programa. Najznačajniji rezultati dobijeni su za

SEV deskriptor, čime je potvrđeno potpuno suprotno hromatografsko ponašanje enalapрила i ramipрила. Rezultati teorijske studije slažu se sa eksperimentalno dobijenim rezultatima, jer su veće vrednosti SEV deskriptora, koje ukazuju na slabije interakcije sa stacionarnom fazom, dobijene za (*Z*)-diastereoizomer ramipрила i (*E*)-diastereoizomer enalapрила. Zaključeno je da postoji značajna razlika u hidrofobnoj površini između diastereoizomera, na osnovu koje je moguće razdvajanje u hromatografskom sistemu.

3. Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa podacima iz literature

Na osnovu pregleda literature može se zaključiti da su ovo prva proučavanja uticaja surfaktanata na protolitičkih ravnoteže i (*Z*)/(*E*)-izomerizaciju ACE inhibitora. Nova saznanja u ovoj oblasti od suštinskog su značaja za procenu ponašanja ove grupe lekova u biosistemu. Na ponašanje lekova u fiziološkim uslovima mogu uticati drugi molekuli prisutni u telesnim tečnostima i na površini ćelijskih membrana. Obzirom da su biološke membrane ekstremno složene strukture, za proučavanje jonizacije lekova i složenih interakcija sa receptorima i enzimskim sistemima, micelarni rastvori surfaktanata koriste se kao pojednostavljeni simulirajući sistemi bioloških membrana.¹

U literaturi postoje podaci o pK_a vrednostima ACE inhibitora koji se odnose na „čisto“ vodenu sredinu, dobijeni uglavnom teorijski, primenom kompjuterskih programa. Od devet ispitivanih jedinjenja u ovoj disertaciji, samo za tri jedinjenja (kaptopril, enalapril, lizinopril) u dostupnoj literaturi postoje podaci za eksperimentalno određene pK_a vrednosti.²⁻⁹ Uočava se dobro slaganje za konstante određene u ovoj disertaciji sa eksperimentalno određenim vrednostima iz literature, dok nešto manje slaganje postoji sa većinom pK_a vrednosti izračunatih primenom kompjuterskih programa. Izrazito neslaganje uočava se za pK_a vrednosti karboksilne grupe kaptopрила i sekundarne amino grupe cilzapрила (razlike veće od 1 pK - jedinice) određene u ovoj disertaciji i literaturnih podataka izračunatih primenom kompjuterskog programa. Protolitičke ravnoteže zofenopрила su prvi put proučavane u okviru ove disertacije.

U literaturi postoje podaci o proučavanju kinetike (*Z*)/(*E*)-izomerizacije enalapрила u rastvoru primenom RP-HPLC¹⁰ i kapilarne elektroforeze.¹¹ Ispitan je uticaj temperature, pH, jonske sile, polarnosti mobilne faze na ravnotežu izomerizacije enalapрила. Kod perindopрила,¹² lizinopрила¹³ i ramipрила¹⁴ ispitivan je uticaj hromatografskih parametara (temperatura, brzina protoka, pH, organski modifikatori) na izomerizaciju u HPLC koloni. Definisani su uslovi za razdvajanje diastereoizomera, kao i eluciju u obliku jedinstvenog pika, u cilju poboljšanja

tačnosti određivanja. U okviru ove disertacije postignuto je razdvajanje (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom (enalapril, lizinopril, perindopril, ramipril i kaptopril). Dodatno se moralo razmotriti i prisustvo surfaktanata u rastvorima, odnosno bilo je potrebno definisati optimalne uslove za razdvajanje izomera tek nakon eluiranja surfaktanata iz kolone. Na ovaj način je izbegnut njihov eventualni uticaj na razdvajanje diastereoizomera i omogućena je poredljivost rezultata dobijenih hromatografskom analizom rastvora, sa i bez surfaktanata.

Vrednosti eksperimentalno dobijenih parametara koji opisuju fizičko-hemijske osobine lekova, sve više se potvrđuju primenom metoda molekuskog modeliranja. U ovoj disertaciji prvi put su objašnjene razlike u redosledu eluiranja diastereoizomera na osnovu teorijske analize hidrofobnosti (*Z*)- i (*E*)-izomera. Kao najznačajniji među izračunatim parametrima izdvojen je SEV¹⁵ molekularni deskriptor. Vrednosti ovog parametra pružaju informacije o lipofilno/hidrofilnim i geometrijskim osobinama molekula, na osnovu kojih je objašnjena različita hidrofobna površina, kao i potpuno suprotno hromatografsko ponašanje diastereoizomera strukturno sličnih jedinjenja, enalapрила i ramipрила.

Citirana relevantna literatura

1. Fendler J.H. Atomic and molecular clusters in membrane mimetic chemistry. *Chem. Rev.* 1987, 87, 877-899.
2. Remko M. Acidity, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some ACE inhibitors. *Chem. Pap.* 2007, 61, 133-141.
3. Hillaert S., Van den Bossche, W. Optimization of capillary electrophoretic separation of several inhibitors of the angiotensin converting enzyme. *J. Chromatogr. A* 2000, 895, 33-42.
4. Niazi A., Ghasemi N. PARAFAC and PLS applied to determination of captopril in pharmaceutical preparation and biological fluids by ultraviolet spectrophotometry. *Ann. Chim., Rome* 2007, 97, 845-858.
5. Gikas S., Tsopeles F., Giaginis C., Dimitrakopoulos J., Livadara T., Archontaki H., Tsantili-Kakoulidou A. Chromatographic behavior of zwitterionic enalapril - exploring the conditions for lipophilicity assessment. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 739-743.
6. Avdeef A., Berger C.M. pH-Metric solubility. 3. Dissolution titration template method for solubility determination. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 14, 281-291.
7. Bennion C., Brown R.C., Cook A.R., Manners C.N., Payling D.W., David H., Robinson D.H. Design, synthesis, and physicochemical properties of a novel, conformationally restricted 2,3-dihydro-1,3,4-thiadiazole-containing angiotensin

converting enzyme inhibitor which is preferentially eliminated by the biliary route in rats *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 439–447

8. Gonzalez E.B., Farkas E., Soudi A.A., Tan T., Yanovsky A.I., Nolan K.B. Metal complexes of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril. Solution studies and the crystal and molecular structure of a dimeric copper(II)–lisinopril complex. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1997, 2377–2379.
9. Ip D.P., De Marco J.D., Brooks M.A. Lisinopril. Analytical Profiles of Drug Substances 1992, 21, 223–276.
10. Shoji A., Yanagida A., Shindo H., Ito Y., Shibusawa Y. Counter-current chromatographic estimation of hydrophobicity of *Z*-(*cis*) and *E*-(*trans*) enalapril and kinetics of *cis/trans* isomerization. *J. Chromatogr. A* 2007, 1157, 101-107.
11. Stellwagen E., Ledger R. Analysis of the isomeric composition of the proline peptide bond in an angiotensin-converting enzyme inhibitor using capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 2003, 321, 167-173.
12. Bouabdallah S., Trabelsi H., Dhia M.B., Hamida N.B. Kinetic Study on the Isomerization of Perindopril by HPLC. *Chromatographia* 2012, 75, 1247-1255.
13. Bouabdallah S., Trabelsi H., Bouzouita K., Sabbah S. Reversed-phase liquid chromatography of lisinopril conformers. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2002, 54, 391-405.
14. Gustafsson S., Eriksson B.M., Nilsson I. Multiple peak formation in reversed-phase liquid chromatography of ramipril and ramiprilate. *J. Chromatogr. A* 1990, 506, 75-83.
15. Cossi M., Scalmani G., Rega N., Barone V. New developments in the polarizable continuum model for quantum mechanical and classical calculations on molecules in solution. *J. Chem. Phys.* 2002, 117, 43-54.

4. Objavljeni i saopštteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima

1. **Popović M.R.**, Popović G.V., Agbaba D.D. The effects of anionic, cationic, and nonionic surfactants on acid–base equilibria of ACE inhibitors. *J. Chem. Eng. Data* 2013, 58, 2567-2573. (M21)
2. **Popović M.R.**, Popović G.V., Filipić S.V., Nikolić K.M., Agbaba D.D. The effects of micelles of differently charged surfactants on the equilibrium between (*Z*)- and (*E*)-diastereomers of five ACE inhibitors in aqueous media. *Monatsh. Chem.* 2015, 1-9. DOI 10.1007/s00706-014-1400-9. (M22)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. **Marija R. Popović**, Gordana V. Popović, Danica D. Agbaba. Potentiometric determination of pK_a values of ACE inhibitors. 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013.

2. **Marija Popović**, Gordana Popović, Slavica Filipić, Katarina Nikolić, Danica Agbaba. RP-HPLC and DFT study on separation of enalapril and ramipril (Z)- and (E)-diastereomers 21st International Symposium on Separation Sciences, Ljubljana, Slovenia, June 30th – July 3rd, 2015. (Prihvaćeno za poster sekciju)

Usmeno izlaganje na skupu nacionalnog značaja (M62)

1. **Marija Popović**, Gordana Popović, Danica Agbaba. Uticaj micelarnih rastvora surfaktanata na protolitičke ravnoteže ACE inhibitora/The Effects of Micellar Solutions of Surfactants on Protolytic Equilibria of ACE inhibitors. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 15-19. oktobar 2014.

5. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

pK_a vrednost predstavlja značajan parametar u fizičko-hemijskoj karakterizaciji farmakološki aktivne supstance i od suštinskog je značaja za procenu njenog ponašanja *in vitro* i *in vivo*. Poznavanje pK_a lekova je od značaja za analitičke postupke, ali i za istraživanja u farmaceutskoj industriji i razvoj doziranih farmaceutskih oblika. Jonizacija značajno utiče na apsorpciju lekova, distribuciju u različite organe, biotransformaciju i kinetiku enzimskih reakcija, kao i eliminacije iz organizma. S obzirom na veliki značaj pK_a vrednosti, Američka Agencija za hranu i lekove (*Food and Drug Administration*, FDA), zahteva poznavanje pK_a vrednosti novih, ali i već dostupnih lekova. Fizičko-hemijski parametri koji definišu ponašanje jedinjenja u „čisto“ vodenom rastvoru od značaja su za analitičke i tehnološke postupke, ali nisu dovoljni za procenu ponašanja lekova u fiziološkim uslovima koji su ekstremno složeni. Na očekivane procese jonizacije ili izomerizacije lekova u biosredini, mogu uticati i drugi molekuli prisutni u telesnim tečnostima i na površini ćelijskih membrana. Ne postoji jedinstven model ćelijskih membrana koji u potpunosti odražava svu njihovu složenost. Međutim, kao pojednostavljeni sistemi, koji ispunjavaju osnovne funkcije biomembrana, koriste se micelarni rastvori surfaktanata. Pored efekta solubilizacije, miclele mogu imati uticaj na jonizaciju i izomerizaciju jedinjenja u rastvoru.

U ovoj doktorskoj disertaciji prvi put je ispitan uticaj micelarnog rastvora surfaktanata na protolitičke ravnoteže i (Z)/(E)-izomerizaciju ACE inhibitora. Ispitivanja su izvedena na

setu od devet jedinjenja. Određene su pK_a vrednosti u „čisto“ vodenoj sredini i u prisustvu surfaktanata različitog naelektrisanja (katjonski, anjonski i nejonski). Rezultati pokazuju da surfaktanati najviše utiču na jonizaciju karboksilne grupe, a upravo ova grupa u jonizovanom obliku je neophodna za inhibiciju ACE enzima. Na osnovu promene pK_a vrednosti pretpostavljeni su mogući tipovi interakcija ACE inhibitora sa micelama različitog naelektrisanja. Rezultati proučavanja u ovoj disertaciji pokazuju da micelarni rastvori surfaktanata bitno utiču i na ravnotežu (*Z*)/(*E*)-izomerizacije ACE inhibitora sa prolinskom peptidnom vezom. Dobijeni podaci od značaja su za dalja proučavanja farmakološkog i farmakokinetičkog ponašanja ACE inhibitora, naročito ako se uzme u obzir da još uvek nije poznato da li postoji stereoselektivnost u interakciji sa hepatičnom esterazom. Rezultati teorijske analize hidrofobnosti (*Z*)- i (*E*)-diastereoizomera objašnjavaju razlike u ponašanju diastereoizomera i mogu doprineti daljim QSAR studijama ove grupe lekova.

Rad u kome je publikovan deo rezultata ove disertacije (Popović M.R., Popović G.V., Agbaba D.D. The effects of anionic, cationic, and nonionic surfactants on acid–base equilibria of ACE inhibitors. *J. Chem. Eng. Data* 2013, 58, 2567-2573) do sada je citiran četiri puta:

1. Helal F., Lane M.E.. Transdermal delivery of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014, 88, 1-7. (M21)
2. Udrescu L., Sbârcea L., Fulia A., Ledea I., Vlase G., Barvinschi P., Kurunczi L. Physicochemical analysis and molecular modeling of the fosinopril β -cyclodextrin inclusion complex. *J. Spectrosc.* 2014. doi.org/10.1155/2014/748468 (M23)
3. Schönherr D., Wollatz U., Haznar-Garbacz D., Hanke U., Box K.J., Taylor R., Weitschies W. Characterisation of selected active agents regarding pK_a values, solubility concentrations and pH profiles by SiriusT3. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015, 92, 155-170. (M21)
4. Varghese B., Al-Busafi S.N., Suliman F.O., Al-Kindy S.M. Synthesis, spectroscopic characterization and photophysics of a novel environmentally sensitive dye 3-naphthyl-1-phenyl-5-(4-carboxyphenyl)-2-pyrazoline. *J. Lumin.* 2015, 159, 9-16. (M21)

6. Zaključak i predlog komisije

Na osnovu svega obrazloženog, može se zaključiti da je disertacija urađena prema svim principima savremenog naučnog istraživanja i da prikazani rezultati predstavljaju značajan i originalan naučni doprinos za oblast Farmaceutska medicinska hemija i strukturna analiza.

Rezultati su publikovani u dva rada u časopisima od međunarodnog značaja, od toga jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) i jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), kao i u vidu dva saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u izvodu (M34) i jednog usmenog izlaganja na skupu nacionalnog značaja (M62).

Komisija u navedom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju diplomiranog farmaceuta Marije Popović i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Uticaj surfaktanata na protolitičke ravnoteže i izomerizaciju ACE inhibitora“

*Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije
kandidata dipl. farm. Marije Popović*

Dr sc. Gordana Popović (mentor), redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Danica Agbaba (mentor), redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Katarina Nikolić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Živoslav Tešić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Dr sc. Slavica Filipić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet