

UDK 615 (497.11)

ISSN 0004-1963 (Štampano izd.)

ISSN 2217-8767 (Online)

# ARHIV ZA FARMACIJU

Godina 68

Broj 4

Beograd, 2018.

ČASOPIS SAVEZA  
FARMACEUTSKIH  
UDRUŽENJA SRBIJE

4/2018

**SADRŽAJ – CONTENTS**

**Pregledni radovi – Review articles**

- **Milica Drašković, Sandra Cvijić, Svetlana Ibrić, Jelena Paroјčić** 839  
**Farmaceutsko-tehnološka karakterizacija oralno-disperzibilnih tableta i filmova**  
**Characterization of orodispersible tablets and orodispersible films**

**Originalni naučni radovi – Original scientific papers**

- **Milan Jovanović, Katarina Nikolić, Žarko Gagić, Danica Agbaba** 860  
**Molekulsko modelovanje i analiza 3D-strukture farmakofore selektivnih PI3K- $\alpha$  inhibitora kao antitumorskih agenasa**  
**Molecular modeling and analysis of the 3D pharmacophore structure of the selective PI3K- $\alpha$  inhibitors as antitumor agents**

**Stručni radovi – Professional papers**

- **Mila Filipović, Milica Lukić, Snežana Savić, Gordana Vuleta** 874  
**Matične ćelije alpske ruže kao sastojci kozmetičkih kremova – očekivani i utvrđeni efekti kremova na koži**  
**Alp Rose stem cells as cosmetic creams ingredient – expected and established creams effects on the skin**

- **Danijela Damjanović, Vladimir Dobričić, Olivera Čudina, Sote Vladimirov** 885  
**Razvoj i validacija metode tečne hromatografije za određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline u doziranim oblicima**  
**Development and validation of liquid chromatography method for determination of acetylsalicylic and salicylic acid in dosage forms**

- **Jelena Ćuk, Stanimir Stojiljković, Katarina Milutinović, Dimitrije Cvetković, Vesna Pešić, Ross Arena, Dejana Popović** 900  
**The athlete's heart – modern diagnostic approach**  
**Sportsko srce – savremeni dijagnostički pristup**

## Farmaceutsko-tehnološka karakterizacija oralno-disperzibilnih tableta i filmova

Milica Drašković\*, Sandra Cvijić, Svetlana Ibrić, Jelena Parojčić

Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

\*autor za korespondenciju: Milica Drašković, e-mail: milicam@pharmacy.bg.ac.rs

---

### Kratak sadržaj

Oralno-disperzibilni farmaceutski oblici lekova predstavljaju savremene farmaceutske oblike koji su namenjeni za primenu u usnoj duplji, gde se, u kontaktu sa salivom, gotovo trenutno raspadaju i, nakon toga, gutaju sa ciljem postizanja sistemskog terapijskog efekta. Intraoralno raspadanje preparata može biti praćeno oslobađanjem i rastvaranjem lekovite supstance, nakon čega dolazi do interakcije sa receptorima na krvžicama jezika i senzacije ukusa. Prihvatljiva mehanička otpornost, brza dezintegracija i prijatan ukus predstavljaju kritična svojstva kvaliteta oralno-disperzibilnih preparata, zbog čega je potrebno vršiti njihovu procenu prilikom razvoja formulacije i tokom proizvodnog procesa. Međutim, u literaturi se uočava nekonzistentnost u načinima sprovođenja pomenutih ispitivanja, zbog nedostatka standardizovanih farmakopejskih metoda. Najveća varijabilnost u postupcima karakterizacije uočena je pri ispitivanju raspadljivosti i proceni uspešnosti maskiranja ukusa. Na osnovu izloženog može se zaključiti da je za adekvatnu procenu raspadljivosti oralno-disperzibilnih preparata potrebno uzeti u obzir uticaj pritiska jezika, što je posebno evidentno u slučaju različitim polimernih filmova. Za pouzdanu *in vivo* studiju procene efikasnosti maskiranja ukusa lekovite supstance potrebno je izvršiti adekvatan odabir i obuku ispitanika, uz određivanje granice gorčine. Kako bi se rezultati *in vivo* studije doveli u vezu sa rezultatima *in vitro* metoda procene efikasnosti maskiranja ukusa, neophodno je uslove za sprovođenje analitičke metode približiti fiziološkim uslovima.

**Ključne reči:** oralno-disperzibilne tablete, oralno-disperzibilni filmovi, raspadljivost, mehaničke karakteristike, korekcija ukusa.

---

## **1. Uvod**

Oralno-disperzibilni farmaceutski oblici lekova predstavljaju savremene farmaceutske oblike koji su namenjeni za primenu u usnoj duplji (intraoralna primena) gde se, u kontaktu sa salivom, gotovo trenutno raspadaju i, nakon toga, gutaju sa ciljem postizanja sistemskog terapijskog efekta (1). Komercijalno dostupni oralno-disperzibilni farmaceutski oblici su: oralno-disperzibilne tablete (ODT); oralni liofilizati; oralno-disperzibilni filmovi (ODF) i oralno-disperzibilne granule (ODG); dok su oralno-disperzibilne mini-tablete (ODMT) još uvek samo u fazi razvoja (2). Oralno-disperzibilne tablete i oralno-disperzibilni filmovi predstavljaju komercijalno najzastupljenije oralno-disperzibilne preparate. Oralni liofilizati se ne mogu smatrati tipičnim oralno-disperzibilnim farmaceutskim oblikom, s obzrom da se prema navodima Evropske farmakopeje mogu primeniti i nakon dispergovanja u čaši vode (3). Osnovni zahtev koji ovi preparati treba da zadovolje je postizanje kratkog vremena raspadanja, u kontaktu sa ograničenom zapreminom salive, bez formiranja krupnih ostataka, što se postiže ili (i) odabirom posebnih metoda *izrade/proizvodnje*, koje dovode do stvaranja porozne strukture koja obezbeđuje brzu apsorpciju salive; ili (ii) odabirom pogodnih ekscipijenasa, koji različitim mehanizmima dovode do kvašenja i brze dezintegracije preparata (4). Intraoralno raspadanje oralno-disperzibilnog preparata može biti praćeno oslobadanjem i rastvaranjem lekovite supstance u salivu nakon čega dolazi do interakcije sa receptorima na krvžicama jezika i senzacije ukusa (5). Stoga je od ključne važnosti, prilikom razvoja oralno-disperzibilnih formulacija sa lekovitom supstancicom neprijatnog ukusa, razmotriti odgovarajući pristup za njegovo maskiranje (6). Svrha razvoja oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika je, prvenstveno, olakšana primena leka sa ciljem pozitivnog uticaja na komplijansu pacijenata. Iako se smatra da, zbog intraoralne dezintegracije preparata, može doći do apsorpcije lekovite supstance na nivou usne duplje, ždrela ili jednjaka i bržeg početka dejstva, kratko vreme zadržavanja preparata u usnoj duplji ograničava mogućnost obimnog rastvaranja i apsorpcije lekovite supstance, tj. značajan uticaj na biološku raspoloživost. Najveći deo primenjene doze će biti progutan, zbog čega se očekuje isti farmakokinetički profil kao nakon primene oralne suspenzije, odnosno konvencionalnih tableta sa trenutnim oslobađanjem, uz moguće neznatno odlaganje dostizanja maksimalne koncentracije leka u plazmi zbog produženog transporta od usne duplje do želuca i primene preparata bez tečnosti (7, 8).

Prihvatljiva mehanička otpornost, brza dezintegracija i prijatan ukus predstavljaju kritična svojstva kvaliteta oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika, zbog čega je potrebno vršiti njihovu procenu prilikom razvoja formulacije i tokom proizvodnog procesa. Međutim, u literaturi se uočava nekonistentnost u načinima sprovodenja pomenutih ispitivanja, zbog nedostatka standardizovanih farmakopejskih metoda.

Cilj rada je pregled i kritička analiza literaturnih podataka koji se odnose na farmaceutsko-tehnološku karakterizaciju oralno-disperzibilnih tableta i filmova, kao najzastupljenijih oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika lekova, u pogledu mehaničkih svojstava, raspadljivosti, brzine rastvaranja lekovite supstance i efikasnosti maskiranja ukusa.

## 2. Karakterizacija oralno-disperzibilnih tableta i filmova

### 2.1. Mehanička svojstva

Mehanička svojstva oralno-disperzibilnih tableta obuhvataju procenu zatezne čvrstine i otpornosti na habanje, tj. friabilnosti. Zatezna čvrstina ( $\sigma$ , MPa), u odnosu na otpornost na lomljenje tableta, predstavlja pouzdaniji i diskriminacioniji parametar, zbog toga što pored čvrstine u obzir uzima i dimenzije tableta (9):

$$\sigma = \frac{2 \times F}{\pi \times R \times t} \quad \text{Jednačina 1}$$

gde je  $F$  sila koja dovodi do lomljenja tableta,  $R$  prečnik i  $t$  debljina tableta.

Prikazana jednačina se koristi za procenu zatezne čvrstine cilindričnih tableta koje su i najzastupljenije prilikom razvoja formulacije. Friabilnost tableta se procenjuje u skladu sa navodima datim u Ph. Eur. 9.0 (3).

Za procenu mehaničkih karakteristika filmova najčešće se primenjuje standardni test za određivanje zateznih svojstava folija (DIN ES ISO 527), iako definisane dimenzije uzoraka za ispitivanje (minimalne dužine od 80 mm) daleko prevazilaze uobičajene dimenzije oralno-disperzibilnih filmova (10-12). Takođe, za ispitivanje je neophodan uzorak sa suženim srednjim delom kako bi se osiguralo pucanje filma na sredini, što ne odgovara klasičnom kvadratnom ili pravougaonom obliku lekovitih filmova. Mehanička svojstva filmova procenjuju se na osnovu vrednosti zatezne čvrstine (MPa), procenta elongacije (%) i Young-ovog modula (MPa) definisanih jednačinama 2, 3 i 4 (13-15), redom:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{Jednačina 2}$$

gde je  $\sigma$  zatezna čvrstina, tj. otpornost materijala sili koja teži da ga pokida;  $F$  sila koja dovodi do pucanja filma; a  $A$  površina poprečnog preseka uzorka za ispitivanje.

$$\varepsilon = 100 \times \frac{\Delta L_0}{L_0}$$

**Jednačina 3**

gde je  $\varepsilon$  procenat elongacije, tj. indikator fleksibilnosti i istegljivosti filmova;  $\Delta L_0$  povećanje dužine uzorka nastalo istezanjem do trenutka pucanja i  $L_0$  početna dužina uzorka, tj. rastojanje između dve kleme, prilikom ispitivanja filmova.

$$E_t = \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1}$$

**Jednačina 4**

gde je  $E_t$  Young-ov modul, tj. mera krutosti materijala koja se predstavlja kao odnos primjenjenog napona ( $\sigma_1$  i  $\sigma_2$ ) i prouzrokovanih istezanja ( $\varepsilon_1$  i  $\varepsilon_2$ ) u elastičnom regionu deformacija materijala.

Generalno, čvršći i krući filmovi pokazuju veće vrednosti zatezne čvrstine i Young-ovog modula sa malom elongacijom (14). Da bi oralno-disperzibilni film bio fleksibilan, lak za primenu i rukovanje, kao i fizički stabilan, trebalo bi da poseduje umerenu zateznu čvrstinu, izraženu elongaciju i nisku vrednost Young-ovog modula (16). Pojedini istraživači ispitivali su mogućnost primene analizatora teksture za procenu mehaničkih svojstava polimernih filmova (17, 18). Međutim, Preis i saradnici (19) su, primenom istog uređaja i posebnog nosača, prvi sproveli detaljnu studiju mehaničkih karakteristika komercijalnih preparata tipa filmova i različitih referentnih materijala. Pokazali su da je primjenjenim postupkom moguće adekvatno mehanički okarakterisati filmove, i da se osnovnim parametrom za procenu mehaničkih svojstava može smatrati čvrstina (engl. *puncture strength*), koja predstavlja odnos između maksimalne sile koja se primeni na film prilikom ispitivanja i površine sonde kojom se analiziraju filmovi (19). Autori ovog rada razvili su alternativni pristup za procenu mehaničkih karakteristika ODF pomoću oscilatornih reoloških merenja, koji, kao i prethodni, ne zahteva dodatnu pripremu uzoraka (20, 21). Primenom sistema paralelnih ploča, a nakon određivanja lineranog viskoelastičnog regiona, prati se zavisnost parametara oscilatorne reologije (modul sačuvane energije - elastični modul i modul izgubljene energije - viskozni modul) u funkciji promene frekvencije (0,1-10 Hz) pri konstantnom naponu smicanja od 1 Pa. Dobijeni parametri koriste se za procenu kompleksnog modula  $|G^*|$ , kao indikatora unutrašnje strukture filmova, primenom jednačine 5 (22):

$$|G^*| = G' + G''$$

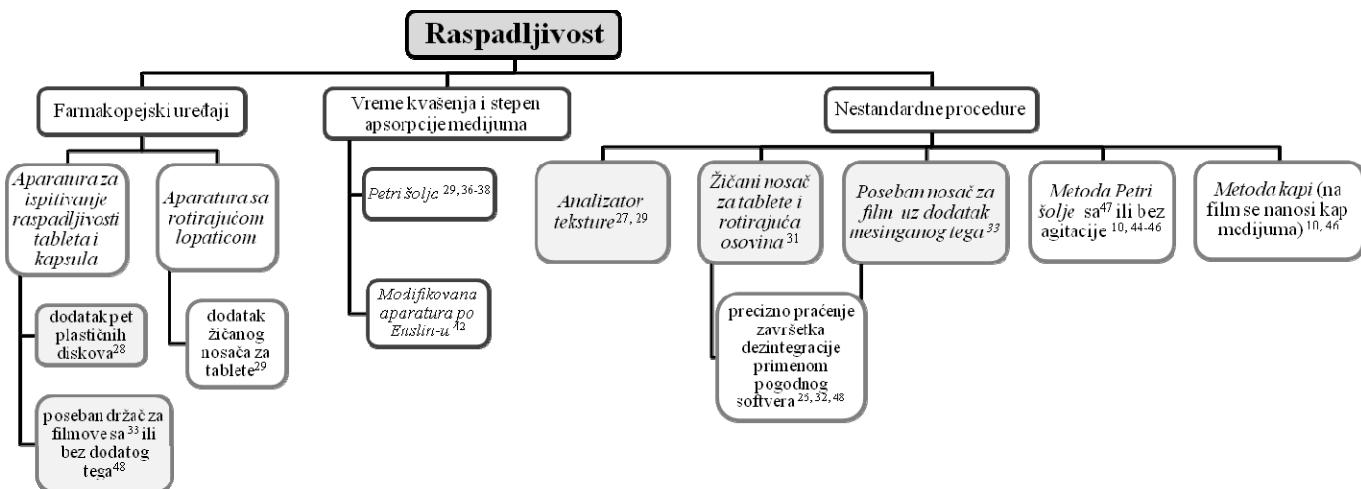
**Jednačina 5**

gde je  $G'$  elastični modul,  $G''$  viskozni modul i  $i$  imaginarni broj jednak  $(-1)^{1/2}$ .

Mehanička otpornost se smatra kritičnim parametrom kvaliteta sa aspekta olakšanog rukovanja i upotrebe oralno-disperzibilnih preparata. Takođe, neophodno je da preparat pokazuje prihvatljivu mehaničku otpornost kako bi se pakovao u standardnu ambalažu, tj. bio ekonomski isplativ. U slučaju ODT vrednosti zatezne čvrstine preko 1 MPa smatraju se prihvatljivim (23). Kod ODF bitno je postići takva mehanička svojstva formulacije koja obezbeđuju jednostavnu proizvodnju i naknadnu manipulaciju preparatom. Visser i saradnici su definisali, na osnovu obimnih eksperimenata, ciljane vrednosti mehaničkih parametara ODF i to zateznu čvrstinu  $> 2$  MPa, % elongacije  $> 10\%$  i Young-ov modul  $< 550$  MPa (24).

## 2.2. Raspadljivost

U Evropskoj farmakopeji navodi se zahtev za vreme raspadanja oralno-disperzibilnih tableta do 3 minuta primenom uređaja za ispitivanje raspadljivosti (3). Međutim, uslovi za sprovođenje testa nisu definisani (3). Američka agencija za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration – FDA*) navodi 30 s kao vreme raspadanja ODT (što više odgovara realnim uslovima primene, kao i očekivanjima pacijenata) primenom standardnog testa za procenu raspadljivosti navedenog u Američkoj farmakopeji ili pogodnog alternativnog testa (1). Međutim, uslovi za sprovođenje ispitivanja, kao što su 1000 ml vode ili odgovarajućeg rastvora pufera i mehanička agitacija od 29 do 32 uranjanja/min ne smatraju se odgovarajućim, s obzirom da se raspadanje oralno-disperzibilnih preparata dešava veoma brzo (25). Dodatno, usled raspadanja preparata, može doći do zamućenja medijuma ili flotiranja delova tablete, što dodatno otežava procenu završetka dezintegracije. Razmatrajući način primene ovih preparata, konvencionalan uređaj za ispitivanje raspadljivosti može se smatrati neodgovarajućim. Kako bi se prevazišao nedostatak standardizovanih metoda, razvijaju se modifikovani uređaji i procedure za karakterizaciju raspadljivosti oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika koje bolje odslikavaju *in vivo* uslove u pogledu zapremine medijuma i pritiska koji se vrši na preparat (10, 26-33). Pregled različitih, u literaturi dostupnih, metoda za procenu vremena raspadanja oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika lekova dat je na Slici 1. Brniak (26) i Abdelbary sa saradnicima (27) su pokazali da vrsta medijuma utiče na vreme raspadanja ODT i da se, stoga, prečišćena voda ne može smatrati pogodnim medijumom za *in vitro* procenu raspadljivosti tableta. Kako bi se bolje simulirali fiziološki uslovi, odnosno pH vrednost salive (koja, u zavisnosti od uzrasta, iznosi od 5,7 do 7,5 (34)) i njen sastav, u pogledu prisustva soli natrijuma, kalijuma i fosfata, istraživači se odlučuju da kao medijum, za ispitivanje raspadljivosti oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika, koriste fosfatni pufer ili odgovarajuću simuliranu salivu (26, 27, 35).



**Slika 1.** Pregled različitih metoda za procenu raspadljivosti oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika lekova. Metode koje su zatamnjene uzimaju u obzir uticaj pritiska jezika.

**Figure 1.** Overview of different methods for characterization of orodispersible dosage forms disintegration time. Methods (in shaded fields) consider effect of tongue force during disintegration time evaluation.

Watanabe i saradnici (26) su sprečili flotiranje ODT i olakšali procenu završetka postupka dezintegracije u konvencionalnom uređaju za ispitivanje raspadljivosti dodatkom pet, umesto jednog plastičnog diska. Bi i saradnici (29) su za procenu raspadljivosti koristili aparaturu sa lopaticom, koju su modifikovali dodatkom žičanog nosača uz bočnu stranu posude u koji su, pri ispitivanju, smeštali tabletu. Raspadljivost je procenjivana kao vreme za koje svi delovi tablete prođu kroz otvore na nosaču (29). Međutim, ovakvi uslovi u pogledu zapreminе medijuma nisu u skladu sa *in vivo* zapreminom salive od svega nekoliko militara. Kao alternativna metoda predložena je procena vremena kvašenja (engl. *wetting time - WT*) i/ili stepena apsorpcije medijuma (engl. *water absorption ratio - WAR*) (29, 36-38). Vreme kvašenja se smatra indikatorom unutrašnje strukture tablete i hidrofilnosti primenjenih ekscipijenasa i, što su njegove vrednosti niže, očekuje se brže raspadanje tableta (29). Procena vremena kvašenja podrazumeva smeštanje tablete na pogodnu površinu, najčešće filter papir, koji je nakvašen određenom zapreminom medijuma, uz praćenje vremena za koje medijum dođe do gornje površine tablete (36, 37) ili u potpunosti nakvasi tabletu (29, 38). Stepen apsorpcije medijuma (%) izračunava se na osnovu jednačine 6:

$$WAR = 100 \times \frac{W_a - W_b}{W_b}$$

**Jednačina 6**

gde je  $W_a$  masa tablete nakon potpunog kvašenja, a  $W_b$  masa tablete pre sproveđenja ispitivanja (29).

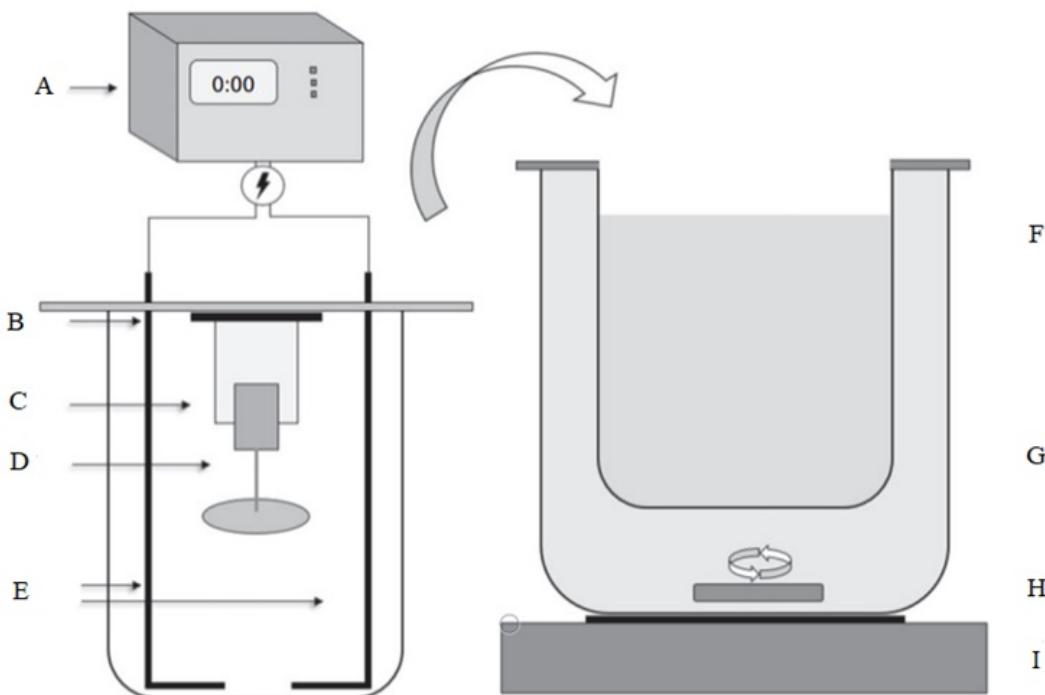
Uočeno je da bubreći superdezintegratori, kao što su krospovidon, kroskarmeloz-natrijum i natrijum-skrobglikolat, apsorbuju veću zapreminu medijuma u poređenju sa nebubrećim sredstvima za raspadanje (kalcijum silikat i mikrokristalna celuloza), tako da stepen apsorpcije medijuma može da ukaže na razliku u mehanizmima dejstva različitih dezintegratora, ali ne može da služi za pouzdano predviđanje raspadljivosti (26, 39, 40). Početna zapremina medijuma, u velikoj meri, utiče na vreme kvašenja, zbog čega je u našoj laboratoriji sklopljena modifikovana aparatura po *Enslin-u* (41) koja se sastoji iz levka sa sinter stakлом i horizontalno postavljene staklene cevi kroz koju se medijum uvodi u sistem. Višak medijuma se sa površine sinter stakla uklanja papirnim ubrusom, nakon čega se na njega spušta tableteta i prati vreme potrebno da se u potpunosti nakvasi (42). Dodatno, primenom horizontalne graduisane cevi moguće je vrlo precizno proceniti zapreminu medijuma koja je apsorbovana tokom kvašenja, tj. indirektno odrediti stepen apsorpcije medijuma (42). Dor i Fix (30) su uspešno primenili analizator teksture za precizno određivanje početka i kraja procesa dezintegracije tako što se tableteta pričvrsti na vrh sonde i određenom brzinom spušta u medijum definisane zapremine i temperature. Na ovaj način simuliran je pritisak gornjeg nepca i jezika na tabletu prilikom primene u ustima. Abdelbary i saradnici (27) su modifikovali prethodnu metodu, tako što se tableteta spušta na perforiranu površinu ispod koje se nalazi medijum. Narazaki i saradnici (31) su razvili proceduru za ispitivanje raspadljivosti oralno-disperzibilnih tableteta koja je podrazumevala primenu žičanog nosača za tabletu, koji je bio potopljen u pogodan medijum, i rotirajuće osovine, koja je vršila pritisak na tabletu. Harada i saradnici (32) su unapredili procenu završetka procesa dezintegracije tabletete uvođenjem dve ploče od nerđajućeg čelika sa elektrodama koje su, umesto žičanog nosača, služile za smeštanje tabletete. Dno rotirajuće osovine je izrađeno od provodnika koji u kontaktu sa pločama menja električni otpor, omogućujući preciznu procenu raspadanja tabletete. Ovakav uređaj je i komercijalno dostupan pod imenom *ODT-101* (Toyama Sangyo Co., Ltd., Japan) (32, 43). Brniak i saradnici (26) su primenili sličan pristup za procenu raspadljivosti oralno-disperzibilnih tableteta uz ograničavanje zapremine dostupnog medijuma sa 450 ml na svega 2, 5 ili 15 ml, što više odgovara *in vivo* uslovima. Završetak dezintegracije tableteta procenjivan je na osnovu promena u magnetnom polju formiranog između magneta na dnu posude sa medijumom i magnetnog senzora na vrhu rotirajuće osovine (26).

Za razliku od oralno-disperzibilnih tableteta, kod ODF je mnogo teže proceniti trenutak raspadanja zbog toga što se hidrofilni polimeri koji najčešće predstavljaju

osnovne komponente filmova, u kontaktu sa vodenim medijumom, različito ponašaju, pri čemu usled bubrenja i/ili delimičnog rastvaranja polimera dolazi do istezanja filmova. Jedna od metoda za procenu raspadljivosti filmova obuhvata spuštanje filma u Petri šolju, u kojoj se nalazi medijum zapremine 2-10 ml, nakon čega se prati vreme potrebno da se film u potpunosti rastvori (10, 44) ili da se raspade na sitne delove (45, 46). Preis i saradnici (47) su primenili sličan princip za procenu raspadljivosti filmova s tim što se, nakon dodatka medijuma, vrši konstantno mešanje kako bi se olakšalo raspadanje. Drugi pristup za procenu raspadljivosti filmova podrazumeva praćenje vremena za koje kap medijuma (zapremine 200 µl), naneta na površinu fiksiranog filma, doveđe do njegove rupture (10, 48). Sakuda i saradnici (48) su modifikovali konvencionalan uređaj za ispitivanje raspadljivosti tableta, tako što su umesto korpe za smeštanje tableta, na sam držač kačili filmove koji su u toku ispitivanja bili uranjani i izranjani iz medijuma. Sličan princip, uz simuliranje uticaja pritiska jezika, razvijen je od strane Maren Preis i saradnika (33). Grafički prikaz uređaja dat je na Slici 2. Uređaj se sastoji od hvataljke za koju se pričvrsti film na čijem donjem delu se nalazi još jedna hvataljka koja se sastoji iz mesingane ploče čija je ukupna masa 3 g, što odgovara prethodno pokazanoj srednjoj sili (0,03 N) koju vrše ispitanici jezikom u toku procesa lizanja (33). Nosač za film je povezan sa dva mesingana provodnika koji su vezani na jedinicu za merenje otpora. Film se spušta do polovine u pogodan medijum zagrejan na telesnu temperaturu. Kvašenje i raspadanje filma praćeno je njegovim cepanjem, nakon čega mesingana pločica pada na dno suda zatvarajući kontakt između provodnika, što se registruje trajnom promenom otpora. Vreme do ponovnog uspostavljanja fiksног otpora se meri i odgovara vremenu raspadanja ispitivanih filmova (33). Kako bi se omogućila primena standardizovanih uslova za sprovođenje ispitivanja, Preis i saradnici su modifikovali nosač za film, tako da može da se smesti u konvencionalnu aparaturu za ispitivanje raspadljivosti tableta, obezbeđujući istovremeno ispitivanje šest uzoraka (33).

Pouzdanost predloženih metoda potvrđena je poređenjem sa *in vivo* određenim vrednostima za raspadljivost oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika (26, 27, 30, 31). Brniak i saradnici (49) su devet različitih *in vitro* pristupa proceni raspadljivosti ODT poređili sa *in vivo* određenim vremenima raspadanja tableta i uočili da se za većinu primenjenih metoda, uključujući i primenu standardnog farmakopejskog testa, postiže visok stepen linearne pozitivne korelacije ( $r > 0,89$ ). Bolja korelacija uspostavljena je primenom *in vitro* metoda u kojima se simulira ograničena zapremina medijuma i uticaj pritiska jezika. Narazaki i saradnici (31) su takođe uočili da raspadljivost preparata zavisi od primjenjenog mehaničkog stresa. Međutim, Douroumis i saradnici (35) su pokazali da su vrednosti raspadljivosti dobijene primenom farmakopejske metode ili analizatora teksture uporedive sa *in vivo* određenim vremenima raspadanja ODT, što ipak ukazuje na mogućnost primene standardizovanog pristupa. Kod ODF, s obzirom na

izraženu različitu prirodu polimera, teže se uočava završetak procesa raspadanja zbog čega je neophodno, prilikom ispitivanja raspadljivosti, uključiti uticaj mehaničkog stresa.



**Slika 2.** Uredaj za procenu raspadljivosti oralno-disperzibilnih filmova (A) merna jedinica; (B) hvataljka; (C) uzorak; (D) teg; (E) mesingani provodnici; (F) medijum; (G) vodeno kupatilo; (H) magnetna mešalica i (I) grejno telo (prema (33)).

**Figure 2.** Device for ODT disintegration testing (A) analyzer unit; (B) sample holder; (C) sample; (D) weight; (E) brass conductors; (F) medium; (G) water bath; (H) magnetic stirrer and (I) heating plate (according to (33)).

### 2.3. Brzina rastvaranja lekovite supstance iz preparata

U okviru FDA baze podataka mogu se naći preporučeni uslovi za ispitivanje brzine rastvaranja različitih lekovitih supstanci iz oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika sa trenutnim ili produženim oslobođanjem (50). Brzo raspadanje generalno utiče na brže oslobođanje lekovite supstance iz preparata, zbog čega se preporučuje učestalo uzorkovanje (u vremenskim intervalima od 3 do 5 min) i rana kvantifikacija rastvorene lekovite supstance (prvo uzorkovanje već nakon 2-3 minuta) (50, 51). Brzina

rastvaranja se, u zavisnosti od karakteristika lekovite supstance i ciljanog profila oslobođanja iz lekovitog proizvoda određenog dizajnom formulacije i procesa, prati u periodu od nekoliko minuta do 60 min (50). Izbor vrste i zapremine medijuma prevashodno zavisi od karakteristika ispitivanog preparata i same lekovite supstance. U Evropskoj farmakopeji (3) je kao medijum za ispitivanje lekovitih guma za žvakanje preporučen fosfatni pufer pH 6,0. S obzirom na sličan način primene, predložen medijum se može smatrati odgovarajućim i u slučaju oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika. Razvoj pouzdane metode za procenu količine oslobođene lekovite supstance iz oralno-disperzibilnih preparata predstavlja veliki analitički izazov, jer je potrebno detaljno ispitati i definisati uslove ispitivanja koji mogu uticati na rezultat u najkritičnijim prvim tačkama uzorkovanja, kako bi se izbegla varijabilnost u rezultatima uzrokovana metodom, i obezbedila pouzdana procena karakteristika lekovitog preparata.

Za procenu brzine rastvaranja lekovite supstance iz ODT najčešće se primenjuje aparatura sa lopaticom, pri brzini obrtanja 50-75 rpm, u zavisnosti od toga da li se uočava nakupljanje praška na dnu posude (52, 53). Upotreba aparature sa korpicom se ne preporučuje zbog toga što se pri malim brzinama ne postiže homogeno mešanje u svim delovima posude, a i čvrsti segmenti tableta mogu ostati zaglavljeni u gornjem delu korpice, što može dovesti do nepouzdanih rezultata (53).

Pregledom literature je uočeno da se za ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz ODF obično koriste ili aparatura sa lopaticom pri brzini obrtanja 50-100 rpm (10, 54, 55) ili aparatura sa korpicom (56). Osnovni problem se ogleda u tome što su ODF skloni flotiranju. Kako bi se sprečilo flotiranje preparata, obično se koriste posebni nosači za filmove ili staklene ploče na koje se postavljaju filmovi. Nedavno je razvijen alternativni test za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz ODF, tzv. *Punch and Filter* test, koji podrazumeva primenu konvencionalne aparature (aparatura sa lopaticom) uz određene modifikacije (57). Najznačajnija izmena je da se rastvaranje i uzorkovanje ne vrše u istom delu posude. Na površinu medijuma se stavlja ram od nerđajućeg čelika u koji se smešta filter na koji se postavlja ODF. Na ODF se naslanja klip kako bi se simulirao pritisak jezika pri primeni preparata u usnoj duplji. Svakih 30 s klip se povlači naviše kako bi se na površinu filma nanelo 0,25 ml medijuma iz posude (simuliranje protoka salive). Pritisak klipa, kao i simuliranje protoka salive su pokazali značajan uticaj na profil brzine rastvaranja ketoprofena (ubrzali su njegovo oslobođanje) u poređenju sa ispitivanjem bez primene ovih faktora. Sievens-Figueroa i saradnici (58) su ispitivali mogućnost primene aparature tipa protočne ćelije za procenu brzine rastvaranja mikronizirane supstance iz ODF, u poređenju sa lekovitom supstancom veličine nano reda i pokazali su da na sprovođenje ispitivanja, u velikoj meri, utiče način pozicioniranja filma u ćeliji, kao i brzina protoka medijuma. Ipak, predložena

metoda je, za razliku od testa sprovedenog u aparaturi sa korpicom, pokazala evidentnu razliku među ispitivanim preparatima.

S obzirom na brzo raspadanje preparata, u početnim trenucima ispitivanja očekivan je i prihvatljiv veći stepen varijabilnosti, koji se ne može smatrati značajnim. Konačan odabir uslova za sprovođenje ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz oralno-disperzibilnih preparata prevashodno treba da se bazira na rezultatima *in vivo* studija procene biološke raspoloživosti lekovite supstance.

#### **2.4. Procena efikasnosti maskiranja ukusa lekovitih supstanci**

Uobičajen način za procenu efikasnosti maskiranja ukusa je *in vivo* studija na panelu ispitanika. Međutim, imajući u vidu varijabilnost koja se uočava *in vivo*, kao i vreme trajanja i cenu sprovođenja *in vivo* studija, akcenat se stavlja na procenu efikasnosti maskiranja ukusa primenom odgovarajućih *in vitro* tehnika, kao što su UV spektroskopija i primena uređaja tipa elektronskog jezika. Ove metode su bezbedne, selektivnije i osetljivije, u odnosu na *in vivo* pristup. Odgovarajućim analitičkim metodama se mogu detektovati male razlike u sastavu formulacija, dok se *in vivo* pristupom to ne može ostvariti (59). Međutim, ove tehnike najčešće ne odgovaraju realnim fiziološkim uslovima u pogledu volumena salive i vremena zadržavanja preparata u usnoj duplji, zbog čega je konstantno potrebno raditi na njihovom unapređenju (34). Pregled metoda za procenu efikasnosti maskiranja ukusa lekovitih supstanci dat je u Tabeli I.

**Tabela I** Pregled metoda za procenu efikasnosti maskiranja ukusa lekovite supstance.**Table I** Overview of methods for investigation of drug taste-masking effectiveness.**Metode za procenu efikasnosti maskiranja ukusa**

<i>Ustrovi ispitivanja</i>	<i>In vivo metoda</i>
Ispitanici	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4-30 zdravih, odraslih ispitanika, oba pola, raspona godina od 18 do 29, nepušača<sup>34</sup></li> </ul>
Granica gorčine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• standardizovan farmakopejski postupak koji se često modifikuje, sa ciljem boljeg prilagođavanja ispitanicima ili konkretnom preparatu.</li> <li>• pet do sedam standardnih rastvora lekovitih supstanci zapremine 1-10 ml i rastuće koncentracije mućka se u trajanju 5-60 s<sup>60-67</sup>;</li> <li>• kao vrednost gorčine lekovite supstance uzima se koncentracija lekovite supstance koja je pokazala minimalnu gorčinu bar kod jednog od ispitanika<sup>60, 65</sup> ili njena srednja vrednost, ako su se te koncentracije razlikovale od ispitanika do ispitanika<sup>67</sup>, ili umesto srednje vrednosti, opseg koncentracija<sup>63</sup></li> </ul>
Obuka ispitanika	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rastvori rastuće koncentracije lekovite supstance čiji ukus treba da se maskira<sup>60, 67</sup>;</li> <li>• rastvori standarda za gorak ukus (hinin-hidrohlorid)<sup>68</sup></li> </ul>
Primena formulacije	<ul style="list-style-type: none"> <li>• direktno stavljanje na jezik, bez prethodne pripreme preparata, uz dozvoljen blag pritisak jezikom o gornje nepce<sup>34</sup></li> </ul>
Procena ukusa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neposredno nakon primene<sup>69, 70</sup>; 10<sup>71</sup>, odnosno 30-40 s, nakon primene<sup>61, 72</sup>; ili nakon potpunog raspadanja preparata<sup>34, 69, 73</sup>;</li> <li>• dobijeni rezultati porede se sa numeričkim vrednostima gorčine rastvora dodeljenim u okviru obuke<sup>60, 67, 68</sup> ili se koriste različite deskriptivne ili vizuelne analogne skale (engl. <i>Visual Analog Scale</i>)<sup>69</sup></li> </ul>

**In vitro metode**

<i>Ustrovi ispitivanja</i>	<i>UV spektroskopija</i>	<i>Primena elektronskog jezika</i>
Aparatura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• čaše različitih dimenzija koje se mešaju na laboratorijskom šejkeru<sup>60, 63, 65, 72, 74</sup>;</li> <li>• aparatura tipa lopatice ili korpice za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance<sup>61, 67</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>αAstree</i> uređaj tipa elektronskog jezika;</li> <li>• <i>Insent</i> uređaj tipa elektronskog jezika<sup>34</sup></li> </ul>
Medijum	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prečišćena voda, fosfatni pufer, simulirana saliva<sup>34</sup>;</li> <li>• zapremina 10-100 ml<sup>63, 65, 72, 74</sup>, odnosno 500-900 ml<sup>61, 67</sup></li> <li>• temperatura 36,5-37,5 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prečišćena voda<sup>42, 72, 76</sup>, ili fosfatni pufer pH 6,8<sup>61</sup></li> <li>• zapremina vodenih rastvora uzorka za analizu iznosi 25-100 ml (<i>αAstree</i>), odnosno dva puta po 40 ml (<i>Insent</i>)<sup>34</sup></li> </ul>
Uzorkovanje	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>in-situ</i> svakih nekoliko sekundi<sup>60, 61</sup>;</li> <li>• <i>off-line</i> svakih 2-5 minuta<sup>34</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>off-line</i> merenja nakon rastvaranja i filtriranja</li> </ul>
Procena rezultata i <i>in vitro-in vivo</i> korelacija	<ul style="list-style-type: none"> <li>• poređenje koncentracije rastvorene lekovite supstance iz formulacije u kojoj je maskiran ukus, sa koncentracijom rastvorene lekovite supstance iz formulacije u kojoj nije primjenjen pristup maskiranju ukusa.</li> <li>• poređenje koncentracije rastvorene lekovite supstance <i>in vitro</i>, nakon definisanog vremena, sa <i>in vivo</i> određenom vrednošću za gorčinu te lekovite supstance<sup>60, 65</sup>;</li> <li>• evaluacija profila brzine rastvaranja lekovite supstance i postojanja tzv. <i>lag</i> vremena (10 s) kod formulacije sa maskiranim ukusom supstance, u poređenju sa formulacijom u kojoj ukus nije maskiran, koje je praćeno sporijim oslobađanjem lekovite supstance<sup>75</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• poređenje odgovora senzora za formulaciju sa maskiranim ukusom sa odgovorom placebo formulacije ili čiste supstance koristeći univarijantnu ili češće primenjivanu, multivarijantnu metodu statističke analize i preračunavanje <i>Euclidean</i>-ova udaljenosti<sup>77</sup>;</li> <li>• <i>in vitro-in vivo</i> korelacija između parametara senzora<sup>42</sup> ili <i>Euclidean</i>-ova udaljenosti<sup>72</sup> i stepena gorčine ispitivanog preparata procjenjenog na panelu ispitanika</li> </ul>

#### **2.4.1. *In vivo* metode**

Da bi se prilikom izvođenja *in vivo* ispitivanja obezbedila pouzdanost rezultata, neophodno je sprovesti odgovarajući odabir i obuku ispitanika i odrediti granicu gorčine ispitivane lekovite supstance (34). Granica gorčine određene lekovite supstance predstavlja izuzetno bitan parametar na osnovu kojeg se rezultati *in vivo* studije mogu dovesti u vezu sa rezultatima *in vitro* metoda za procenu efikasnosti primjenjenog postupka maskiranja gorkog ukusa (63, 72). U literaturi se mogu naći različiti podaci o zapremini rastvora koja se koristi prilikom procene stepena gorčine (Tabela I). Međutim, s obzirom da je rezidualna zapremina salive 1-2 ml (34) i da prisustvo stranog tela u usnoj duplji pozitivno utiče na stimulaciju produkcije salive (protok od oko 3 ml/min) (78), smatramo da zapremina rastvora 1-2 ml nije dovoljna za adekvatnu procenu stepena gorčine primjenjenog rastvora i/ili obuku ispitanika. Prilikom odabira ispitanika, pored uobičajenih zahteva navedenih u Tabeli I, poželjno je proceniti i njihovu osetljivost na različite ukuse, kako bi se interindividualna varijabilnost svela na najmanju moguću meru. Najveća varijabilnost, uočena prilikom pretrage literature, odnosi se na trenutak u kojem je vršena procena ukusa primjenjenog preparata. Na osnovu sprovedenih *in vivo* ispitivanja, smatramo da bi procenu ukusa trebalo sprovesti nakon raspadanja formulacije, zbog toga što raspadanje preparata predstavlja preduslov za njegovo olakšano gutanje i prihvatanje od strane pacijenata. U poslednje vreme, kao alternativa skupom i zahtevnom ispitivanju sa ljudima, ukus preparata se procenjuje testom sa miševima ili pacovima (engl. *brief-access taste aversion test – BATA*), s obzirom da je pokazana visoka korelacija među dobijenim rezultatima (79).

#### **2.4.2. *In vitro* metode**

Uzimajući u obzir da je za neprijatan ukus preparata odgovorna rastvorena lekovita supstanca koja interaguje sa gustatornim krvžicama na jeziku, suprimiranje ukusa se može postići smanjenjem rastvaranja supstance u usnoj duplji, tako da se efikasnost maskiranja ukusa može pratiti procenom uticaja na brzinu rastvaranja supstance iz preparata primenom UV spektroskopije. Ova metoda se može primeniti u slučaju kada samo jedna supstanca doprinosi neprijatnom ukusu preparata (34). S obzirom da se za ispitivanje koriste različite zapremine medijuma (Tabela I), moguće je da u slučaju velikih zapremina dobijena kinetika ne odgovara realnim *in vivo* uslovima, odnosno, da se u slučaju malih zapremina, ne uspostave *sink* uslovi. Najpouzdaniji način za procenu rastvorene lekovite supstance u prvim trenucima ispitivanja predstavlja *in-line* analiza primenom UV optičke sonde. Međutim, prilikom uvođenja sonde u sistem neophodno je razmotriti uticaj hidrodinamičkog efekta, rasipanja svetlosti i nagomilavanja čestica, s obzirom da mogu uticati na validnost rezultata (80). Iako je definisano da se maskiranje neprijatnog ukusa lekovite supstance može smatrati zadovoljavajućim ako se u toku prvih 5 minuta trajanja testa osloboди manje od 10%

lekovite supstance, intenzitet gorčine lekovite supstance u velikoj meri utiče na ovaj definisan kriterijum (81).

Za razliku od UV spektroskopije, primenom uređaja tipa elektronskog jezika, koji se sastoje od niza analitičkih senzora različitih osobina sa delimičnom ili ukrštenom selektivnošću, odnosno pomoću različitih veštačkih membrana i elektrohemijskih tehnika, moguća je analiza kompleksnih smeša ekscipijenasa i lekovitih supstanci uz detekciju specifične supstance (82). Međutim, potrebno je da uzorci za analizu budu u obliku rastvora, kako bi se sprečilo oštećenje lipidne membrane senzora i poželjno je da lekovita supstanca bude u jonizovanom obliku, kako bi se uspostavila zavisnost između različitih koncentracija lekovite supstance i odgovora senzora (34, 83, 84). Uprkos značaju savremenih uređaja tipa elektronskog jezika u proceni ukusa preparata, relativno komplikovana priprema uzorka za analizu, velike zapremine rastvora, kao i temperaturna osetljivost uređaja, ograničava njihovu primenu u slučaju različitih oralno-disperzibilnih farmaceutskih oblika lekova.

### 3. Zaključak

Pregledom literature se može zaključiti da je veliki napor uložen u razvoj različitih metoda kojima je moguće okarakterisati mehanička svojstva, raspadljivost, brzinu rastvaranja i ukus oralno-disperzibilnih preparata. Međutim, različiti faktori, kao što su odabir ekscipijenasa, način izrade/proizvodnje preparata, kao i primjenjen metod maskiranja ukusa određuju koja metoda karakterizacije će biti prihvatljivija. Najveća varijabilnost u postupcima karakterizacije uočena je pri ispitivanju raspadljivosti, kao i pri razvoju pogodne metode za procenu uspešnosti maskiranja ukusa. Na osnovu izloženog, može se zaključiti da je za adekvatnu procenu raspadljivosti oralno-disperzibilnih preparata potrebno uzeti u obzir mehanički stres, tj. silu pritiska jezika, što je posebno evidentno u slučaju različitih polimernih filmova.

Zbog nedostatka uniformnog pristupa proceni efikasnosti maskiranja ukusa lekovitih supstanci, pogotovu prilikom sprovođenja *in vivo* studija, kritički treba analizirati i tumačiti rezultate s obzirom da se može dogoditi da se, prema jednom pristupu, smatra da je postignuto zadovoljavajuće maskiranje ukusa, dok se prema drugom pristupu, tvrdi suprotno. Do toga može doći zbog razlike u intenzitetima gorčine supstanci, jer gorče supstance imaju nižu granicu gorčine i samim tim niži limit prihvatanja, što ukazuje na neophodnost razmatranja svake supstance posebno. Takođe, postoje značajne razlike u pogledu vremenskih tačaka u kojima se procenjuje efikasnosti maskiranja ukusa primenom *in vivo* (nekoliko sekundi), u odnosu na *in vitro* (*off-line* merenja, 1-5 min) tehnike, što otežava uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije. Da bi se analitičke metode dovele u vezu sa *in vivo* određenom granicom gorčine lekovite supstance, neophodno je dokazati da je limit kvantifikacije analitičke metode niži od humane granice za gorčinu za datu lekovitu supstancu.

## Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekta TR34007, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## Literatura

1. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: Orally Disintegrating Tablets. Washington, DC, 2008.
2. Slavkova M, Breitkreutz, J. Orodispersible drug formulations for children and elderly. Eur J Pharm Sci. 2015; 75; 2–9.
3. European Pharmacopoeia, 9<sup>th</sup> edition. Strasbourg: Council of Europe, 2017.
4. Awasthi R, Sharma G, Dua K, Kulkarni GT. Fast disintegrating drug delivery systems: A review with special emphasis on fast disintegrating tablets. J Chrono Drug Deliv. 2013; 4 (1); 15–30.
5. Bandari S, Mittapalli RK, Gannu R, Rao YM. Orodispersible tablets: An overview. Asian J Pharm. 2008; 2: 2–11.
6. Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simões S. Oral films: current status and future perspectives: I—galenical development and quality attributes. J Control Release. 2015; 206: 1–19.
7. Kim EY, Lee S, Jeon JY, Im YJ, Kim Y, Kim HI et al. Pharmacokinetics of a new orally soluble film formulation of sildenafil administered without water. Int J Clin Pharmacol Ther. 2014; 52: 437–45.
8. Nishimura M, Matsuura K, Tsukioka T, Yamashita H, Inagaki N, Sugiyama T et al. *In vitro* and *in vivo* characteristics of prochlorperazine oral disintegrating film. Int J Pharm. 2009; 368: 98–102.
9. Fell JT, Newton JM. Determination of tablet strength by the diametral compression test. J Pharm Sci. 1970; 59: 688–91.
10. Garsuch V, Breitkreutz J. Novel analytical methods for the characterization of oral wafers. Eur J Pharm Biopharm. 2009; 73: 195–201.
11. DIN, EN ISO. 527-1. Plastics—Determination of tensile properties-Part 1: General principle, 1996.
12. DIN, EN ISO. 527-3. Plastics—Determination of tensile properties-Part 3: Test conditions for films and sheets, 2003.
13. Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. Eur J Pharm Biopharm. 2011; 77: 187–99.
14. Dixit RP, Puthli, SP. Oral strip technology: overview and future potential. J Control Release. 2009; 139 (2): 94–107.
15. Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK.. Buccal bioadhesive drug delivery – a promising option for orally less efficient drugs. J Control Release. 2006; 114: 15–40.

16. Preis M, Woertz C, Kleinebudde P, Breitkreutz J. Oromucosal film preparations: classification and characterization methods. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013; 10 (9): 1303–17.
17. Bodmeier R, Paeratakul O. Dry and wet strengths of polymeric films prepared from an aqueous colloidal polymer dispersion, Eudragit RS30D. *Int J Pharm.* 1993; 96 (1-3): 129–38.
18. Radebaugh GW, Murtha JL, Julian TN, Bondi JN. Methods for evaluating the puncture and shear properties of pharmaceutical polymeric films. *Int J Pharm.* 1988; 45 (1-2): 39–46.
19. Preis M, Knop K, Breitkreutz J. Mechanical strength test for orodispersible and buccal films. *Int J Pharm.* 2014; 461 (1-2): 22–29.
20. Drašković M, Vasiljević I, Trifković K, Vasiljević D, Paročić J. Influence of plasticizer and superdisintegrants on disintegration and mechanical properties of hydroxypropyl cellulose based orodispersible films. 11<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Spain/Granada, March 2018.
21. Drašković, Vasiljević I, Docic L, Vasiljević D, Paročić J, Medarević D. Orodispersible films: an investigation into relationship between viscoelastic properties and disintegration. 2<sup>nd</sup> European Conference on Pharmaceutics, Poland/Krakow, April, 2017.
22. Chawla KK, Meyers MA. Mechanical behavior of materials. 2<sup>nd</sup> ed. Upper Saddle River: Prentice Hall; 1999. 126 p.
23. Amidon GE, Secrest PJ, Mudie D. Particle, powder and compact characterization. In: Qiu Y, Chen Y, Zhang GG, Liu L, Porter W, eds. Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice. San Diego (CA): Academic Press; 2009. 177 p.
24. Visscher JC, Dohmen WM, Hinrichs WL, Breitkreutz J, Frijlink HW, Woerdenbag HJ. Quality by design approach for optimizing the formulation and physical properties of extemporaneously prepared orodispersible films. *Int J Pharm.* 2015; 485 (1-2): 70–6.
25. The United States Pharmacopeia and The National Formulary, USP 41–NF 36. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2018.
26. Brniak W, Jachowicz R, Krupa A, Skorka T, Niwinski K. Evaluation of co-processed excipients used for direct compression of orally disintegrating tablets (ODT) using novel disintegration apparatus. *Pharm Dev Technol.* 2013; 18 (2): 464–74.
27. Abdelbary G, Eouani C, Prinderre P, Joachim J, Reynier J, Piccerelle P. Determination of the *in vitro* disintegration profile of rapidly disintegrating tablets and correlation with oral disintegration. *Int J Pharm.* 2005; 292: 29–41.
28. Watanabe Y, Koizumi K, Zama Y, Kiriyama M, Matsumoto Y, Matsumoto M. New compressed tablet rapidly disintegrating in saliva in the mouth using crystalline cellulose and a disintegrant. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18: 1308–10.
29. Bi Y, Sunada H, Yonezawa Y, Danjo K, Otsuka A, Iida K. Preparation and evaluation of a compressed tablet rapidly disintegrating in the oral cavity. *Chem Pharm Bull.* 1996; 44: 2121–7.
30. Dor PJ, Fix JA. *In vitro* determination of disintegration time of quick-dissolve tablets using a new method. *Pharm Dev Technol.* 2000; 5: 575–7.

31. Narazaki R, Harada T, Takami N, Kato Y, Ohwaki T. A new method for disintegration studies of rapid disintegrating tablet. *Chem Pharm Bull.* 2004; 52 (6): 704–7.
32. Harada T, Narazaki R, Nagira S, Ohwaki T, Aoki S, Iwamoto K. Evaluation of the disintegration properties of commercial famotidine 20 mg orally disintegrating tablets using a simple new test and human sensory test. *Chem Pharm Bull.* 2006; 54: 1072–5.
33. Preis M, Gronkowsky D, Grytzan D, Breitkreutz J. Comparative study on novel test systems to determine disintegration time of orodispersible films. *J Pharm Pharmacol.* 2014; 66 (8): 1102–11.
34. Pein M, Preis M, Eckert C, Kiene FE. Taste-masking assessment of solid oral dosage forms—A critical review. *Int J Pharm.* 2014; 465 (1): 239–54.
35. Douroumis DD, Gryczke A, Schminke S. Development and evaluation of cetirizine HCl taste-masked oral disintegrating tablets. *AAPS PharmSciTech.* 2011; 12 (1): 141–51.
36. Dey P, Maiti, S. Orodispersible tablets: A new trend in drug delivery. *J Nat Sc Biol Med.* 2010; 1 (1): 2–5.
37. Khan S, Kataria P, Nakhat P, Yeole P. Taste masking of ondansetron hydrochloride by polymer carrier system and formulation of rapid-disintegrating tablets. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8 (2): E127–E133.
38. Sunada H, Bi Y. Preparation, evaluation and optimization of rapidly disintegrating tablets. *Powder Technol.* 2002; 122: 188–98.
39. Sarfraz RM, Khan HU, Mahmood A, Ahmad M, Maheen S, Sher M. Formulation and evaluation of mouth disintegrating tablets of atenolol and atorvastatin. *Indian J Pharm Sci.* 2015; 77 (1): 83–90.
40. Pabari RM, Ramtoola Z. Application of face centred central composite design to optimise compression force and tablet diameter for the formulation of mechanically strong and fast disintegrating orodispersible tablets. *Int J Pharm.* 2012; 430: 18–25.
41. Radwan A, WagnerM, Amidon GL, Langguth P. Bio-predictive tablet disintegration: Effect of water diffusivity, fluid flow, food composition and test conditions. *Eur J Pharm Sci.* 2014; 57: 273–9.
42. Drašković M, Djuriš J, Ibrić S, Paročić J. Functionality and performance evaluation of directly compressible co-processed excipients based on dynamic compaction analysis and percolation theory. *Powder Technol.* 2018; 326: 292–301.
43. Harada T, Uchida T, Yoshida M, Kobayashi Y, Narazaki R, Ohwaki T. A new method for evaluating the bitterness of medicines in development using a taste sensor and a disintegration testing apparatus. *Chem Pharm Bull.* 2010; 58: 1009–14.
44. Maheswari KM, Devineni PK, Deekonda S, Shaik S, Uppala NP, Nalluri BN. Development and evaluation of mouth dissolving films of amlodipine besylate for enhanced therapeutic efficacy. *J Pharm.* 2014; 2014: 1–10.
45. El-Setouhy DA, El-Malak NSA. Formulation of a novel tianeptine sodium orodispersible film. *AAPS PharmSciTech.* 2010; 11 (3): 1018–25.

46. Mahesh A, Shastri N, Sadanandam M. Development of taste masked fast disintegrating films of levocetirizine dihydrochloride for oral use. *Curr Drug Deliv.* 2010; 7 (1): 21–7.
47. Preis M, Pein M, Breitkreutz J. Development of a taste-masked orodispersible film containing dimenhydrinate. *Pharm.* 2012; 4 (4): 551–62.
48. Sakuda Y, Ito A, Sasatsu M, Machida Y. Preparation and evaluation of medicinal carbon oral films. *Chem Pharm Bull.* 2010; 58 (4): 454–7.
49. Brniak W, Jachowicz R, Pelka P. The practical approach to the evaluation of methods used to determine the disintegration time of orally disintegrating tablets (ODTs). *Saudi Pharm J.* 2015; 23 (4): 437–43.
50. U.S. Food and Drug Administration [internet]. Drug databases. Dissolution methods. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp\\_getallData.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm).
51. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the investigation of bioequivalence. London, 2010.
52. Kraemer J, Gajendran J, Guillot A, Schichtel J, Tuereli A. Dissolution testing of orally disintegrating tablets. *J Pharm Pharmacol.* 2012; 64 (7): 911–18.
53. Klancke J. Dissolution testing of orally disintegrating tablets. *Dissolut Technol.* 2003; 10 (2): 6–9.
54. Pimparade MB, Vo A, Maurya AS, Bae J, Morott JT, Feng X et al. Development and evaluation of an oral fast disintegrating anti-allergic film using hot-melt extrusion technology. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017; 119: 81–90.
55. Mashru RC, Sutariya VB, Sankalia MG, Parikh PP. Development and evaluation of fast dissolving film of salbutamol sulphate. *Drug Dev Ind Pharm.* 2005; 31: 25–34.
56. Low AQJ, Parmentier J, Khong, YM, Chai CCE, Tun TY, Berania JE et al. Effect of type and ratio of solubilising polymer on characteristics of hot-melt extruded orodispersible films. *Int J Pharm.* 2013; 455: 138–47.
57. Krampe R, Sieber D, Pein-Hackelbusch M, Breitkreutz, J. A new biorelevant dissolution method for orodispersible films. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016; 98: 20–5.
58. Sievens-Figueroa L, Pandya N, Bhakay A, Keyvan G, Michniak-Kohn B, Bilgili E et al. Using USP I and USP IV for discriminating dissolution rates of nano-and microparticle-loaded pharmaceutical strip-films. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13 (4), 1473–82.
59. Eckert C, Pein M, Reimann J, Breitkreutz J. Taste evaluation of multicomponent mixtures using a human taste panel, electronic taste sensing systems and HPLC. *Sens. Actuators B: Chem.* 2013; 182: 294–9.
60. Drašković M, Medarević D, Aleksić I, Parožić J. *In vitro* and *in vivo* investigation of taste-masking effectiveness of Eudragit E PO as drug particle coating agent in orally disintegrating tablets. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017; 43 (5): 723–31.
61. Pimparade MB, Morott JT, Park JB, Kulkarni VI, Majumdar S, Murthy SN, et al. Development of taste masked caffeine citrate formulations utilizing hot meltextrusion technology and *in vitro–in vivo* evaluations. *Int J Pharm.* 2015; 487: 167–76.

62. Kulkarni AP, Khedkar AB, Lahotib SR, Dehghanb MHD. Development of oral disintegrating tablet of rizatriptan benzoate with inhibited bitter taste. AEJSR. 2012; 7 (2): 47–57.
63. Yan YD, Woo JS, Kang JH, Yong CS, Choi HG. Preparation and evaluation of taste-masked donepezil hydrochloride orally disintegrating tablets. Biol Pharm Bull. 2010; 33 (8): 1364–70.
64. Madgulkar AR, Bhalekar MR, Padalkar RR. Formulation design and optimization of novel taste masked mouth-dissolving tablets of tramadol having adequate mechanical strength. AAPS PharmSciTech, 2009; 10 (2): 574–81.
65. Bora D, Borude P, Bhise K. Taste masking by spray-drying technique. AAPS PharmSciTech. 2008; 9 (4): 1159–64.
66. Patel AR, Vavia PR. Preparation and evaluation of taste masked famotidine formulation using drug/ $\beta$ -cyclodextrin/polymer ternary complexation approach. AAPS PharmSciTech. 2008; 9 (2): 544–50.
67. Albertini B, Cavallari C, Passerini N, Voinovich D, González-Rodríguez M. L, Magarotto L et al. Characterization and taste-masking evaluation of acetaminophen granules: comparison between different preparation methods in a high-shear mixer. Eur J Pharm Sci. 2004; 21 (2): 295–303.
68. Suzuki H, Onishi H, Takahashi Y, Iwata M, Machida Y. Development of oral acetaminophen chewable tablets with inhibited bitter taste. Int J Pharm. 2003; 251 (1): 123–32.
69. Nakano Y, Maeda A, Uchida S, Namiki N. Preparation and evaluation of unpleasant taste-masked pioglitazone orally disintegrating tablets. Int J Pharm. 2013; 446 (1): 160–65.
70. Sheshala R, Khan N, Chitneni M, Darwis Y. Formulation and *in vivo* evaluation of ondansetron orally disintegrating tablets using different superdisintegrants. Arch. Pharmacal Res. 2011; 34 (11): 1945–56
71. Sharma D, Chopra R, Bedi N. Development and evaluation of paracetamol taste masked orally disintegrating tablets using polymer coating technique. Int J Pharm Pharm Sci. 2012; 4 (Suppl 3): 129–34.
72. Tokuyama E, Matsunaga C, Yoshida K, Mifsud JC, Irie T, Yoshida M et al. Famotidine orally disintegrating tablets: bitterness comparison of original and generic products. Chem Pharm Bull. 2009; 57: 382–7.
73. Kim JI, Cho SM, Cui JH, Cao QR, Oh E, Lee B.J. *In vitro* and *in vivo* correlation of disintegration and bitter taste masking using orally disintegrating tablet containing ion exchange resin-drug complex. Int J Pharm. 2013; 455 (1): 31–9.
74. Cantor SL, Khan MA, Gupta A. Development and optimization of taste-masked orally disintegrating tablets (ODTs) of clindamycin hydrochloride. Drug Dev Ind Pharm. 2015; 41 (7): 1156–64.
75. Guffon N, Kibleur Y, Copalu W, Tissen C, Breitkreutz J. Developing a new formulation of sodium phenylbutyrate. Arch Dis Child. 2012; 97 (12): 1081–5.
76. Guhmann M, Preis M, Gerber F, Pöllinger N, Breitkreutz J, Weitschies W. Development of oral taste masked diclofenac formulations using a taste sensing system. Int J Pharm. 2012; 438 (1): 81–90.

77. Woertz K, Tissen C, Kleinebudde P, Breitkreutz J. Rational development of taste masked oral liquids guided by an electronic tongue. *Int J Pharm.* 2010; 400: 114–23.
78. Rathbone MJ, Drummond BK., Tucker IG. The oral cavity as a site for systemic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1994;13 (1-2): 1–22.
79. Soto J, Winzenburg G, Turner R, Dessel-Brethes S, Sheng Y, Orlu-Gul M et al. Assessing the bitter taste of medicines: A comparison between rat taste panels (via the brief-access taste aversion (BATA) model and human taste panels. *Int J Pharm.* 2016; 511 (2): 1127–8.
80. Lu X, Lozano R, Shah P. In situ dissolution testing using different UV fiber optic probes and instruments. *Dissolut. Technol.* 2003; 10 (4): 6–16.
81. Siewert M, Dressman J, Brown CK, Shah VP, Aiache JM, Aoyagi N et al. FIP/AAPS guidelines to dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech.* 2003;4 (1): 43–52.
82. Woertz K, Tissen C, Kleinebudde P, Breitkreutz J. Taste sensing systems (electronic tongues) for pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2011; 417 (1): 256–71.
83. Woertz K., Tissen C, Kleinebudde P, Breitkreutz J. A comparative study on two electronic tongues for pharmaceutical formulation development. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 55 (2): 272–81.
84. Woertz K, Tissen C, Kleinebudde P, Breitkreutz J. Performance qualification of an electronic tongue based on ICH guideline Q2. *J Pharm Biomed Anal.* 2010; 51: 497–506.

# **Characterization of orodispersible tablets and orodispersible films**

**Milica Drašković\*, Sandra Cvijić, Svetlana Iбриć, Jelena Parojčić**

University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade

\*corresponding author: Milica Drašković, e-mail: milicam@pharmacy.bg.ac.rs

---

## **Summary**

Orodispersible dosage forms are intended to be placed on tongue where, in contact with limited saliva volume, fast disintegration, followed by facilitated swallowing, occurred. Intraoral disintegration might be accompanied by drug release and dissolution in oral cavity. Dissolved drug could interact with receptors on taste buds causing taste sensation. The most important critical quality attributes of orodispersible dosage forms are acceptable mechanical resistance, fast disintegration and pleasant taste which have to be monitored and evaluated during formulation development and production. However, compendial methods for orodispersible dosage forms characterization are still lacking, while many authors attempt to develop different, more suitable approaches. The highest variability during determination of disintegration properties is observed. It can be concluded that for the proper disintegration assessment influence of tongue force have to be considered, especially in the case of different polymeric orodispersible films. For reliable development of *in vivo* study for evaluation of taste-masking efficacy, proper selection and training of panelists accompanied by bitterness threshold determination are of the utmost importance. In order to correlate *in vitro* and *in vivo* data, it is necessary to develop analytical method for evaluation of taste-masking efficacy that mimic, in great extent, physiological intraoral conditions.

**Keywords:** orodispersible tablets, orodispersible films, disintegration, mechanical properties, taste-masking

---

## Molekulsко modelovanje i analiza 3D-strukture farmakofore selektivnih PI3K- $\alpha$ inhibitora kao antitumorskih agenasa

Milan Jovanović <sup>1</sup>, Katarina Nikolić <sup>1</sup>, Žarko Gagić <sup>2\*</sup>, Danica Agbaba <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,  
Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,  
Save Mrkalja 14, 78000 Banja Luka, Bosna i Hercegovina

\*autor za korespondenciju: Žarko Gagić

Tel: +387 51 340 106; e-mail: zarko.gagic@med.unibl.org

---

### Kratak sadržaj

Značaj aktivacije fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) u procesima nastanka i rasta ćelija karcinoma doveo je do velikog interesovanja za razvijanje novih antitumorskih lekova koji inhibiraju PI3K-Akt signalni put. Najnovija istraživanja pokazuju da je kod većine tipova karcinoma izmenjena aktivnost p110 $\alpha$  izoforme PI3K kinaze, te se danas poseban akcenat stavlja na razvijanje specifičnih PI3K- $\alpha$  inhibitora. Na seriji od 92 PI3K- $\alpha$  inhibitora, čiji su podaci o eksperimentalno određenoj inhibitornoj aktivnosti prikupljeni iz literature, sprovedene su 3D studije kvantitativnog odnosa između strukture i dejstva (3D-QSAR). Sve molekulske strukture su prethodno optimizovane upotreбom semiempirijske PM3 i *ab initio* Hartree-Fock/3-21G metode, a modelovanje je vršeno primenom PLS regresione analize najmanjih kvadrata. Izračunati parametri interne ( $R^2=0,84$ ;  $Q^2=0,67$ ) i eksterne ( $R^2_{pred}=0,681$ ;  $r^2_m=0,594$ ;  $\Delta r^2_m=0,00039$ ) validacije ukazuju na pouzdanost i dobru moć predviđanja formiranog 3D-QSAR modela. Analizom varijabli određena je struktura farmakofore koja podrazumeava: prisustvo donora i akceptora vodonične veze na rastojanju 18-18,4 Å ili 12-12,4 Å; hidrofobni region na rastojanju od 15,2-15,6 Å od donora vodonične veze kao i prisustvo sternog centra na optimalnom rastojanju od donora i akceptora vodonične veze. Ovi rezultati će imati značaj u odabiru vodećih jedinjenja na kojima će biti moguće vršiti ciljane strukturne modifikacije za dizajniranje novih selektivnih PI3K- $\alpha$  inhibitora kao potencijalnih antineoplastika.

---

**Ključне reči:** 3D-QSAR, farmakofora, PI3K- $\alpha$ , inhibitor, tumor

## Uvod

Fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) su familija lipidnih kinaza koje fosforilišu inozitolne fosfolipide na poziciji 3 inozitola, pre svega koristeći fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat kao supstrat, pri čemu se stvara fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (PIP3). PIP3 se vezuje za plekstrinski homologni domen AKT serin/treonin kinaze (protein kinaza B ili PKB) i 3-fosfatidilinozitol zavisne protein kinaze-1 (PDK1), što dovodi do njihove translokacije u plazma membranu. AKT, kada je vezana za ćelijsku membranu, postaje aktivna i fosforiliše više ciljnih molekula uključenih u opstanak ćelije, njen ciklus, razvoj, motilitet i metabolizam [1, 2].

PI3K su grupisane u tri klase, I, II i III, na osnovu njihovih strukturnih karakteristika i specifičnosti za supstrate. Klasa I je dalje podeljena na klasu IA kinaza koje su aktivisane od strane receptora vezanih za tirozin kinaze, receptora vezanih za G-protein i onkoproteina, i na klasu IB kinaza koje su aktivisane samo od strane receptora vezanih za G-protein. Klasa IA PI3K je skup heterodimernih lipidnih kinaza koje se sastoje od p100 katalitičke subjedinice i regulatorne subjedinice koja reguliše vezivanje za receptor, aktivaciju i lokalizaciju PI3K enzima. Mutacije jednog od gena koji kodira prevashodno p110 $\alpha$  subjedinicu PI3K – PI3KCA se u visokoj meri mogu naći u mnogim tipovima humanog karcinoma, uključujući tumore mozga, dojki, kolona, jetre, želuca i jajnika [3-6].

Postoje ohrabrujući podaci o blokiranju rasta tumora inhibicijom PI3K enzima [7, 8]. Međutim, neki stariji inhibitori neselektivni za određenu PI3K izoformu, kao što su LY294002 i vortmanin, dovode do izraženih neželjenih efekata na insulinski signalni put i imuni odgovor. Ciljanom selektivnom inhibicijom određene PI3K izoforme, poput p110 $\alpha$  subjedinice PI3K (PI3K- $\alpha$ ), može se značajno povećati efikasnost antineoplastika i smanjiti neželjeni efekti [9].

Cilj ovog rada je definisanje strukture farmakofore selektivnih PI3K-p110 $\alpha$  (PI3K- $\alpha$ ) inhibitora studijom kvantitativnog odnosa između strukture i dejstva (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR). Definisane molekulske determinante i formirani 3D-QSAR model se mogu dalje koristiti za dizajn novih potentnijih inhibitora i predviđanje njihove aktivnosti.

## Eksperimentalni deo

Za kreiranje 3D-QSAR modela korišten je dataset od 92 PI3K- $\alpha$  inhibitora zajedno sa njihovim eksperimentalno dobijenim pKi ( $pKi = -\log Ki$ ) vrednostima koji su preuzeti iz ChEMBL baze podataka (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) [10-13]. Početni dataset podeljen je na dva dela: trening set (62 molekula) od kojeg je formiran model, i test set (30 molekula) koji je korišten za eksternu validaciju modela.

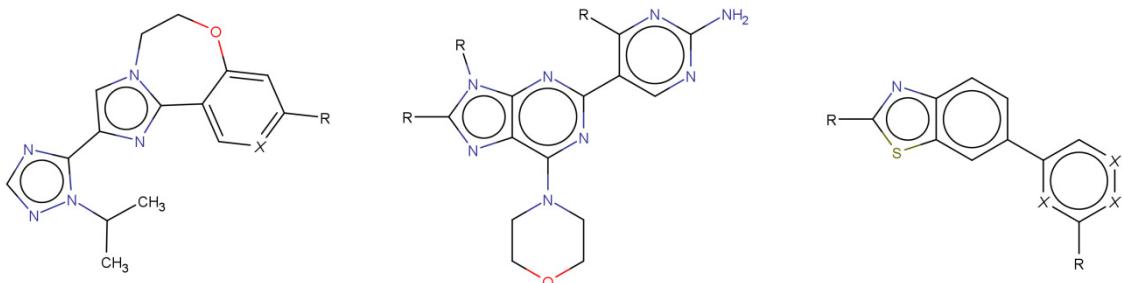
Za sve strukture su određeni dominantni oblici pri pH=7,4 primenom MarvinSketch programa [14]. Budući da je 3D-QSAR visoko zavisan od konformacije molekule, pre same QSAR studije izvršena je geometrijska optimizacija struktura kako bi se postigao energetski minimum. Dominantni oblici su optimizovani pomoću PM3 semi-empirijske metode (Parameterized Model revision 3), a potom i preciznije *ab initio* Hartree-Fock/3-21G kvantno hemijske metode, korištenjem Gaussian 98W [15] programa u Chem3D Ultra 7.0 [16] programskom paketu.

Za pravljenje samog 3D-QSAR modela korišten je Pentacle 1.07 [17] program koji koristi PLS (Partial Least Square) regresionu metodu. Model je formiran upotrebom GRIND deskriptora (GRid-INdependent descriptors), izvedenih iz polja molekulskih interakcija (Molecular Interaction Fields - MIFs) kao nezavisnih varijabli, i *in vitro* pKi aktivnosti kao zavisnih varijabli. Pri izračunavanju GRIND deskriptora program koristi 4 hemijske probe koje simuliraju interakciju liganda sa cilnjim mestom dejstva: DRY proba predstavlja hidrofobnu interakciju, O proba (karbonilni kiseonik) opisuje akceptora vodonične veze, N1 (amidni azot) predstavlja donora vodonične veze i TIP proba opisuje sternu interakciju. Najvažniji regioni koji predstavljaju povoljne interakcije između probe i liganda izdvojeni su na osnovu dva kriterijuma: intenziteta polja i udaljenosti između izabranih centara. Za izdvajanje najbitnijih polja interakcije korišten je ALMOND algoritam. Za kodiranje polja korištena je CLACC (Consistently Large Auto and Cross Correlation) metodologija koja izdvaja najkonzistentnije varijable unutar serije strukturno srodnih molekula koristeći korelaciju između istih i različitih centara. Primenom FFD (Fractional Factorial Design) algoritma suksesivno su uklanjane manje važne varijable u PLS jednačini do formiranja modela sa najvišim vrednostima  $R^2$  i  $Q^2$  parametara [17].

Za dobar 3D-QSAR model  $Q^2$  vrednost treba da bude veća od 0,5 i vrednost  $R^2$  veća od 0,6 [18]. Radi procene sposobnosti modela da pouzdano predviđa aktivnost novih jedinjenja izvršena je eksterna validacija formiranog modela izračunavanjem  $R_{\text{pred}}^2$ , RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) i  $r^2_m$  parametara za test set. Za dobru moć predviđanja QSAR modela vrednosti  $R_{\text{pred}}^2$ ,  $r^2_m$ ,  $r'^2_m$  i treba da budu veće od 0,5, a  $\Delta r^2_m$  manje od 0,2 [19].

## Rezultati i diskusija

Na osnovu PCA analize i strukturnih karakteristika jedinjenja, dataset je podeljen na trening set od 62 molekula i test set od 30 molekula. Ispitivana jedinjenja poseduju strukturni diverzitet (Slika 1) kao i dovoljno velik interval inhibitornih aktivnosti (pKi: 5,22-10,52) (Tabela I), što je omogućilo formiranje robusnog 3D-QSAR modela sa širokim domenom primene.



**Slika 1. Opšte strukture jedinjenja iz dataseta.**

**Figure 1. General structures of compounds from dataset.**

Upotrebom trening seta formiran je PLS regresioni model sa 2 latentne varijable i parametrima  $R^2=0,84$  i  $Q^2=0,67$  koji zadovoljavaju uslove interne validacije. Pravu predikcionu moć modela moguće je proceniti samo predviđanjem aktivnosti eksterne grupe jedinjenja koja nisu učestvovala u građenju modela, odnosno potrebno je izvršiti eksternu validaciju. U tu svrhu korišten je test set, a izračunate vrednosti parametara  $R^2_{\text{pred}}=0,681$  kao i  $r^2_m=0,594$  i  $\Delta r^2_m=0,00039$  koji predstavljaju najstrožije kriterijume eksterne validacije, ukazuju na dobru moć predviđanja 3D-QSAR modela. Eksperimentalne i predviđene pKi vrednosti jedinjenja iz dataseta kao i statistički parametri modela prikazani su u Tabeli I.

**Tabela I** Eksperimentalne i predviđene aktivnosti jedinjenja iz dataseta i statistički parametri 3D-QSAR modela.

**Table I** Experimental and predicted activities of compounds from dataset and statistical parameters of 3D-QSAR model.

Trening set							
ID	ChembL ID	pKi eksp.	pKi pred.	ID	ChembL ID	pKi eksp.	pKi pred.
PI3K-1	CHEMBL3770993	10,52	9,78	PI3K-46	CHEMBL1773592	7,51	7,32
PI3K-2	CHEMBL3770306	10	9,30	PI3K-48	CHEMBL1773582	7,42	7,58
PI3K-4	CHEMBL3770325	9,7	9,39	PI3K-53	CHEMBL1773584	7,33	7,02
PI3K-6	CHEMBL3770140	9,52	9,38	PI3K-55	CHEMBL1773601	7,32	7,85
PI3K-7	CHEMBL3770717	9,52	9,66	PI3K-56	CHEMBL1773598	7,32	7,25
PI3K-8	CHEMBL2387080	9,52	9,52	PI3K-58	CHEMBL1615188	7,28	7,24
PI3K-10	CHEMBL3769966	9,05	9,49	PI3K-60	CHEMBL1773595	7,28	7,32
PI3K-12	CHEMBL3770332	9	8,66	PI3K-61	CHEMBL3356894	7,25	7,07
PI3K-13	CHEMBL3770824	9	9,44	PI3K-63	CHEMBL1773564	7,24	7,04
PI3K-14	CHEMBL1773736	8,96	9,13	PI3K-64	CHEMBL1773596	7,23	7,33
PI3K-16	CHEMBL1615189	8,92	8,70	PI3K-65	CHEMBL1773560	7,22	6,95
PI3K-17	CHEMBL1773603	8,92	8,46	PI3K-67	CHEMBL1773578	7,19	7,09
PI3K-18	CHEMBL3770092	8,89	8,65	PI3K-69	CHEMBL3356896	7,14	7,22
PI3K-20	CHEMBL1773605	8,85	8,54	PI3K-70	CHEMBL1773575	7,12	7,84
PI3K-21	CHEMBL1773599	8,8	7,85	PI3K-72	CHEMBL1773579	7,08	6,92
PI3K-23	CHEMBL3814414	8,7	8,56	PI3K-73	CHEMBL1773588	7,07	6,87
PI3K-25	CHEMBL3813906	8,52	8,79	PI3K-75	CHEMBL3356898	6,98	7,03
PI3K-26	CHEMBL3814925	8,52	8,62	PI3K-76	CHEMBL1773586	6,98	7,06
PI3K-28	CHEMBL3769972	8,51	8,94	PI3K-78	CHEMBL1773567	6,95	6,77
PI3K-30	CHEMBL3770615	8,44	8,49	PI3K-79	CHEMBL1773566	6,94	6,57
PI3K-31	CHEMBL3770644	8,44	8,96	PI3K-80	CHEMBL1773574	6,93	6,78
PI3K-32	CHEMBL3814365	8,3	8,88	PI3K-82	CHEMBL3356900	6,88	6,40
PI3K-33	CHEMBL3815084	8,3	8,78	PI3K-84	CHEMBL1773597	6,84	7,20
PI3K-35	CHEMBL3356895	8,16	7,77	PI3K-86	CHEMBL1773571	6,48	6,36
PI3K-36	CHEMBL1773600	8,05	7,35	PI3K-87	CHEMBL1773589	6,22	7,00
PI3K-38	CHEMBL1773558	7,89	8,02	PI3K-90	CHEMBL1773570	5,81	6,64
PI3K-39	CHEMBL3356892	7,8	7,89	PI3K-91	CHEMBL1773573	5,5	6,22
PI3K-41	CHEMBL1773559	7,75	7,50	PI3K-92	CHEMBL1773587	5,22	6,53
PI3K-42	CHEMBL3356897	7,7	7,15	PI3K-49	CHEMBL1773583	7,4	7,01
PI3K-44	CHEMBL3769857	7,52	8,28	PI3K-51	CHEMBL1773593	7,36	7,53
PI3K-45	CHEMBL1773594	7,51	7,01	PI3K-52	CHEMBL1773591	7,34	7,17

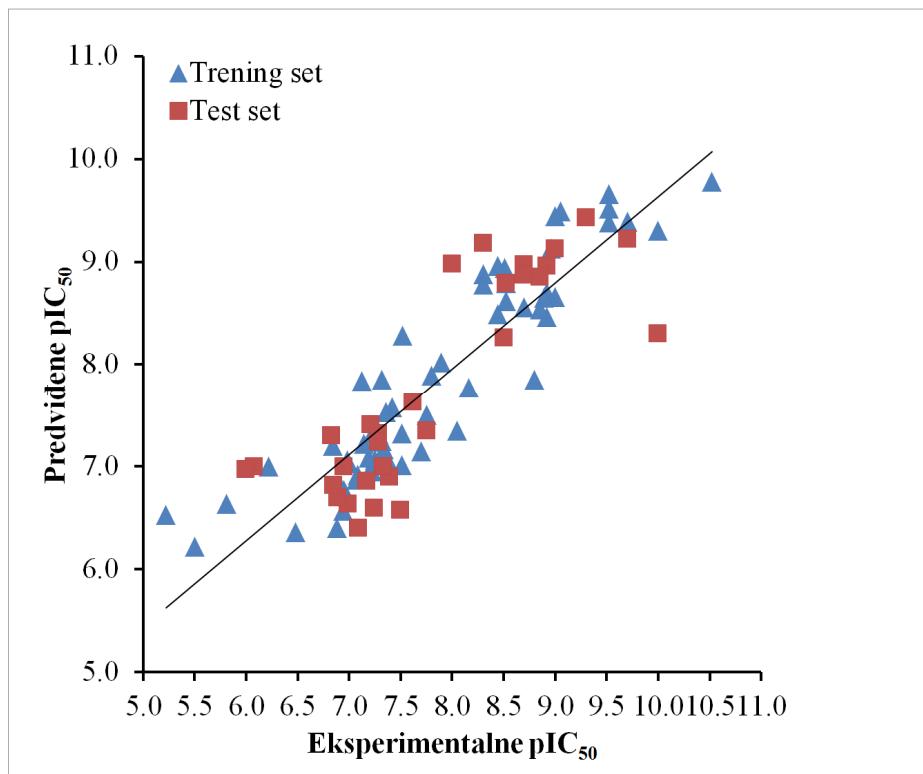
**R<sup>2</sup> = 0,84**

**Q<sup>2</sup> = 0,67**

**RMSEE = 0,442**

Test set							
Molekul	Chembl ID	pKi eksp.	pKi pred.	Molekul	Chembl ID	pKi eksp.	pKi pred.
PI3K-3	CHEMBL3770709	10	8,30	PI3K-50	CHEMBL1773577	7,39	6,90
PI3K-5	CHEMBL3771364	9,7	9,22	PI3K-54	CHEMBL1773561	7,33	7,00
PI3K-9	CHEMBL3769854	9,3	9,43	PI3K-57	CHEMBL3356893	7,28	7,32
PI3K-11	CHEMBL2178606	9	9,13	PI3K-59	CHEMBL1615188	7,28	7,24
PI3K-15	CHEMBL3770630	8,92	8,96	PI3K-62	CHEMBL1773563	7,24	6,60
PI3K-19	CHEMBL1773602	8,85	8,85	PI3K-66	CHEMBL1773576	7,21	7,41
PI3K-22	CHEMBL3813842	8,7	8,97	PI3K-68	CHEMBL3356901	7,17	6,86
PI3K-24	CHEMBL2178608	8,7	8,87	PI3K-71	CHEMBL1773581	7,09	6,40
PI3K-27	CHEMBL3814544	8,52	8,79	PI3K-74	CHEMBL3356899	6,99	6,64
PI3K-29	CHEMBL3769603	8,5	8,26	PI3K-77	CHEMBL1773565	6,95	7,00
PI3K-34	CHEMBL1922094	8,3	9,18	PI3K-81	CHEMBL1773562	6,89	6,70
PI3K-37	CHEMBL3814933	8	8,98	PI3K-83	CHEMBL1773569	6,85	6,82
PI3K-40	CHEMBL1773077	7,75	7,35	PI3K-85	CHEMBL1773580	6,83	7,30
PI3K-43	CHEMBL1773572	7,62	7,63	PI3K-88	CHEMBL1773590	6,08	7,00
PI3K-47	CHEMBL1773568	7,5	6,58	PI3K-89	CHEMBL3770709	6	6,97
$R^2_{\text{pred}} = 0,681$		$\text{RMSEP} = 0,567$			$r^2_m = 0,594$		
$= 0,594$		$\Delta r^2_m = 0,0004$					

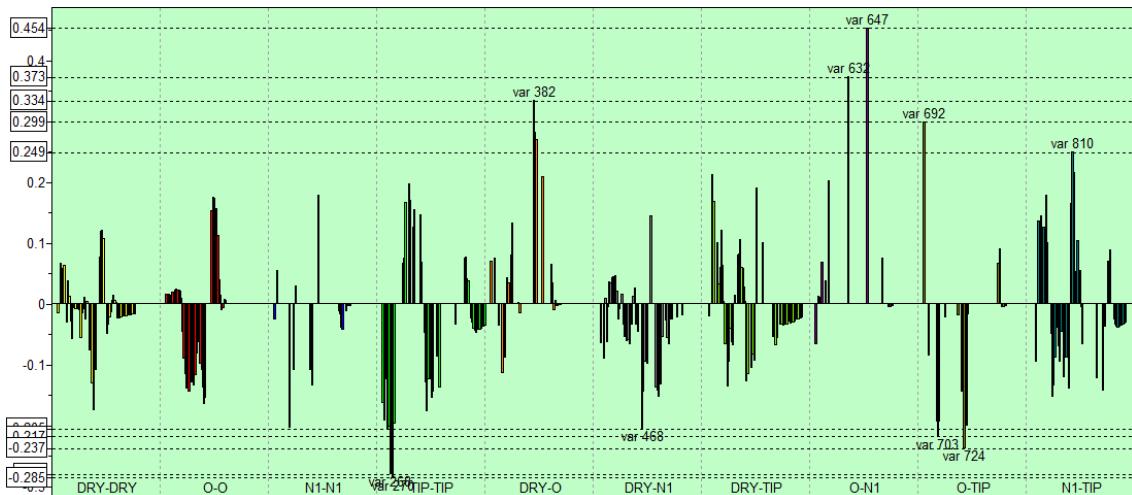
Sa grafika eksperimentalnih u odnosu na predviđene aktivnosti (Slika 2) može se videti da su pKi vrednosti ravnomerno raspoređene oko prave X=Y, potvrđujući kvalitet formiranog modela.



**Slika 2. Grafik eksperimentalnih u odnosu na predviđene pKi vrednosti.**

**Figure 2. Plot of experimental *versus* predicted pKi values.**

Kao rezultat 3D-QSAR studije dobijen je koreogram na kojem su u vidu pikova prikazane najznačajnije varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na aktivnost (Slika 3). Detaljan opis ovih varijabli dat je u Tabeli II.



**Slika 3. Grafik PLS koeficijenata GRIND varijabli.**

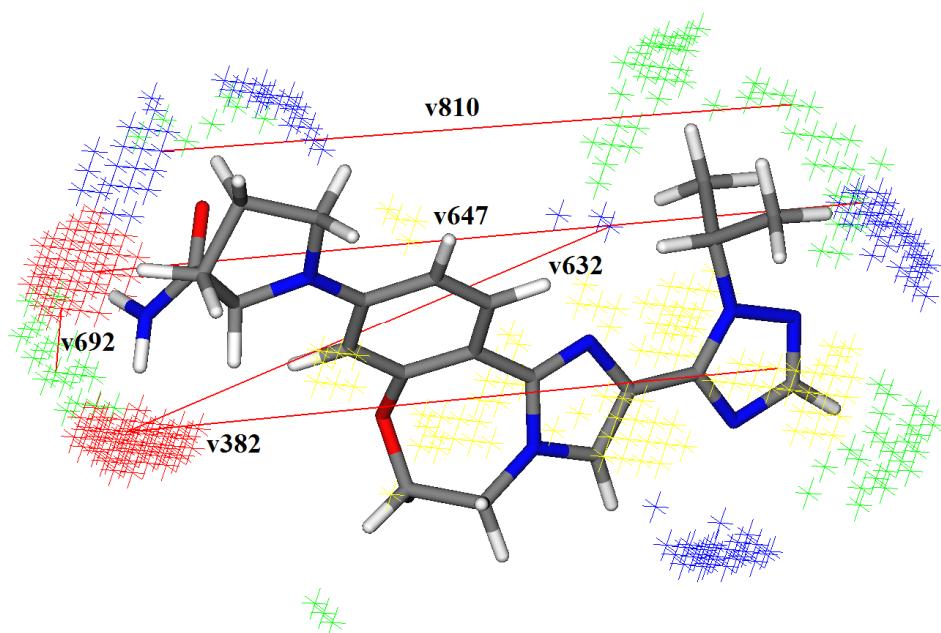
**Figure 3. PLS-coefficient plot of the most important GRIND variables.**

**Tabela II** Opis najznačajnijih GRIND varijabli sa pozitivnim i negativnim uticajem na aktivnost.

**Table II** Summary of the most important favorable and unfavorable GRIND variables.

Varijabla	Tip	Rastojanje [Å]	Uticaj	Opis
268	TIP-TIP	4-4,4	-	Prisustvo dve sterno nepovoljne grupe.
270	TIP-TIP	4,8-5,2	-	Prisustvo dve sterno nepovoljne grupe, ima najveći negativan uticaj na aktivnost.
382	DRY-O	15-15,2	+	Najčešće je formirana između azota amidne grupe (donor vodonične veze) i heterociklične strukture (hidrofobni centar), prisutna kod većine jedinjenja.
468	DRY-N1	15,2-15,6	-	Najčešće predstavlja rastojanje između kiseonika amidne grupe i nekog hidrofobnog heterociklusa.
632	O-N1	12-12,4	+	Rastojanje između donora i akceptora vodonične veze, javlja se kod svih jedinjenja u opsegu pKi od oko 9,5 do 10,52, i kod ostalih mestimично.
674	O-N1	18-18,4	+	Zastupljena je kod svih jedinjenja u okviru pKi opsega od oko 9 do 10,52, dok kod ostalih ređe i pretežno se javlja između azota iz amidne fukncionalne grupe kao donora H-veze i azota iz nekog heterociklusa kao akceptora H-veze, odnosno kiseonika iz amidne grupe kao akceptora i azota iz sulfonamidske fukncionalne grupe kao donora H-veze.
692	O-TIP	1,6-2	+	Kod najaktivnijih jedinjenja formirana između azota amidne fukncionalne grupe (donora vodonične veze) i vodonika vezanog za taj azot (sterni centar).
703	O-TIP	6-6,4	-	Donor vodonične veze i sterni centar na rastojanju većem od optimalnog, definisanog variblom 703.
724	O-TIP	14,4-14,8	-	Donor vodonične veze (najčešće azot amidne grupe) i sterni centar. Može se naći kod svih jedinjenja u pKi intervalu od 5,22 do oko 7,25, ali se javlja i kod nekih aktivnijih jedinjenja.
810	N1-TIP	14,4-14,8	+	Prisustvo akceptora vodonične veze i sternog centra.

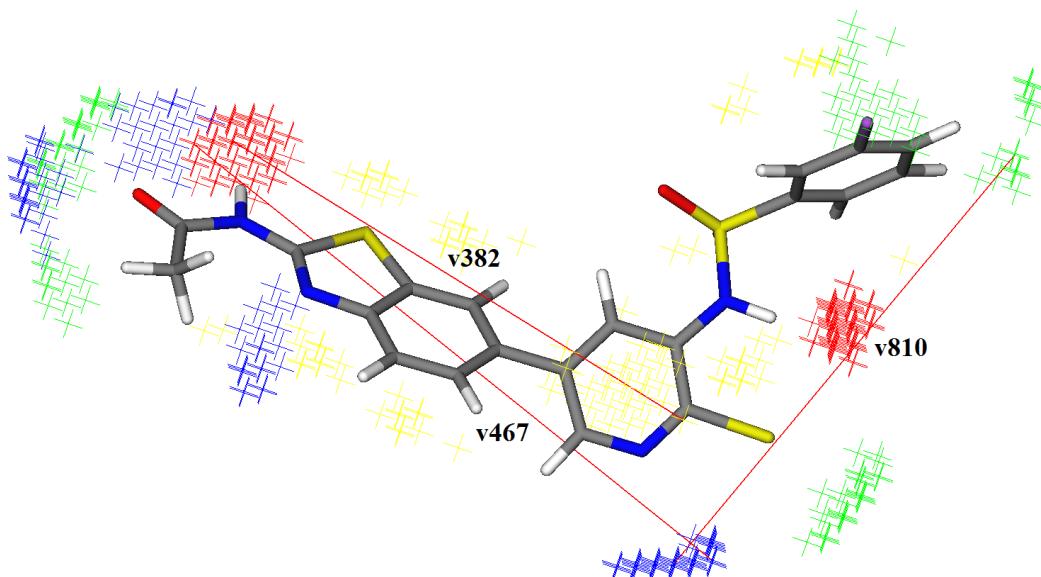
3D-farmakoforna slika PI3K- $\alpha$  inhibitora obuhvata prisustvo donora i akceptora vodonične veze na međusobnom rastojanju od 18-18,4 Å (v647: O-N1) ili 12-12,4 Å (v632: O-N1). Ove varijable imaju pozitivan uticaj na aktivnost i zastupljene su kod svih jedinjenja sa visokom aktivnošću ( $pKi$ : 9,0-10,5). Kod najaktivnijeg jedinjenja iz dataseta PI3K-1 ( $pKi$ =10,5) varijabla v647 je formirana između azota amidske grupe kao donora vodonične veze i azota triazola kao akceptora vodonične veze, dok je varijabla v632 formirana između azota amidske grupe i azota imidazola (Slika 4). Azot amidske funkcionalne grupe se kod ovog jedinjenja nalazi na povoljnem rastojanju od hidrofobnog triazolskog heterociklusa (v382: DRY-O), N-H veza ove grupe ima i povoljne sterne karakteristike (v692: O-TIP), dok je kiseonik amida kao akceptor vodonične veze na povoljnem rastojanju od izopropil grupe kao sternog centra (v810: N1-TIP). Budući da je amidska grupa sastavni deo svih pozitivnih varijabli koje se nalaze u strukturi najaktivnijeg jedinjenja PI3K-1, može se zaključiti da su njen prisustvo i položaj u molekuli bitan uslov za dobru aktivnost PI3K- $\alpha$  inhibitora.



**Slika 4. 3D-farmakoforna slika jedinjenja PI3K-1 ( $pKi$ =10,5) sa najvažnijim varijablama koje imaju pozitivan uticaj na aktivnost.**

**Figure 4. 3D-pharmacophoric feature of compound PI3K-1 ( $pKi$ =10.5) with the most important favorable variables.**

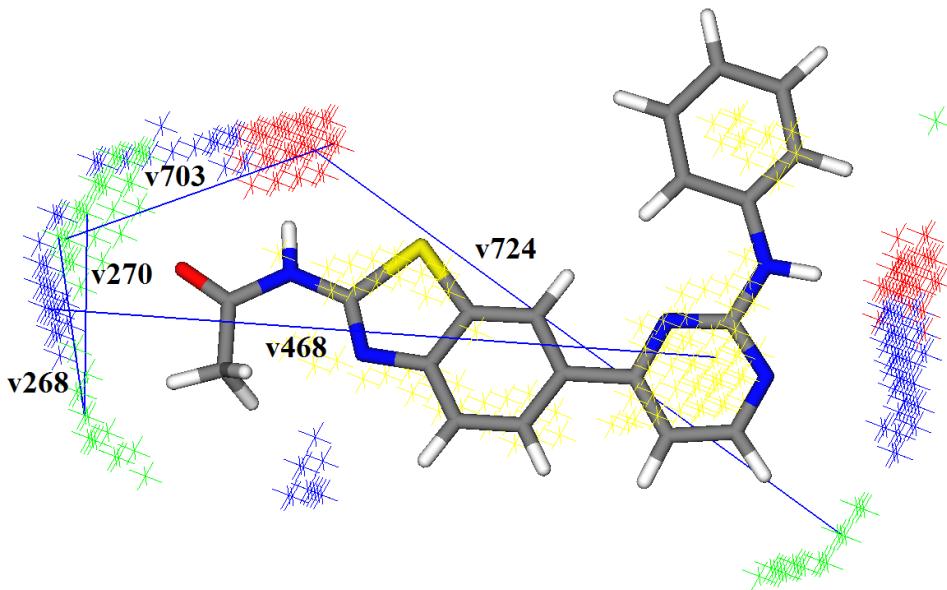
Kod jedinjenja PI3K-14 koje pripada različitoj strukturnoj grupi u odnosu na PI3K-1 i takođe poseduje dobru inhibitornu aktivnost ( $pKi=8,96$ ) prisutne su 3 od 5 najznačajnijih pozitivnih varijabli (Slika 5). Kod ovog jedinjenja značajno je prisustvo amidne grupe i piridinskog prstena na optimalnoj udaljenosti budući da azot amida kao donor vodonične veze formira povoljne interakcije sa piridinom kao hidrofobnom strukturon (v382: DRY-O) i azotom piridina kao akceptorom vodonične veze (v647: O-N1). Prisustvo sternog centra kao što je benzenov prsten na optimalnoj udaljenosti od azota piridina ima pozitivan uticaj na aktivnost (v810: N1-TIP).



**Slika 5.** 3D-farmakoforna slika jedinjenja PI3K-14 ( $pKi=8,96$ ) sa najvažnijim varijablama koje imaju pozitivan uticaj na aktivnost.

**Figure 5.** 3D-pharmacophoric feature of compound PI3K-14 ( $pKi=8,96$ ) with the most important favorable variables.

Strukturne karakteristike koje imaju negativan uticaj na aktivnost prikazane su na primeru jedinjenja PI3K-92, kao najmanje aktivnog jedinjenja u datasetu ( $pKi=5,22$ ). Metil grupa amida formira negativnu sternu interakciju sa kiseonikom amida što je opisano varijablama v268 i v270: TIP-TIP (Slika 6). Amidna grupa je kod ovog jedinjenja loše pozicionirana budući da azot amida kao donor vodonične veze obrazuje nepovoljne sterne interakcije sa pirimidinom (v724: O-TIP) i kiseonikom amida (v703: O-TIP). Kiseonik amida kao akceptor vodonične veze se takođe nalazi na nepovoljnem rastojanju od hidrofobnog pirimidina (v468: DRY-N1).



**Slika 6. 3D-farmakoforna slika jedinjenja PI3K-92 ( $pKi=5,22$ ) sa najvažnijim varijablama koje imaju negativan uticaj na aktivnost.**

**Figure 6. 3D-pharmacophoric feature of compound PI3K-92 ( $pKi=5.22$ ) with the most important unfavorable variables.**

## Zaključak

PI3K signalni put predstavlja veliku mogućnost, ali i izazov kao ciljno mesto u terapiji tumora. Danas se zna da je mutacija specifične izoforme p110- $\alpha$  klase IA PI3K enzima prisutna kod većine tumora, te se poseban trud ulaže u razvoj lekova koji će delovati isključivo na tu izoformu. U ovom radu sprovedena je 3D-QSAR studija PI3K- $\alpha$  inhibitora kako bi se definisale strukturne karakteristike koje su od naročitog značaja za aktivnost, odnosno odredila struktura farmakofore. Razvijen je 3D-QSAR model sa dobrim vrednostima statističkih parametara koji se može koristiti za predviđanje široke grupe strukturno različitih PI3K inhibitora. Analiza varijabli je ukazala na poseban značaj amidne grupe kao izvora donora vodonične veze (azot), akceptora vodonične veze (kiseonik) i povoljnijih sternih interakcija koje mogu da se obrazuju sa p110- $\alpha$  subjedinicom PI3K enzima. Budući da je amidna veza sastavni deo i nekih varijabli sa negativnim uticajem na aktivnost, veoma je bitna njena pozicija unutar molekule, odnosno rastojanje od hidrofobnih struktura kao što su piridin ili triazol, kao i od sternih centara. Ove informacije omogućuju ciljane strukturne modifikacije kako bi se dizajnirala potencijalno aktivnija jedinjenja, što predstavlja veliku pomoć u prvoj fazi razvoja novih selektivnih PI3K- $\alpha$  inhibitora.

## **Zahvalnica**

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Ugovor broj 172033.

## **Literatura**

1. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296(5573):1655-7.
2. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:481-507.
3. Huang CH, Mandelker D, Gabelli SB, Amzel LM. Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110alpha/p85alpha. *Cell Cycle*. 2008;7(9):1151-6.
4. Singh SS, Yap WN, Arfuso F, Kar S, Wang C, Cai W, et al. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in gastric carcinoma: A reality for personalized medicine? *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12261-73.
5. Deshpande V, Nduaguba A, Zimmerman SM, Kehoe SM, Macconail LE, Lauwers GY, et al. Mutational profiling reveals PIK3CA mutations in gallbladder carcinoma. *BMC Cancer*. 2011;11:60.
6. Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*. 2016;7(22):33440-50.
7. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(5):273-91.
8. Janku F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. *Cancer Treat Rev*. 2017;59:93-101.
9. Jia S, Roberts TM, Zhao JJ. Should individual PI3 kinase isoforms be targeted in cancer? *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):199-208.
10. Heffron TP, Heald RA, Ndubaku C, Wei B, Augustin M, Do S, et al. The Rational Design of Selective Benzoxazepin Inhibitors of the alpha-Isoform of Phosphoinositide 3-Kinase Culminating in the Identification of (S)-2-((2-(1-Isopropyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-yl)oxy)propanamide (GDC-0326). *J Med Chem*. 2016;59(3):985-1002.
11. Heffron TP, Ndubaku CO, Salphati L, Alicke B, Cheong J, Drobnick J, et al. Discovery of Clinical Development Candidate GDC-0084, a Brain Penetrant Inhibitor of PI3K and mTOR. *ACS Med Chem Lett*. 2016;7(4):351-6.
12. D'Angelo ND, Kim TS, Andrews K, Booker SK, Caenepeel S, Chen K, et al. Discovery and optimization of a series of benzothiazole phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) dual inhibitors. *J Med Chem*. 2011;54(6):1789-811.

13. Collier PN, Martinez-Botella G, Cornebise M, Cottrell KM, Doran JD, Griffith JP, et al. Structural basis for isoform selectivity in a class of benzothiazole inhibitors of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Med Chem.* 2015;58(1):517-21.
14. ChemAxonMarvin 17.28.0 program, Budimpešta, Mađarska, 2017 [www.chemaxon.com/products.html](http://www.chemaxon.com/products.html).
15. Gaussian 98 (RevisionA.7) Frisch MJ et al. Gaussian, Inc, PittsburghPA, 1998.
16. Chem3D Ultra7.0, Cambridge Soft Corporation, 100 Cambridge Park Dr, Cambridge, USA, 2001, <http://www.cambridgesoft.com/>.
17. Pentacle, Version 1.0.7, Molecular Discovery Ltd., Perugia, Italy; 2009.
18. Tropsha A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol Inform.* 2010;29(6-7):476-88.
19. Roy K, Mitra I, Kar S, Ojha PK, Das RN, Kabir H. Comparative studies on some metrics for external validation of QSPR models. *J ChemInf Model.* 2012;52(2):396-408.

# **Molecular modeling and analysis of the 3D pharmacophore structure of the selective PI3K- $\alpha$ inhibitors as antitumor agents**

**Milan Jovanović<sup>1</sup>, Katarina Nikolic<sup>1</sup>, Zarko Gagic<sup>2\*</sup>, Danica Agbaba<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> University of Banja Luka – Faculty of Medicine, Department of Pharmaceutical Chemistry, Save Mrkalja 14, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

\* Corresponding author: Zarko Gagic  
Tel: +387 51 340 106; e-mail: zarko.gagic@med.unibl.org

---

## **Summary**

The importance of the activation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) in the processes of tumor cell formation and growth has brought great interest in the development of new antitumor drugs that inhibit the PI3K-Akt signaling pathway. Recent studies have shown that in most tumors the activity of p110 $\alpha$  isoform of PI3K kinase has been altered, and today special emphasis is placed on developing specific PI3K- $\alpha$  inhibitors. In a series of 92 PI3K- $\alpha$  inhibitors, whose data on experimentally determined inhibitory activity were collected from literature, 3D quantitative structure-activity relationship studies (3D-QSAR) were carried out. All molecular structures were previously optimized using semiempirical PM3 and *ab initio* Hartree-Fock / 3-21G methods, and modeling was performed using PLS regression analysis. Calculated parameters of internal ( $R^2=0.84$ ;  $Q^2=0.67$ ) and external ( $R^2_{pred}=0.681$ ;  $r^2_m=0.594$ ;  $\Delta r^2_m=0.00039$ ) validation indicate on good reliability and predictive power of created 3D-QSAR model. The analysis of the variables enabled pharmacophore structure determination, which implies: presence of hydrogen bond donor and hydrogen bond acceptor at a distance of 18-18.4 Å or 12-12.4 Å, presence of hydrophobic domain and hydrogen bond donor at a distance of 15.2-15.6 Å, and presence of steric hotspot at optimal distance from hydrogen bond donor and acceptor. These results will have the relevance in selecting the lead compounds for targeted structural modifications in order to design new selective PI3K- $\alpha$  inhibitors as potential antitumor drugs.

**Keywords:** 3D-QSAR, pharmacophore, PI3K- $\alpha$ , inhibitor, tumor

---

## Matične ćelije alpske ruže kao sastojci kozmetičkih kremova – očekivani i utvrđeni efekti kremova na koži

Mila Filipović<sup>1\*</sup>, Milica Lukić<sup>2</sup>, Snežana Savić<sup>2</sup>, Gordana Vuleta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Visoka zdravstvena škola strukovnih studija u Beogradu, Cara Dušana 254,  
11080 Zemun, Beograd

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i  
kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

\*e-mail: millatrbovic@hotmail.com

---

### Kratak sadržaj

U industriji kozmetičkih proizvoda, čest *anti-aging* pristup jeste zaštita ćelija odgovornih za kontinuirano obnavljanje kože i održavanje njene barijерне funkcije - epidermalnih matičnih ćelija, upotrebom sekundarnih metabolita i epigenetskih faktora biljnih matičnih ćelija.

Kao kozmetički aktivna supstanca (KAS) u proizvodima za negu i zaštitu kože, koristi se i ekstrakt matičnih ćelija alpske ruže (MČAR) inkapsuliran u liposome, za koji proizvođač navodi da povećava otpornost humanih matičnih ćelija kože, štiti ih od negativnih spoljašnjih uticaja, utiče na regeneraciju epidermalnih ćelija, popravlja barijernu funkciju kože i ima određene *anti-aging* efekte. Međutim, da bi pomenuti efekti bili ispoljeni i u *in vivo* uslovima, a epigenetski faktori i sekundarni metaboliti MČAR stigli do ciljnih mesta njihovog delovanja, liposomi u kozmetičkom proizvodu treba da ostanu neoštećeni i neizmenjenih osobina. Stoga, shodno važećim propisima o kozmetičkim proizvodima u EU (Uredbe 1223/2009 i 655/2013), gotovim kozmetičkim proizvodima sa biljnim matičnim ćelijama (alpske ruže) se ne mogu pripisati kozmetički efekti sastojaka koje sadrže, već eventualne tvrdnje o efikasnosti svakog proizvoda treba potkrepiti dokumentacijom o proceni njegovih efekata na humanim dobrovoljcima.

**Ključne reči:** matične ćelije alpske ruže, liposomi, kremovi, kozmetički efekti,  
*in vitro* i *in vivo* efikasnost

---

## **Uvod**

Poslednjih decenija, širom sveta, kozmetička industrija postaje grana industrije koja se najbrže razvija i u kojoj istraživanje novih kozmetički aktivnih supstanci (KAS), zauzima značajno mesto. Rezultat tih aktivnosti jeste neprestano pojavljivanje velikog broja kozmetičkih proizvoda sa novim KAS (1-3). Shodno vladajućim trendovima, zahtevima i očekivanjima korisnika proizvoda, u fokusu istraživanja kozmetičke industrije su naročito KAS koje treba da umanje ili odlože pojavu vidljivih znakova starenja kože, odnosno da zaštite kožu od brojnih faktora i procesa koji dovode do njenog prevremenog starenja (4). Oksidativni stres, oštećenja DNK ili skraćivanje telomera, izazvani dejstvom različitih negativnih uticaja spoljašnje sredine, mogu biti uzrok neodgovarajuće deobe, smanjene vitalnosti, preuranjenog starenja ili apoptoze ćelija odgovornih za kontinuirano samoobnavljanje kože (epidermalnih matičnih ćelija), što je ujedno i jedan od glavnih razloga starenja kože (5-7). Smatra se da su zaštita vitalnosti i očuvanje epidermalnih matičnih ćelija od velikog značaja za prevenciju prevremenog starenja kože (7).

Noviji pristup u zaštiti epidermalnih matičnih ćelija od negativnih faktora spoljašnje sredine, jeste očuvanje njihove aktivnosti i zaštita signala koji odlučuju o sudbini ovih ćelija - epigenetskih faktora, korišćenjem biljnih matičnih ćelija (8,9). Biljne matične ćelije imaju sposobnost samoobnavljanja, proliferacije i diferenciranja u specijalizovane ćelije, kao i sposobnost regenerisanja cele biljke, zahvaljujući prisustvu različitih metabolita u citozolu, koji štite i održavaju biljne epigenetske faktore (6,7). Prisutni metaboliti i epigenetski faktori specifični za svaku biljku i uslove sredine u kojoj ona živi, u vidu kulture biljnih matičnih ćelija, iskorišćeni su kao kozmetički aktivni sastojci u različitim kozmetičkim proizvodima, a naročito onim koji treba da zaštite kožu od procesa koji dovode do njenog prevremenog starenja, povećanjem otpornosti epidermalnih matičnih ćelija i njihovoj zaštiti od negativnih spoljašnjih uticaja (8,10).

Među prvim uzgajanim biljnim matičnim ćelijama jesu matične ćelije alpske ruže, čiji se ekstrakt koristi kao KAS u različitim kozmetičkim proizvodima. Premda se ovoj KAS pripisuju brojni pozitivni efekti, koje proizvođač potkrepljuje odgovarajućim setom dokaza, oni se ne mogu pripisati kozmetičkom proizvodu samo zato što on sadrži pomenuto KAS. Kozmetički efekti proizvoda za negu kože koji sadrže ekstrakte matičnih ćelija su i dalje nedovoljno istraženi.

*Cilj rada* bio je prikaz sastojaka ekstrakta kulture matičnih ćelija alpske ruže u liposomima kao kozmetički aktivne supstance, kozmetičkih efekata ove sirovine, kao i efikasnosti krema na koži, sa ovim kozmetičkim materijalom.

## **Ekstrakt matičnih ćelija alpske ruže (INCI: *Rhododendron Ferrugineum leaf cell culture extract*)**

Alpska ruža (lat. *Rhododendron Ferrugineum L.*), zimzeleni grm koji raste na izrazito kiselom zemljištu Alpa, karakteristična je po sposobnosti prilagođavanja izuzetno teškim uslovima životne sredine (velike varijacije u temperaturi, visoko UV zračenje, smanjen sadržaj vlage i nutrijenata u zemljištu). Ova adaptacija moguća je zahvaljujući menjanju biohemihskih i metaboličkih procesa u ćelijama kao odgovor na ekstremne uslove sredine, sposobnosti dediferenciranja, odnosno vraćanja diferenciranih u stadijum matičnih ćelija, ali i sintezi određenih sekundarnih metabolita – jedinjenja koja štite i održavaju signale od kojih zavisi deoba i diferencijacija matičnih ćelija (epigenetski faktori) (7). U listovima alpske ruže sintetišu se različiti sekundarni metaboliti - polifenolna jedinjenja (hiperozid, miricetin, kempferol, kvercetin, taksifolin, rododendron) koja deluju antioksidativno i vezuju slobodne radikale u fazi intenzivnog sunčevog zračenja i viših temperatura kada se sneg topi, dok se protektivni, humektantni proteini bogati glicinom (dehidrini) stvaraju kao odgovor na niske temperature i smanjen sadržaj vlage kada je biljka prekrivena snegom (11).

Pomenuta sposobnost prilagođavanja, iskorišćena je za dobijanje matičnih ćelija karakterističnog sastava iz listova alpske ruže, primenom specifične tehnologije njihovog uzgajanja. Uzgajane matične ćelije alpske ruže (MĆAR), prisutne su na tržištu kao kozmetička sirovina pod nazivom PhytoCellTec™ Alp Rose (proizvođač Mibelle Biochemistry, Švajcarska), koju čini ekstrakt kulture matičnih ćelija (MĆ) lista alpske ruže. Ova sirovina dobijena je PhytoCellTec™ tehnologijom (patentirana tehnologija uzgajanja bazirana na totipotentnosti i sposobnosti dediferenciranja biljnih ćelija) i naknadno je inkapsulirana u lecitinske liposome (11). Pomenuti način izrade, odnosno ekstrakcija uz naknadnu inkapsulaciju i dobijanje vodene disperzije liposoma, omogućava korišćenje celokupnog ekstrakta MĆ (liposolubilna jedinjenja MĆ su u dvoslojnim membranama liposoma, dok su hidrosolubilne komponente rastvorene u vodi, u jezgru liposoma) (12). Pripremljeni ekstrakt se zatim prska na hidrosolubilni granulat od izomalta, pa navedena KAS ima sledeći sastav - INCI: *Rhododendron Ferrugineum Leaf Cell Culture Extract, Isomalt, Lecithin, Sodium Benzoate, Lactic Acid, Aqua* (11).

U vezi sa mogućnostima formulacije kozmetičkih proizvoda sa matičnim ćelijama alpske ruže u liposomima (MĆAR-liposomima), proizvođač u specifikaciji ove sirovine pruža samo osnovne informacije - navodi da se može dodati u različite kozmetičke proizvode (emulzije, serumi, gelovi) u koncentraciji od 0,4 do 1% (m/m), kao i da se tokom izrade emulzionih kozmetičkih proizvoda sa ovom KAS, granulat prvo disperguje u vodenoj fazi, odnosno njenom delu, a zatim disperzija dodaje u pripremljen emulzioni sistem na temperaturi ispod 60°C. Iako su fizičko-hemiske karakteristike MĆAR-liposoma od izuzetnog značaja za praktičnu primenu ove KAS i

njeno inkorporiranje u različite nosače, proizvođač ih u specifikaciji ne navodi. Dodatno, posebno osetljivo pitanje izbora odgovarajućeg emulgatora/stabilizatora emulzionih sistema sa ovom KAS, takođe nije pokriveno eventualnim preporukama samog proizvođača ovog kozmetičkog materijala (11).

Prvu publikovanu studiju fizičko-hemijske karakterizacije vodene disperzije MČAR-liposoma sproveli su Filipović i saradnici (2016) upotrebom polarizacione mikroskopije i laserske difrakcije. Snimljene polarizacione mikrografije su potvrđile stvaranje i strukturni integritet vezikula nakon dispergovanja izomaltnog granulata MČAR-liposoma u prečišćenoj vodi, ali i obezbedile određene smernice u pogledu izrade kozmetičkih proizvoda sa ovom KAS. Primenom laserske difrakcije pokazano je da je veličina vezikula odmah nakon dispergovanja granulata u prečišćenoj vodi relativno ujednačena. Preporuka je i da ovu KAS treba dodati u gotov nosač odmah nakon dispergovanja, kako bi se izbegla agregacija i fuzija liposomskih vezikula (13).

Ispitivanje zadržavanja „obogaćenih“ liposoma sa ekstraktom MČAR ili neke druge KAS, u početnom stanju i bez narušavanja strukture i integriteta dvoslojnih membrana vezikula u kozmetičkim emulzionim sistemima, je veoma kompleksan zadatak i o tome ima malo podataka. Filipović i saradnici su kroz nekoliko radova opisali ispitivanja rađena sa kremovima sa mešanim emulgatorom APG tipa - hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozidom (Simulgreen™ 18-2, proizvođača Seppic, Francuska) i liposomima sa ekstraktom matičnih ćelija alpske ruže, koja su se odnosila na procenu kompatibilnosti ovog nejonskog emulgatora i liposoma u formulisanim ulje u vodi (u/v) emulzionim sistemima, praćenjem njihovih interakcija, kao i efektima tih proizvoda na koži (13-15).

Kao prvi korak u karakterizaciji formulisanih emulzionih sistema, izvršena je polarizaciona mikroskopija uzoraka – placebo krema i dva krema sa različitom koncentracijom MČAR-liposoma (0,4 i 1% (m/m)). Snimljene mikrografije su otkrile nasumično raspoređene iskrivljene malteške krstove i prelamanja na ivici uljanih kapi (tzv. "onion rings") unutar svih ispitivanih uzoraka, ali i primetnu razliku u koloidnoj strukturi između placebo uzorka i emulzionih sistema sa KAS, odnosno prisustvo struktura sličnih liposomima blizu prelamanja na ivici uljanih kapi u kontinualnoj fazi ovih kremova. Izvršena kontinualna i oscilatorna reološka merenja u daljoj karakterizaciji ispitivanih kremova potvrdila su uticaj prisustva MČAR-liposoma na reološko ponašanje nosača (placebo krema) u vidu blagog povećanja njegovog viskoziteta i ugušćivanja, kao i povećanja elastičnosti (veći elastični ( $G'$ ) od viskoznog modula ( $G''$ )), pri čemu je uticaj bio značajniji pri dodatku veće koncentracije MČAR-liposoma (1% (m/m)). Prisustvo intaktnih liposoma u blizini lamelarne faze unutar emulzionih sistema potvrđeno je i diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom, kao i termogravimetrijskom analizom (13).

Nedavno je ispitan i direktni efekat, kao i efekat interakcije različitih faktora reformulacije na teksturne i reološke karakteristike emulzionog sistema stabilisanog hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozidom, primenom generalnog faktorijalnog eksperimentalnog dizajna (14).

Pokazano je da prisustvo 0,4% (m/m) MĆAR-liposoma ima značajan antagonistički efekat na sve praćene teksturne karakteristike ispitivanih emulzionalih sistema (konzistencija, indeks viskoziteta, čvrstina i kohezivnost), odnosno vrednosti ovih parametara emulzija sa MĆAR-liposomima bile su niže u odnosu na prazne emulzije (placebo kremove). Ovaj rezultat je objašnjen uticajem vezikula na koloidnu strukturu emulzionog nosača stabilisanog APG emulgatorom (preciznije na lamelarnu fazu), odnosno ugrađivanjem liposoma u lamelarne dvoslojeve.

Što se tiče uticaja MĆAR-liposoma na praćene reološke karakteristike emulzionalih sistema, u studiji je pokazano da je njihov dodatak doveo do povećanja vrednosti maksimalnog ( $\eta_{\max}$ ) i minimalnog ( $\eta_{\min}$ ) prividnog viskoziteta, ali nije imao uticaj na vrednost histerezne površine (14).

U studiji je utvrđena i interakcija dodatka MĆAR-liposoma sa preostala dva praćena faktora reformulacije emulzionalih sistema (načinom izrade i dodatkom skvalena). S tim uvezi, istaknuto je da kod istovremene promene više faktora reformulacije emulzionalih sistema (dodatak MĆAR-liposoma i/ili skvalena i načina izrade), koncentracija i odgovarajuća kombinacija dodatih sastojaka utiče na to kako će se vrednosti teksturnih i reoloških parametara menjati (14). Dalje, shodno utvrđenoj korelaciji između određenih senzornih atributa i teksturnih i reoloških parametara (16,17), izneta je pretpostavka da bi dodatak MĆAR-liposoma, kao i njegove interakcije sa ostalim faktorima reformulacije, mogli imati uticaj na senzorne karakteristike emulzionalih sistema u fazi uzimanja (engl. *pick up*) uzorka iz ambalaže (tekstura i čvrstina proizvoda) i u fazi utrljavanja (engl. *rub in*) uzorka (razmazivost i rasprostiranje), te i na njegovu prihvatljivost od strane korisnika/potrošača (14).

### Kozmetički efekti ekstrakta matičnih ćelija alpske ruže u liposomima

Prema specifikaciji proizvođača, matične ćelije alpske ruže u liposomima (PhytoCellTec™ Alp Rose) povećavaju otpornost humanih matičnih ćelija kože, štite ih od negativnih spoljašnjih uticaja, poboljšavaju regeneraciju epidermalnih ćelija, popravljaju barijernu funkciju kože, te imaju i određene *anti-aging* efekte. Pomenuti efekti su rezultat *in vitro* studija na humanim epidermalnim matičnim ćelijama (EMĆ), kao i *in vivo* studija rađenim na humanim dobrovoljcima (11).

Liposomi, u koje je ekstrakt matičnih ćelija alpske ruže inkapsuliran, stalno su predmet interesovanja kako formulatora kozmetičkih proizvoda, tako i proizvođača kozmetičkih sirovina. Ovi biokompatibilni, vezikularni nosači stabilizuju KAS i mogu

poboljšati penetraciona svojstva i efikasnost aktivnih supstanci i omogućiti njihovo produženo i lokalizovano oslobođanje (18). Specifična struktura ih čini pogodnim nosačima za jedinjenja različitih fizičko-hemijskih karakteristika - hidrofilne aktivne supstance mogu se inkorporirati u hidrofilnu unutrašnjost, a lipofilna i amfifilna jedinjenja mogu se ugraditi u liposomski lipidni dvosloj (19). Prazni ili sa inkapsuliranim KAS, liposomi su dugo u upotrebi u kozmetičkoj industriji, jer imaju određene prednosti i potvrđene kozmetičke efekte: stvaraju film na površini kože, smanjuju transepidermalni gubitak vode i povećavaju vlažnost kože, vrše nadoknadu lipida neophodnih za vlaženje kože, "snabdevaju" kožu linolenskom i linolnom kiselinom, popravljaju kožnu barijeru, odlažu/usporavaju starenje kože (pozitivnim efektom na vlažnost kože) (20-22). Iako se smatra da je penetracija konvencionalnih liposoma, zbog njihove veličine i nedostatka elastičnosti, ograničena na površinski sloj kože (dezintegracija vezikula u gornjim slojevima *stratum corneum*-a i akumuliranje u adneksima kože uz minimalnu penetraciju u njene dublje slojeve), novije studije ukazuju na prisustvo ovih vezikula u dubljim slojevima kože (23-25), pa čak i u vijabilnom delu epidermisa - u bazalnom sloju (26, 27).

Sprovedena *in vitro* ispitivanja su vršena na humanim EMĆ dobijenim tzv. tehnologijom programirane proizvodnje ćelija progenitora (engl. *progenitor cell targeting technology*). Pomenuta tehnologija se zasniva na kultivaciji uzoraka humane kože u posebnom medijumu koji imitira mikrookruženje humanih matičnih ćelija u epidermisu i dovodi do značajnog povećanja broja tzv. ćelija progenitora keratinocita (unipotentne matične ćelije čijom diferencijacijom nastaju keratinociti). U studiji je iskorišćeno svojstvo matičnih ćelija da u *in vitro* uslovima formiraju kolonije sastavljene iz ćelija progenitora, ćelija potomaka (engl. *transient amplifying cells*) nastalih deobom ćelija progenitora i diferenciranih ćelija koje su izgubile sposobnost deobe, pri čemu broj formiranih kolonija predstavlja meru vitalnosti matičnih ćelija i označava se kao efikasnost formiranja kolonija (engl. *colony forming efficiency, CFE*). U studiji je određivana efikasnost formiranja kolonija kod uzoraka dobijenih EMĆ sa i bez 0,15% (m/m) ekstrakta kulture MČAR, kao i pre i nakon izlaganja pomenutih uzoraka UV zračenju (UVA + UVB, doza zračenja  $450 \text{ kJ/m}^2$ ). Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da ekstrakt kulture MČAR ima sposobnost povećanja vitalnosti humanih EMĆ, kao i njihove zaštite od posledice delovanja UV zračenja (28).

U *in vivo* studiji sprovedenoj u zimskom periodu na Alpima, 22 dobrovoljca su, nakon inicijalnih merenja transepidermalnog gubitka vlage (TEGV) na obrazima uz upotrebu tevametra (Tewameter TM 210, Courage+Khazaka GmbH, Nemačka), nanosila tri puta dnevno (ujutru, u podne i uveče) u toku 16 dana, na jednu polovicu lica krem za zaštitu kože od sunca sa zaštitnim faktorom (engl. *sun protection factor, SPF*) 30, dok su na drugu polovicu lica nanosili isti krem, ali obogaćen sa 0,4% (m/m) MČAR-liposoma. Na osnovu dobijenih rezultata (42% niža vrednost TEGV na polovini

lica na kojoj je nanošen krem obogaćen MĆAR-liposomima), zaključeno je da MĆAR-liposomi štite barijernu funkciju kože čineći je mnogo otpornijom prema kombinaciji negativnih spoljašnjih uticaja tokom zimskog perioda (UV zračenje, vetar, hladnoća). U istoj studiji paralelno je vršeno ispitivanje određenog *anti-aging*, preciznije *anti-wrinkle* efekta MĆAR-liposoma, snimanjem fotografija lica uz pomoć uređaja VisioFace Quick® (Courage+Khazaka GmbH, Nemačka). Na snimljenim fotografijama vršena je procena bora, crvenila (iritacije) i sjaja kože, pre i nakon 16 dana nanošenja pomenutih uzoraka. Pokazano je da šesnaestodnevna upotreba praznog krema nije dovela do promena u crvenilu i sjaju kože u odnosu na početno stanje, dok je status bora bio pogoršan. Sa druge strane, na polovini lica tretiranoj kremom obogaćenim MĆAR-liposomima došlo je do promena u odnosu na početno stanje kože, ali i u odnosu na stranu lica tretiranu placebom: sitne bore oko očiju tzv. vranina stopala (engl. *crow's feet*) ili bore smejalice, bile su pliće i manje vidljive, ten je bio sjajniji, a došlo je i do smanjenja crvenila (iritacije) kože dobrovoljaca (28).

### ***In vivo* klinička i neklinička ispitivanja kozmetičkih efekata ekstrakta kulture matičnih ćelija alpske ruže**

U kliničkoj *in vivo* studiji Baghaei i sar. (2013) vršili su procenu efekata MĆAR-liposoma i ekstrakta magnolije na iritiranoj koži nakon laserskih procedura. U studiji je učestvovalo 96 dobrovoljaca ženskog pola, prosečne starosti 28,8 godina, sa srednje izraženom akne rozaceom (lat. *acne rosacea*), koji su prethodnog dana bili podvrgnuti kalijum-titan-fosfat (KTP) laserskom tretmanu. Inicijalna vizuelna procena eritema, kao indikatora iritacije kože, vršena je dan nakon laserskog tretmana, nakon čega su dobrovoljci bili podeljeni u eksperimentalnu (49 dobrovoljaca) i kontrolnu grupu (47 dobrovoljaca). Dobrovoljci u kontrolnoj grupi su na lice nanosili prazan krem (placebo), dok su oni u eksperimentalnoj grupi nanosili isti krem obogaćen MĆAR i ekstraktom magnolije, dva puta dnevno, tokom pet dana. Šestog dana od laserskog tretmana vršena je završna procena eritema na koži lica dobrovoljaca. Zabeležena je statistički značajna razlika u eritemu samo u eksperimentalnoj grupi, pre i nakon nanošenja krema sa MĆAR i ekstraktom magnolije. Takođe, utvrđena je i statistički značajna razlika u eritemu između eksperimentalne i kontrolne grupe. Na osnovu rezultata zaključeno je da MĆAR i ekstrakt magnolije deluju antiiritantno, odnosno dovode do smanjenja iritacije kože nakon laserskih tretmana, bez ispoljavanja neželjenih efekata (29).

U nekliničkoj *in vivo* studiji Filipovic i sar. (2016) vršili su procenu bezbednosnog profila i efikasnosti krema stabilisanog hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozidom (placebo krem), krema sa 0,4% (m/m) MĆAR-liposoma i komercijalnog krema sa MĆAR-liposomima (Hydra perfect day cream, Dahlia, Beograd), upotreboru neinvazivnih metoda zasnovanih na biofizičkim merenjima na koži. Merenja su sprovedena na 76 zdravih dobrovoljaca ženskog pola, bez istorije ili

kliničkih znakova dermatoloških oboljenja, sa normalnom do umereno suvom kožom. U prvom delu studije vršena je procena potencijala uzoraka da izazovu lokalne neželjene reakcije, odnosno da iritiraju kožu, merenjem TEGV, električne kapacitivnosti (engl. *electrical capacitance*, EC) i eritema indeksa (EI), pre i nakon nanošenja uzoraka pod 24 časovnom okluzijom. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da nije došlo do narušavanja barijerne funkcije kože, odnosno da odsustvo eritema (crvenila) kao i znakova bilo kakvog narušavanja barijerne funkcije kože tokom studije, preliminarno ukazuje na zadovoljavajući bezbednosni profil ispitivanih uzoraka.

Dalje, sprovedeno je *in vivo* ispitivanje efikasnosti uzoraka u dugotrajnoj studiji (21 dan) na zdravoj koži merenjem TEGV, EC i viskoelastičnosti kože, kao i kratkotrajnoj u trajanju od 6 dana na eksperimentalno izazvanoj suvoj koži praćenjem vrednosti EI, EC i TEGV. Nakon višednevne (21 dan) upotrebe, ispitivani kremovi su doveli do povećanja vlažnosti, bez narušavanja barijerne funkcije kože i bez uticaja na njenu elastičnost. Rezultati su pokazali da je uticaj liposoma sa MČAR na vlažeći efekat na koži značajan i da verovatno potiče od pojedinih sastojaka ekstrakta koji imaju sposobnost vezivanja i zadržavanja vlage, kao i samih liposoma, odnosno fosfolipida - lecitina. U kratkotrajnoj *in vivo* studiji pokazano je da su ispitivani kremovi koji sadrže MČAR-liposome, nakon šestodnevног kozmetičkog tretmana, ispoljili pozitivan efekat na eksperimentalno isušenoj koži, kao i pozitivan uticaj na obnavljanje određenih oštećenja kožne barijere (15).

## Zaključak

Na osnovu navedenog može se zaključiti da je potencijal matičnih ćelija alpske ruže u liposomima za vlaženje i popravljanje stanja barijerne funkcije kože bez ispoljavanja neželjenih efekata, nesporan, što ih čini pogodnom KAS za kozmetičke proizvode namenjene vlaženju kako zdrave, tako i suve (indukovana suvoća) kože. Sa druge strane, da bi ova KAS zaštitala epidermalne matične ćelije od negativnih faktora spoljašnje sredine i ostvarila određene *anti-aging* efekte, epigenetski faktori i sekundarni metaboliti matičnih ćelija alpske ruže moraju stići do ciljnog mesta njihovog delovanja – do epidermalnih matičnih ćelija bazalnog sloja. Iz tog razloga bi liposomi, u koje je ekstrakt inicijalno inkapsuliran, mogli biti pogodan primarni nosač za ovu KAS, ukoliko u kozmetičkom proizvodu ostanu neoštećeni i neizmenjenih osobina i kao takvi stignu do bazalnog sloja.

S tim u vezi, ono što treba prvo uzeti u razmatranje prilikom izrade emulzionalih sistema sa matičnim ćelijama alpske ruže u liposomima, jeste izbor odgovarajućeg emulgatora koji mora biti kompatibilan sa vezikulama i njihovim dvoslojnim membranama, a zatim i odabir odgovarajuće koncentracije KAS, shodno njenom uticaju na koloidnu strukturu i raspodelu vode unutar nosača. S obzirom na rezultate prikazanih studija, mešani alkil poliglukozidni emulgator - hidroksistearil alkohol i hidroksistearil glukozid bi mogao biti primer odgovarajućeg stabilizatora emulzionalih sistema koji sadrže pomenutu KAS i sa njim je moguće formulisati kremove koji doprinose vlaženju

i popravljanju stanje barijerne funkcije kože, stabilisane lamelarnom fazom, unutar koje liposomi ostaju u izvornom stanju.

## Literatura

1. Barbulova A, Colucci G, Apone F. New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*. 2015; 2(2): 82-92.
2. Dahl MV. Stem Cell Cosmeceuticals. In: Patricia K. Farris MD, editors. *Cosmeceuticals and Cosmetic Practice*. Wiley-Blackwell; 2013. p. 192-9.
3. Drauelos, Z. Plant stem cells and skin care. *Cosmet. Dermatol.* 2012; 25: 395–396.
4. Denić D, Lukić M, Vučeta G, Savić S. Efekti *anti-age* kozmetičkih proizvoda – dokazivanje tvrdnji. *Arh.farm.* 2017; 67: 209–219.
5. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012; 30(3): 257-62.
6. Dahl MV. Stem cells and skin. *J Cosmet Dermatol.* 2012; 11: 297-306.
7. Schmid D, Schürch C, Blum P, Belser E, Zülli F. Plant stem cell extract for longevity of skin and hair. *SÖFW-Journal*. 2008; 134 (5): 30-35.
8. Skotnicka-Graca UR. Plant stem cells as innovation in cosmetics. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014; 71(5): 701.
9. Barbulova A, Apone F, Colucci G. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. *Cosmetics*. 2014; 1(2): 94-104.
10. Prhal J, Milić J, Krajišnik D, Vučeta G. Karakteristike i primena biljnih matičnih ćelija u kozmetičkim proizvodima. *Arh farm.* 2014; 64: 26-37.
11. Mibelle Biochemistry, Švajcarska, Katalog - PhytoCellTec<sup>TM</sup> Alp Rose, Charges skin stem cell resistance, 2010 (Dostupno sa <https://mibellebiochemistry.com/products/phytocelltec-alp-rose/>, pristupljeno 11.5.2018.)
12. Schürch C, Blum P, Zülli F. Potential of plant cells in culture for cosmetic application. *Phytochem Rev.* 2008; 7: 599–605.
13. Filipović M, Lukić M, Krstonošić V, Đorđević S, Pantelić I, Gledović A, Vučeta G and Savić S. Feasibility of a natural surfactant as a stabilizer for cosmetics with liposome-encapsulated plant stem cells: pre-formulation and formulation through stability studies. *Tenside Surf Det.* 2016; 53(3): 214-226.
14. Filipovic M, Lukic M, Djordjevic S, Krstonosic V, Pantelic I, Vučeta G and Savic S. Towards satisfying performance of an O/W cosmetic emulsion: screening of reformulation factors on textural and rheological properties using general experimental design. *Int J Cosmetic Sci.* 2017; 39: 486–499.
15. Filipović M, Gledović A, Lukić M, Tasić-Kostov M, Isailović T, Pantelić I, Vučeta G, Savić S. Alp Rose stem cells, olive oil squalene and a natural alkyl polyglucoside emulsifier: Are they appropriate ingredients of skin moisturizers-*in vivo* efficacy on normal and sodium lauryl sulfate-irritated skin? *Vojnosanitetski pregled*. 2016; 73(11): 991-1002.

16. Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Cekic N, Savic S. A combined approach in characterization of an effective w/o hand cream: the influence of emollient on textural, sensorial and *in vivo* skin performance. *Int J Cosmetic Sci.* 2012; 34: 140-149.
17. Estanquero M, Amaral MH, Sousa Lobo JM. Comparison between sensory and instrumental characterization of topical formulations: impact of thickening agents. *Int J Cosmetic Sci.* 2016; 38: 389–398.
18. Rahimpour Y, Hamishehkar H. Liposomes in cosmeceuticals. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2012; 9: 443-455
19. Swami H, Kataria MK, Bilandi A, Kour P, Bala S. Liposome: An art for drug delivery. *IJPSL* 2015; 5(2): 523-530.
20. Aparajita VA, Ravikumar PA. Liposomes as carriers in skin ageing. *Int J Curr Pharm Res.* 2014; 6(3): 1-7.
21. Arsić I. Uticaj inkapsulacije standardizovanih ekstrakata cvasti kamilice Chamomilla recutita (L.) Rausch. (Asteracea) na stabilnost i antiinflamatornu aktivnost preparata za lokalnu primenu. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd, 2005.
22. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012; 1(2): 147-68.
23. Serrano G, Almudéver P, Serrano JM, Milara J, Torrens A, Expósito I, Cortijo J. Phosphatidylcholine liposomes as carriers to improve topical ascorbic acid treatment of skin disorders. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology.* 2015; 8: 591.
24. Sakdiset P, Okada A, Todo H, Sugibayashi K. Selection of phospholipids to design liposome preparations with high skin penetration-enhancing effects. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2018; 44: 58-64.
25. Soni V, Chandel S, Jain P, Asati S. Role of liposomal drug-delivery system in cosmetics. In Grumezescu AM, editor. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics.* William Andrew Publishing. 2016; p. 93-120.
26. Jain S, Patel N, Shah MK, Khatri P, Vora N. Recent advances in lipid-based vesicles and particulate carriers for topical and transdermal application. *J Pharm Sci.* 2017; 106(2): 423-45.
27. Dorrani M, Garbuzenko OB, Minko T, Michniak-Kohn B. Development of edge-activated liposomes for siRNA delivery to human basal epidermis for melanoma therapy. *J Control Release.* 2016; 228: 150-158.
28. [https://biogreenscience.com/file/clinical/PPT\\_PhotoCellTec\\_AlP\\_Rose.pdf](https://biogreenscience.com/file/clinical/PPT_PhotoCellTec_AlP_Rose.pdf) (poslednji pristup 11.5.2018.)
29. Baghaei M, Nateghi MR, Ehsani AH, Zolfaghari HR. The effect of Alpine Rose plant stem cell plus Magnolia extract on skin irritation following skin laser procedures. *SÖFW-Journal* 2013; 139(7): 54–6.

# **Alp Rose stem cells as cosmetic creams ingredient – expected and established creams effects on the skin**

**Mila Filipović<sup>1\*</sup>, Milica Lukić<sup>2</sup>, Snežana Savić<sup>2</sup>, Gordana Vuleta<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Higher Education School of Professional Health Studies,  
Cara Dušana 254, 11080 Zemun, Belgrade

<sup>2</sup> University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Department of  
Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade

\*e-mail: millatrbovic@hotmail.com

---

## **Summary**

In the cosmetic industry, a frequent anti-aging approach is the protection of cells responsible for the continuous skin renewal and the maintenance of its barrier function - epidermal stem cells, using the secondary metabolites and epigenetic factors of the plant stem cells.

Alp rose stem cells (ARSC) extract in liposomes is used as a cosmetic active ingredient in the cosmetic products for the skin care and its protection. According to the manufacturer, this cosmetic active ingredient possess the ability to increase the vitality of epidermal stem cells, protects them against the negative external influences, affects the regeneration of epidermal cells, improves the skin barrier function and has certain anti-aging effects. However, in order for these effects to be observed in *in vivo* conditions and for ARSC epigenetic factors and secondary metabolites to reach their target places, liposomes in the cosmetic products should remain intact and unchanged. Therefore, according to the EU regulations on the cosmetic products (Regulations 1223/2009 and 655/2013), cosmetic products with plant (alp rose) stem cells can not be attributed to the effects of the containing cosmetic ingredients, and any claims about the each product efficacy has to be supported by the data obtained on the human volunteers.

**Keywords:** alp rose stem cells, liposomes, creams, cosmetic effects,  
*in vitro* and *in vivo* efficacy

---

# Razvoj i validacija metode tečne hromatografije za određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline u doziranim oblicima

Danijela Damnjanović, Vladimir Dobričić\*,  
Olivera Čudina, Sote Vladimirov

Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Katedra za Farmaceutsku hemiju,  
Vojvode Stepe 450, Beograd

Autor za korespondenciju:vladimir.dobricic@pharmacy.bg.ac.rs

## Kratak sadržaj

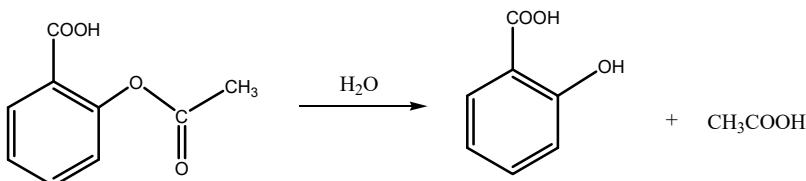
Acetilsalicilna kiselina pripada grupi nesteroidnih antiinflamatornih lekova koji ispoljavaju antiinflamatorno, analgetičko i antipiretičko delovanje. Cilj ovog rada je bio razvoj i validacija HPLC metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu acetilsalicilne kiseline i njenog degradacionog proizvoda, salicilne kiselina, u doziranim oblicima. Optimalno razdvajanje ispitivanih analita postignuto je na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical (4,6x150 mm, veličina čestica 5 µm) na temperaturi od 35°C. Mobilnu fazu čine smeša A i B u odnosu 65:35 (V/V). Smeša A je voda HPLC čistoće i 85% fosforna kiselina u odnosu 80:0,5 (V/V), a B je acetonitril. Protok je bio 1,0 mL/min, a talasna dužina detekcije 240 nm. Metoda je validirana i ispitani su sledeći parametri validacije: selektivnost, linearost, preciznost, tačnost i robusnost za oba analita, kao i limiti detekcije i kvantifikacije za salicilnu kiselinu. Dobijene vrednosti su u skladu sa definisanim kriterijumima za validaciju metode. Predložena HPLC metoda je primenjena za kvalitativnu i kvantitativnu analizu acetilsalicilne i salicilne kiseline u šest različitih komercijalnih preparata. Svi rezultati ispitivanja su u dozvoljenim granicama specifikacija proizvođača. Predložena HPLC metoda pod datim eksperimentalnim uslovima predstavlja brz, jednostavan, tačan i selektivan postupak za istovremeno određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline u doziranim oblicima.

**Ključne reči:** acetilsalicilna kiselina, salicilna kiselina, tečna hromatografija, validacija metode

## Uvod

Acetilsalicilna kiselina spada u grupu nesteroidnih antiinflamatornih lekova koji ispoljavaju antiinflamatorno, analgetičko i antipiretičko dejstvo. Analgetički efekat je posledica blokade stvaranja impulsa bola na periferiji, kao i centralnog dejstva na nivou hipotalamus. Antipiretički efekat nastaje dejstvom aspirina na centar za termoregulaciju u hipotalamusu što dovodi do periferne vazodilatacije, povećanog protoka krvi kroz kožu, znojenja i pada telesne temperature. Antiinflamatorno dejstvo aspirina je posledica inhibicije COX-1 (eng. *cyclooxygenase-1*) i COX-2 (eng. *cyclooxygenase-2*) enzima koji učestvuju u biosintezi prostaglandina i tromboksana. U malim dozama aspirin pokazuje antiagregacijsko dejstvo i veću selektivnost prema COX-1 koji je prisutan u trombocitima (1).

Kao aromatični estar, acetilsalicilna kiselina je nestabilna i lako podleže hidrolizi, pri čemu nastaju salicilna i sirćetna kiselina (Slika 1).



Slika 1. Hidroliza acetilsalicilne kiseline.

Figure 1. Hydrolysis of acetylsalicylic acid.

Zavisnost hidrolize acetilsalicilne kiseline od pH sredine ukazuje na specifičnu baznu i kiselu hidrolizu. Najveća stabilnost se javlja pri pH 2,5(2). Stabilnost acetilsalicilne kiseline u farmaceutskim formulacijama se povećava smanjenjem kontakta acetilsalicilne kiseline sa vodom, baznim supstancama i nukleofilima. Utvrđeno je i da stearati u čvrstим formulacijama direktno utiču na brzinu razgradnje acetilsalicilne kiseline. Pored uobičajenih proizvoda hidrolize, utvrđeno je i prisustvo salicilsalicilne i salicilacetilsalicilne kiseline (2,3).

Razvijene su i publikovane brojne metode za analizu acetilsalicilne kiseline i njenih srodnih supstanci. Najčešće korišćena instrumentalna metoda je tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC – eng. *High Performance Liquid Chromatography*). Ova metoda je primenjena za analizu acetilsalicilne kiseline u različitim farmaceutskim formulacijama (4,5), biološkom materijalu (6-8) i hrani (9). Za određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline u humanoj plazmi korišćene su LC/MS-MS (eng. *liquid chromatography tandem-mass spectrometry*) metode, nakon

precipitacije proteina acetonitrilom i tečno-tečne ekstrakcije (10-12), a za određivanje ovih analita u urinu životinja korišćena je UHPLC (eng. *ultra high performance liquid chromatography*) metoda nakon čvrsto-tečne ekstrakcije (13). Pored različitih modifikacija metode tečne hromatografije, korišćene su hromatografija na tankom sloju (14), GC/MS-MS (eng. *gas chromatography tandem-mass spectrometry*, (15)) UV-spektrofotometrija (16), derivativna spektrofotometrija (17) i elektrohemijske metode (18-20).

Cilj ovog rada je da se razvije i validira HPLC metoda za određivanje sadržaja acetilsalicilne i salicilne kiseline u šest doziranih oblika koji su prisutni na našem tržištu.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Rastvarači, reagensi, standardne supstance i dozirani oblici

Za pripremu mobilne faze korišćeni su sledeći rastvarači i reagensi: acetonitril HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Nemačka), fosforna kiselina 85% (Riedel-de Haen, Švajcarska) i voda HPLC čistoće. Za razvoj i validaciju metode korišćeni su radni standardi acetilsalicilne kiseline (Actavis, Srbija) i salicilne kiseline (Lachema, Češka). Ispitivani farmaceutski oblici su:

1. Anbol<sup>®</sup>, tablete, 300 mg (Galenika, Srbija)

Placebo: Aluminijum-hidroksid (u obliku sušenog aluminijum-hidroksid gela), magnezijum-hidroksid, povidon K-30, krospovidon, magnezijum-stearat.

2. Andol<sup>®</sup>C, šumeće tablete 500 mg/250 mg, acetilsalicilna kiselina/askorbinska kiselina (Pliva Hrvatska d.o.o, Hrvatska)

Placebo: Limunska kiselina bezvodna, natrijum-hidrogenkarbonat, natrijum-karbonat bezvodni, natrijum-dihidrogencitrat, natrijum-citrat, povidon K-30, manitol, dokusat-natrijum, simetikon, natrijum-ciklamat, saharin-natrijum, aroma limuna KS 145.

3. Aspirin<sup>®</sup>500, tablete, 500 mg (Bayer Bitterfeld GmbH, Nemačka)

Placebo: Celuloza u prahu, kukuruzni skrob.

4. Aspirin<sup>®</sup>Complex, granule za oralnu suspenziju 30 mg/500 mg pseudofedrin/acetilsalicilna kiselina (Bayer Bitterfeld GmbH, Nemačka)

Placebo: saharoza, hipromeloza, sukraloza, aroma vanile, aroma pepermint mentol eukaliptus.

5. Midol<sup>®</sup>, gastrorezistentne tablete, 100 mg (Hemofarm A.D, Srbija)

Placebo: Celuloza prašak, skrob preželatinizovani, silicijum-dioksid koloidni bezvodni, stearinska kiselina, trietilcitrat, talk, simetikon emulzija, metakrilna kiselina-etilakrilat kopolimer (1:1) disperzija 30% koja sadrži Polisorbat 80 i natrijum-laurilsulfat.

6. Cardiopirin®, 100 mg, gastrorezistentne tablete (G.L.Pharma GmbH, Austrija)  
Jezgro tablete: laktoza monohidrat, celuloza mikrokristalna, silicijum-dioksid koloidni bezvodni, skrob krompirov.  
Film (obloga) tablete: talk, triacetin, metakrilna kiselina-etilakrilat kopolimer (1:1) disperzija 30%.

Za validaciju metode korišćen je preparat Anbol®, 300 mg, tablete.

## Hromatografski uslovi

HPLC analiza je rađena na hromatografskom sistemu HP 1100 (Hewlett-Packard, SAD) koji je opremljen binarnom pumpom, manuelnim injektorom i UV/VIS detektorom. Srednja preciznost je rađena na hromatografskom sistemu Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Nemačka) opremljenim kvaternernom pumpom, autosemplerom i DAD (eng. *Diode Array Detector*). Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical 4,6x150 mm, veličina čestica 5 µm. Mobilnu fazu čine smeša A i B u odnosu 65:35 (V/V). Smeša A je voda HPLC čistoće i 85% fosforne kiseline u odnosu 80:0,5 (V/V), a B je acetonitril. Protok je bio 1,0 mL/min, talasna dužina detekcije 240 nm, a temperatura kolone 35°C.

## Priprema rastvora za razvoj i optimizaciju HPLC metode.

*Priprema rastvarača:* Rastvarač za pripremu radnih rastvora je smeša acetonitrila, vode HPLC čistoće i 85% fosforne kiseline u odnosu 80:20:0,5 (V/V/V).

*Priprema osnovnog rastvora standarda acetilsalicilne kiseline:* Odmeri se tačno 25,6 mg acetilsalicilne kiseline i kvantitativno prenese u odmerni sud od 10 mL. Supstanca se rastvori u rastvaraču uz mešanje u ultrazvučnom kupatilu, a zatim sud dopuni do oznake. Ovako pripremljen osnovni rastvor se čuva u frižideru na temperaturi od 2°C do 8°C. Koncentracija dobijenog rastvora je 2,56 mg/mL.

*Priprema osnovnog standarda salicilne kiseline:* Odmeri se tačno 11 mg salicilne kiseline i kvantitativno prenese u odmerni sud od 10 mL. Supstanca se rastvori u rastvaraču uz mešanje u ultrazvučnom kupatilu, a zatim sud dopuni do oznake. Ovako pripremljen osnovni rastvor se čuva u frižideru na temperaturi od 2°C do 8°C. Koncentracija dobijenog rastvora je 0,11 mg/mL.

*Priprema radnog rastvora standardnih supstanci za razvoj i optimizaciju metode:* U odmerni sud od 5 mL otpipetira se 750 µL osnovnog rastvora standarda acetilsalicilne kiseline i 550 µL osnovnog rastvora standarda salicilne kiseline i dopuni do oznake rastvaračem. Na ovaj način dobija se rastvor koncentracije 0,38 mg/mL za acetilsalicilnu kiselinsku, odnosno 0,012 mg/mL za salicilnu kiselinu.

*Priprema rastvora uzorka placebo.* Odmeri se 200 mg uzorka placebo i prenese u odmerni sud od 50 mL, doda oko 2/3 rastvarača i rastvara u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Posle hlađenja do sobne temperature, sud se dopuni rastvaračem do oznake. Rastvor se profiltrira kroz najlonski filter veličine pora 0,45 µm. Otpipetira se 667 µL filtrata u odmerni sud od 10 mL i dopuni rastvaračem do oznake.

*Priprema rastvora placebo opterećenog standardima.* Odmeri se 200 mg uzorka placebo i prenese u odmerni sud od 50 mL. Doda se odgovarajuća zapremina radnog rastvora standardnih supstanci i oko 2/3 rastvarača i rastvara u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Posle hlađenja do sobne temperature, sud se dopuni rastvaračem do oznake. Rastvor se profiltrira kroz najlonski filter veličine pora 0,45 µm. Otpipetira se 667 µL filtrata u odmerni sud od 10 mL i dopuni rastvaračem do oznake.

*Priprema rastvora uzorka Anbol®, 300 mg, tableta.* Izmeri se masa Anbol®, 300 mg, tableta i izračuna prosečna masa. U tarioniku sa pistilom se spraše tablete, odmeri masa koja odgovara prosečnoj masi tablete i kvantitativno prenese u odmerni sud od 50 mL. Doda se 2/3 rastvarača i rastvara u ultrazvučnom kupatilu 15 min. Posle hlađenja do sobne temperature, sud se dopuni rastvaračem do oznake. Dobijena suspenzija se profiltrira kroz najlonski filter veličine pora 0,45 µm. Otpipetira se 667 µL filtrata u odmerni sud od 10 mL i dopuni rastvaračem do oznake. Na isti način pripremaju se i rastvori uzoraka ostalih preparata koji su korišćeni u ovom ispitivanju.

## Validacija metode

Predložena HPLC metoda je validirana prema ICH (eng. *International Conference on Harmonisation*) smernicama (21) i kriterijumima za prihvatanje rezultata za selektivnost, linearnost, preciznost, tačnost i robustnost.

*Selektivnost.* Selektivnost metode ispitana je injektovanjem tri rastvora pod optimalnim hromatografskim uslovima: radnog rastvora standardnih supstanci (smeša acetilsalicilne i salicilne kiseline), rastvora placebo Anbol® tableta i rastvora placebo Anbol® tableta opterećenog standardima acetilsalicilne i salicilne kiseline. Selektivnost se procenjuje poređenjem odgovora potencijalno interferirajućih supstanci na retencionim vremenima koja odgovaraju acetilsalicilnoj i salicilnoj kiselini.

*Linearost.* Za konstrukciju kalibracionih krivih, pet rastvora acetilsalicilne kiseline i salicilne kiseline pripremljeno je razblaživanjem odgovarajućih standardnih rastvora rastvaračem. Linearnost za acetilsalicilnu kiselinsku je ispitana u opsegu

0,025-0,4 mg/mL, a za salicilnu kiselinu u opsegu 0,0025-0,015 mg/mL. Svaka tačka na kalibracionoj krivoj predstavlja srednju vrednost tri nezavisna merenja.

*Preciznost.* Preciznost metode ispitana je na tri nivoa - preciznost uređaja, ponovljivost i srednja preciznost. Za ispitivanje preciznosti uređaja napravljen je jedan uzorak u ispitivanoj koncentraciji (100%) i injektovan 10 puta. Za ispitivanje ponovljivosti pripremljeno je 6 uzoraka i svaki je injektovan po jednom. Na isti način je ispitana i srednja preciznost, ali na drugom HPLC uređaju, drugog dana i od strane drugog analitičara. Sadržaji acetilsalicilne i salicilne kiseline određeni su metodom standarda i izračunate su relativne standardne devijacije (RSD).

*Tačnost.* Tačnost metode je ispitana opterećivanjem placebo acetilsalicilnom i salicilnom kiselinom u koncentracijama 75% (0,3 mg/mL za acetilsalicilnu, odnosno 0,009 mg/mL za salicilnu kiselinu), 100% (0,4 mg/mL za acetilsalicilnu, odnosno 0,012 mg/mL za salicilnu kiselinu) i 125% (0,5 mg/mL za acetilsalicilnu, odnosno 0,015 mg/mL za salicilnu kiselinu). Pod optimalnim hromatografskim uslovima analiti su injektovani za sve tri koncentracije u triplikatu i izračunate su *Recovery* vrednosti.

*Robusnost.* Robusnost metode je ispitana tako što su vršene male promene odabranih hromatografskih parametara (temperature kolone, udela komponenata mobilne faze i brzine protoka mobilne faze) i praćen je njihov uticaj na rezultate (površine pikova acetilsalicilne i salicilne kiseline). Radni rastvor standardnih supstanci injektovan je pod optimalnim hromatografskim uslovima, nakon čega su menjani odabrani hromatografski parametri na sledeći način: temperatura kolone (32°C i 38°C), udeo komponenata mobilne faze A i B (66:34 i 64:36 V/V) i brzina protoka mobilne faze (1,05 mL/min i 0,95 mL/min).

## REZULTATI I DISKUSIJA

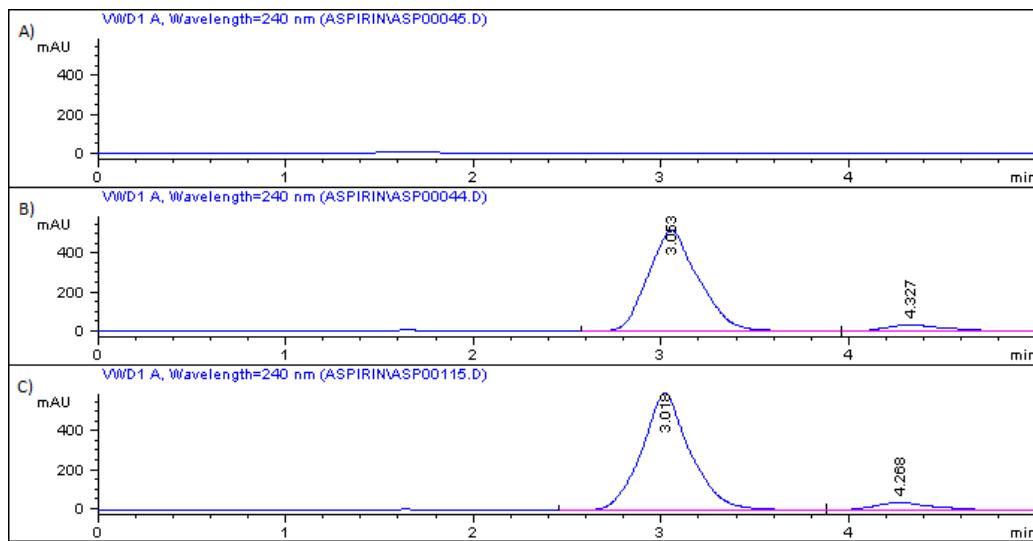
Razvoj i optimizacija hromatografske metode zahteva određivanje optimalnih hromatografskih uslova koji će omogućiti dobro razdvajanje ispitivanih supstanci i njihovo određivanje u prihvativom vremenu trajanja analize. Tokom razvoja predložene HPLC metode za određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline menjani su sledeći parametri: udeo komponenata mobilne faze, brzina protoka mobilne faze, talasna dužina detekcije i sastav rastvarača za ekstrakciju. U odnosu na početne hromatografske uslove (5), povećan je udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, tako da je odnos A i B 70:30 (V/V). Eluent A je voda HPLC čistoće i 85% fosforna kiselina u odnosu 80:0,5 (V/V), a B acetonitril. Za talasnu dužinu detekcije je izabrana 240 nm, jer na ovoj talasnoj dužini acetilsalicilna i salicilna kiselina dobro apsorbuju. Kao rastvarač za ekstrakciju korišćena je smeša mobilne faze A i B u odnosu 50:50 (V/V). Pod ovim hromatografskim uslovima retenciono vreme acetilsalicilne kiseline je 2,5 minuta, a salicilne kiseline 3,76 minuta. Askorbinska kiselina i pseudoefedrin koji su prisutni u nekim od ispitivanih kombinovanih preparata nisu ometali analizu, jer se retenciono

vreme askorbinske kiseline poklapa sa hromatografskim pikom mobilne faze, a pseudoefedrin se ne detektuje na toj talasnoj dužini. U sledećem koraku, protok je smanjen na 1,0 mL/min, a u mobilnoj fazi je povećan ideo organskog rastvarača, tako da je odnos A i B 65:35 (V/V). Kao rastvarač korišćene su mobilne faze A i B u odnosu 50:50 (V/V). Retenciono vreme salicilne kiseline je 3,03 minuta, a salicilne kiseline 4,3 minuta. Da bi se poboljšala simetrija pikova acetilsalicilne i salicilne kiseline, menjan je sastav rastvarača. Pokazalo se da smeša A i B u odnosu 80:20 (V/V) ne daje dobru simetriju, kao ni smeša A i B u odnosu 20:80 (V/V). Kao optimalan rastvarač izabrana je smeša acetonitril-voda-85% fosforna kiselina u odnosu 80:20:0,5 (V/V/V). Vrednost pH eluenta A je oko 1,8. Kada se eluent A pomeša sa acetonitrilom, vrednost pH je veća od 2, što zadovoljava uslov specifikacije proizvođača kolone za opseg pH od 2 do 9.

Analizom uticaja promene parametara na faktor kapaciteta ( $k$ ), širinu pika i simetriju pika, definisani su optimalni hromatografski uslovi za ispitivani sistem. Stacionarna faza je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical 4,6x150 mm, veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ . Mobilnu fazu čine smeša A i B u odnosu 65:35 (V/V). Smeša A je voda HPLC čistoće i 85% fosforna kiselina u odnosu 80:0,5 (V/V), a B je acetonitril. Analiza se izvodi pri protoku 1,0 mL/min, na talasnoj dužini detekcije 240 nm i temperaturi od 35°C.

Predložena metoda je validirana prema smernicama ICH (21) i određeni su sledeći parametri validacije: selektivnost, linearност, preciznost, tačnost i robusnost za oba analita, kao i limiti detekcije i kvantifikacije za salicilnu kiselinu.

**Selektivnost** HPLC metode potvrđena je injektovanjem radnog rastvora standardnih supstanci, placebo opterećenog standardima acetilsalicilne i salicilne kiseline, kao i rastvora placebo. Na retencionim vremenima koja odgovaraju acetilsalicilnoj i salicilnoj kiselini nisu se nalazile komponente koje interferiraju, pa se može zaključiti da je metoda selektivna. Na Slici 2 prikazani su hromatogrami dobijeni pri ispitivanju selektivnosti.



**Slika 2.** Hromatogrami dobijeni pri ispitivanju selektivnosti: A) hromatogram rastvora placebo Anbol® tableta; B) hromatogram radnog rastvora standardnih supstanci (acetilsalicilne i salicilne kiseline); C) hromatogram rastvora placebo Anbol® tableta opterećenog standardima acetilsalicilne i salicilne kiseline.

**Figure 2.** Chromatograms obtained in selectivity testing. A) chromatogram of Anbol® tablets; B) chromatogram of standard solution (acetylsalicylic and salicylic acid); C) chromatogram of Anbol® placebo solution spiked with acetylsalicylic and salicylic acid.

Da bi se metoda primenjivala u kvantitativnoj analizi, potrebno je odrediti **limit detekcije (LOD)** i **limit kvantifikacije (LOQ)** za salicilnu kiselinsku kao nečistoću. Najmanja koncentracija pri kojoj se površina pika može detektovati predstavlja eksperimentalno dobijeni LOD. Najmanja koncentracija pri kojoj površina pika može da se integriše (RSD za šest ponavljanja  $\leq 2\%$ ) predstavlja eksperimentalno dobijeni LOQ. Limiti detekcije i kvantifikacije za salicilnu kiselinsku su određeni metodom kalibracione krive. LOD i LOQ iznose 0,0006 mg/mL, odnosno 0,0022 mg/mL (0,15%, odnosno 0,55% u odnosu na koncentraciju acetilsalicilne kiseline).

Za procenu **linearnosti** metode analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih jedinjenja u funkciji koncentracije. Pokazano je da je odgovor detektora (površina signala) proporcionalan koncentraciji analita u ispitivanom intervalu. Kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata. Parametri linearnosti prikazani su u Tabeli I.

**Tabela I** Parametri linearnosti metode.**Table I** Linearity parameteres of the method.

	Acetilsalicilna kiselina	Salicilna kiselina
Opseg linearnosti (mg/mL)	0,025-0,400	0,0025-0,015
$a^*$	26412	71220
$B$	188,91	-12,961
$R$	0,9998	0,9991
$P$	0,0737	0,4158

\* $a$  – nagib;  $b$  – odsečak;  $r$  – koeficijent korelacije;  $p$  – statistička značajnost odsečka kalibracione krive

Regresiona analiza pokazala je da je metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija, jer su vrednosti koeficijenata korelacije veće od 0,99 (za nečistoću) i 0,999 (za aktivnu supstancu). Vrednosti  $p$  takođe ispunjavaju zahteve za linearnost jer su veće od 0,05.

**Preciznost** metode ispitana je na tri nivoa – preciznost uređaja, ponovljivost i srednja preciznost. Sadržaji acetilsalicilne i salicilne kiseline određeni su metodom standarda i izračunate su relativne standardne devijacije (RSD). Zahtev za preciznost uređaja je  $RSD < 1\%$ , za ponovljivost  $<2\%$ , a za srednju preciznost  $<3\%$  (22). Ponovljivost za nečistoće čiji je sadržaj  $> 1\%$  je zadovoljena ako je  $RSD < 5\%$ . Dobijene RSD vrednosti potvrđuju preciznost metode i prikazane su u Tabeli II.

**Tabela II** Rezultati ispitivanja preciznosti metode.**Table II** Results of method precision testing.

Analit	Nivo	RSD (%)
Acetilsalicilna kiselina	Preciznost uređaja	0,61
	Ponovljivost	1,14
	Srednja preciznost	1,51
Salicilna kiselina	Preciznost uređaja	1,45
	Ponovljivost	3,88
	Srednja preciznost	2,16

**Tačnost** metode ispitivana je injektovanjem rastvora analita u triplikatu u koncentracijama 75%, 100% i 125% i određivanjem sadržaja analita metodom standarda. Izračunavanjem *Recovery* vrednosti potvrđena je tačnost metode u ispitivanom opsegu. Kao zahtev je postavljeno da je *Recovery* vrednost za aktivne supstance 98% - 102%, a za nečistoće čiji je sadržaj >1% iznosi 90% - 110% (22). Rezultati ispitivanja tačnosti metode prikazani su u Tabeli III.

**Tabela III** Rezultati ispitivanja tačnosti metode.

**Table III** Results of method accuracy testing.

Analit	Koncentracija (%)	Dodata koncentracija (mg/mL)	Izračunata koncentracija (mg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Acetil-salicilna kiselina	75	0,307	0,305	99,52	3,68
	100	0,410	0,414	101,01	1,32
	125	0,487	0,485	99,56	0,80
Salicilna kiselina	75	0,0088	0,0087	98,55	4,02
	100	0,0121	0,0122	101,31	1,41
	125	0,0143	0,0145	101,19	1,04

Robusnost metode ispituje se tako što se vrše male izmene parametara (temperatura kolone, udio komponenata mobilne faze i brzina protoka mobilne faze) i prati njihov uticaj na rezultat. Kao odgovori hromatografskog sistema prate se površine pikova acetilsalicilne i salicilne kiseline. Rezultati ispitivanja robusnosti metode prikazani su u Tabeli IV.

**Tabela IV** Eksperimentalno dobijeni rezultati za procenu robusnosti metode.**Table IV** Experimentally obtained results of method robustness analysis.

	Acetilsalicilna kiselina		Salicilna kiselina	
	Vrednost u odnosu na optimalne uslove (%)	Odstupanje od optimalnog (%)	Vrednost u odnosu na optimalne uslove (%)	Odstupanje od optimalnog (%)
Temperatura 32°C	100,49	+0,49	99,56	-0,44
Temperatura 38°C	101,97	+1,97	101,20	+1,20
Udeo komponenata MF* 66:34	102,12	+2,12	101,58	+1,58
Udeo komponenata MF* 64:36	100,56	+0,56	101,48	+0,56
Protok MF 1,05 mL/min	97,08	-2,92	97,84	-2,16
Protok MF 0,95 mL/min	102,57	+2,57	102,13	+2,13

\*MF – mobilna faza

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da male promene izabranih parametara nemaju značajan uticaj na površine pikova acetilsalicilne i salicilne kiseline. Na taj način je potvrđena robusnost metode.

Predloženu metodu karakterišu slični ili nešto niži limiti kvantifikacije i detekcije za salicilnu kiselinu kao i slično vreme trajanja analize u odnosu na do sada publikovane HPLC metode sa UV detekcijom. Metodu prikazanu u ovom radu karakteriše odsustvo interferencija sa aktivnim supstancama koje mogu biti prisutne u ispitivanim formulacijama u kombinaciji sa acetilsalicilnom kiselinom (askorbinskom kiselinom i pseudoefedrinom).

### Primena HPLC metode u analizi doziranih oblika

Za potvrdu primenljivosti predložene HPLC metode izvršena je kvantitativna analiza Anbol®300 mg tableta, Aspirin®500 mg tableta, Cardiopirin®75 mg gastrorezistentnih tableta, Midol®100 mg gastrorezistentnih tableta, Andol® C šumećih

tableta i Aspirin®complex granula za oralnu suspenziju. Rezultati ispitivanja su prikazani u Tabeli V.

**Tabela V** Rezultati ispitivanja doziranih oblika.

**Table V** Results of dosage forms analysis.

Uzorak	Sadržaj acetilsalicilne kiseline	Sadržaj salicilne kiseline
Anbol® 300 mg tablete	100,61% (301,83 mg/tbl)	< LOQ
Aspirin®500 mg tablete	101,18% (505,91 mg/tbl)	< LOQ
Cardiopirin®75 mg gastrorezistentne tablete	97,39% (73,04 mg/tbl)	0,89%
Midol®100 mg gastrorezistentne tablete	97,21% (97,21 mg/tbl)	< LOQ
Andol® C šumeće tablete	103,89% (519,44 mg/tbl)	0,79%
Aspirin®complex granule	98,88% (494,4 mg/tbl)	< LOQ

Svi rezultati ispitivanja odgovaraju zahtevima specifikacija proizvođača.

## Zaključak

Nova HPLC metoda je pogodna za istovremenu analizu acetilsalicilne kiseline i njenog proizvoda hidrolize, salicilne kiseline. Metoda omogućava selektivnu kvantifikaciju ova dva analita u toku 5 minuta, bez interferencije komponenata placebo i drugih aktivnih supstanci u ispitanim formulacijama. Parametri validacije (selektivnost, linearost, preciznost, tačnost i robusnost za oba analita, kao i LOD i LOQ za salicilnu kiselinu) potvrđuju da predložena HPLC metoda pod datim eksperimentalnim uslovima predstavlja precizan, tačan, selektivan i reproduktivan postupak za kvantitativnu analizu acetilsalicilne i salicilne kiseline i da se može rutinski primenjivati u laboratorijama za kontrolu kvaliteta.

## Zahvalnica

Rad je deo Projekta br. 172041 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## Literatura

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija, peto izdanje (prvo srpsko izdanje), Data status, Beograd, 2005.
2. Connors KA. Aspirin in Drug Stability, Principles, and Practices, 2nd ed, ed. Carsten JT, Marcel Dekker, New York, 1995, str. 221.
3. Williams RO, Liu J. Influence of formulation technique for hydroxypropylbeta-cyclodextrin on the stability of aspirin in HFA 134a. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1999; 47: 145-52.
4. Neves de Aguiar JL, Leandro KC, Shirley de Mello PA, Albert ALM. Development of a new analytical method for determination of acetylsalicylic and salicylic acids in tablets by reversed phase liquid chromatography. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2009; 45: 723-27.
5. Fogel J, Epstein P, Chen P. Simultaneous high-performance liquid chromatography assay of acetylsalicylic acid and salicylic acid in film-coated aspirin tablets. *J. Chromatogr.* 1984; 317: 507-11.
6. Belov VY, Kursakov SV, Sevastyanov VI, Antonov EN, Bogorodskii SÉ, Popov VK. Development of an HPLC-UV method for quantitative determination of acetylsalicylic acid and its main metabolite. *Pharm. Chem. J.* 2018; 52 (2): 151-55.
7. Hobl E-L, Jilma B, Ebner J, Schmid RW. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by isocratic high-pressure liquid chromatography with post-column hydrolysis and fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 2013; 27 (6): 695-98.
8. Pirola R, Bareggi SR, De Benedittis G. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B:* 1998; 705 (2): 309-15.
9. Venema DP, Hollman P, Janssen K, Katan M. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in foods, using HPLC with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44 (7): 1762-67.
10. Sirok D, Pátfalusi M, Szeleczky G, Somorjai G, Greskovits D, Monostory K. Robust and sensitive LC/MS-MS method for simultaneous detection of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma. *Microchem. J.* 2018; 136: 200-08.
11. Bae SK, Seo KA, Jung EJ, Kim H-S, Yeo C-W, Shon J-H, Park K-M, Liu K-H, Shin J-G. Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid, in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix® in Korean healthy volunteers. *Biomed. Chromatogr.* 2008; 22: 590 –95.
12. Xu X, Koetzner L, Boulet J, Maselli H, Beyenhof J, Grover G. Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23 (9): 973-79.
13. Castillo-García M, Aguilar-Caballos MP, Gómez-Hens A. Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 2015; 985: 85-90.

14. Dołowy M, Pyka-Pająk A. Development of new procedures for the detection and separation of salicylic acid and acetylsalicylic acid using thin-layer chromatography with densitometry. *J. Planar Chromatogr.* 2017; 30 (5): 363-74.
15. Tsikas D, Tewes KS, Gutzki F-M, Schwedhelm E, Greipel J, Frölich JC. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric determination of acetylsalicylic acid in human plasma after oral administration of low-dose aspirin and guaimesal. *J. Chromatogr. B.* 1998; 709 (1): 79-88.
16. Dolores M, Morales-Hipólito EA, Garduño-Rosas JA, Villaseñor A, López-Arellano R. Development and validation of an alternate stability-indicating UV spectrophotometric analytical method for aspirin in tablets. *Indian J. Pharm. Sci.* 2016; 78 (6): 810-17.
17. Kokot Z, Burda K. Simultaneous determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid in aspirin delayed-release tablet formulations by second-derivative UV spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; 18(4-5):871-75.
18. Maia Quintino MS, Corbo D, Bertotti M, Angnes L. Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions. *Talanta.* 2002; 58 (5): 943-49.
19. Paseková H, Sales MG, Montenegro MC, Araújo AN, Polášek M. Potentiometric determination of acetylsalicylic acid by sequential injection analysis (SIA) using a tubular salicylate-selective electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 24 (5–6): 1027-36.
20. Torriero A, Luco J, Sereno L, Raba J. Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. *Talanta.* 2004; 62 (2): 247-54.
21. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH, Geneva, Switzerland, 2009. (<http://www.ich.org>).
22. Crowther J. Validation of pharmaceutical test methods, in: Ahuja S, Scypinsky S. (Eds.), *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Academic Press, San D. 2001; 415-43.

# **Development and validation of liquid chromatography method for determination of acetylsalicylic and salicylic acid in dosage forms**

**Danijela Damnjanović, Vladimir Dobričić\*,  
Olivera Čudina, Sote Vladimirov**

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, Belgrade

---

## **Summary**

Acetylsalicylic acid belongs to nonsteroidal anti-inflammatory drugs with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties. The aim of this work was development and validation of HPLC method for qualitative and quantitative analysis of acetylsalicylic acid and its major degradation product, salicylic acid, in dosage forms. The optimal separation was achieved using Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical column (4,6x150 mm, particle size 5 µm) thermostated at 35°C. Mobile phase consisted of eluents A and B in ratio 65:35 (V/V). As the eluent A, water of HPLC purity and 85% phosphoric acid in ratio 80:0.5 (V/V) were used, while acetonitrile was used as the eluent B. The flow rate was 1.0 mL/min and UV detection was performed at 240 nm. The method was validated in terms of selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness for both analytes, as well as limits of detection and quantification for salicylic acid. The obtained results meet the requirements of analytical procedures validation. The proposed HPLC method was applied in qualitative and quantitative analysis of acetylsalicylic and salicylic acids in six different forms of drugs. All obtained results meet the requirements of manufacturer specifications. The established HPLC method was found to be rapid, simple, accurate and selective for simultaneous determination of acetylsalicylic and salicylic acids in dosage forms.

**Keywords:** acetylsalicylic acid, salicylic acid, liquid chromatography, validation of method

---

## The athlete's heart – modern diagnostic approach

Jelena Ćuk<sup>1\*</sup>, Stanimir Stojiljković<sup>2</sup>, Katarina Milutinović<sup>1</sup>,  
Dimitrije Cvetković<sup>3</sup>, Vesna Pešić<sup>1</sup>, Ross Arena<sup>4</sup>, Dejana Popović<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Faculty of Sport and Physical Education, University of Belgrade,  
Blagoja Parovica 156, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Clinic for Cardiology, Clinical Center of Serbia, Višegradska 26, Belgrade, Serbia

<sup>4</sup> Department of Physical Therapy, Faculty of Applied Health Sciences, University of Illinois, Chicago, 1919 West Taylor Street, Chicago, IL 60612,

### Abstract

The athlete's heart is an exercise-induced cardiac remodelling phenomenon, which is individual and depends on the intensity, duration and frequency of training, as well as genetic factors. Cardiovascular screening prior to participation in sports activities, is a systematic practice of medical evaluation in the athlete population. The current US recommendations for the screening of cardiovascular abnormalities in high school and university athletes at all levels of performance were initially put forth by the American Heart Association in 2007. These recommendations consist of 12 points, factoring personal and family history data, as well as physical examination. On the other hand, European recommendations suggest the importance of non-invasive diagnostic methods, such as the 12-lead ECG, which should be carried out in combination with a history and physical examination. According to the European Association for Cardiovascular Imaging, standard echocardiography is the first line approach to differentiate an athlete's heart from pathological left ventricular hypertrophy. Updated „Seattle criteria“ from 2017. include criteria for assessing abnormalities in the electrocardiogram of athletes and their differentiation from the adaptive electrophysiological changes, which do not require further evaluation. Since sudden cardiac death during sport activities remains a major concern and, as such, it is imperative for the physician to diagnose unrecognized pathological conditions in athletes. Following current expert consensus recommendations on this topic helps to prevent untoward events during physical activity in those who are found to be at elevated risk.

**Keywords:** athlete's heart, screening, left ventricular hypertrophy

## **Introduction**

The concept of athlete's heart was first described in the literature at the end of the 19<sup>th</sup> century, when, almost simultaneously, Henschen and Darling published their observations of heart enlargement in Norwegian skiers and Harvard rowers. The first electrocardiographic (ECG) and radiological studies dealing with the athlete's heart were made in the early 1960's (1-3).

The athlete's heart is an exercise-induced cardiac remodelling phenomenon. This term was introduced for the first time in 1902, and considers a set of morpho-functional and electrophysiological cardiovascular changes that arise as an adaptive response of the heart and blood vessels to increased hemodynamic requirements during high volume exercise/sports training (4). Today, these changes are known to be individual and depend on the intensity, duration and frequency of training, as well as genetic phenotype (5,6).

In the past century, left ventricular hypertrophy has been found to be the most common morphological change in the heart of athletes (7). The development of diagnostic procedures such as echocardiography enabled contemporary studies to make a distinction between physiological left ventricular hypertrophy in athletes and hypertrophic cardiomyopathy, the latter being a hereditary disease that leads to electrical instability in the heart or sudden cardiac death in severe cases (8). The sudden cardiac death of an athlete is always a tragic event that shakes both the medical community and the general public, these deaths are most often caused by undetected cardiovascular diseases (9). Among these cardiovascular diseases, hypertrophic cardiomyopathy is the most common, occurring in almost one third of the cases and it is followed by congenital anomalies of the coronary arteries, dilatative cardiomyopathy, congenital heart defects, and others (10,11). In addition to the changes in the left ventricle, the importance of right heart disorders has been established over the last several decades (10).

### ***Guidelines/propositions for diagnostics***

Cardiovascular pre-participation screening, prior to participation in sports activities, is a systematic practice of medical evaluation in the athlete population. The purpose of this evaluation is identifying or raising suspicion of already existing abnormalities that precipitate progression of disease or sudden death (11). In other words, this screening determines medical clearance for participation in competitive sports. Although the screening process should include an assessment of all physiologic systems, there is a cardiovascular focus, given the most likely cause of an untoward event in athletes is sudden cardiac death. Raising the suspicion of cardiac abnormalities is only the initial step in a potential diagnosis, warranting additional diagnostic tests to be carried out (11).

At the 36th Bethesda Conference guide was developed with an algorithm that defines recommendations for the further actions in those who have a definite diagnosis of cardiac disease (12). There are three possibilities following a medical evaluation; 1) continuing active participation; 2) exclusion from sports; or 3) considering prophylactic or therapeutic interventions in those who have high-risk, genetically-conditioned, heart conditions (e.g., cardioverter defibrillator (ICD) implantation). These recommendations relate primarily to the mass screenings conducted for athletes at high schools and universities, of all races and sexes, although they can be applied to juniors (athletes under 12 years old), seniors (athletes older than 30), as well as in the clinical assessment of a small groups of athletes or individuals. In these small groups, pre-participation screening often involves non-invasive diagnostic methods, in addition to anamnesis and physical examination (12).

In most countries screening for cardiovascular disease is only performed in elite athletes (at international and Olympic competitions). The exceptions are the United States, Italy and Israel, which use comprehensive screenings for athletes across a wider skill spectrum (i.e., not only the elite athletes) (12).

The current US recommendations for the screening of cardiovascular abnormalities in high school and university athletes at all levels of performance were initially put forth by the American Heart Association (AHA) in 2007 (13). These recommendations consist of 12 points, factoring personal and family history data as well as physical examination. Questions from personal history capture the presence of chest pain or discomfort, increased blood pressure, previously observed heart murmur, or unexplained syncope or dyspnea related to physical activity. Significant family history data include the incidence of premature death due to heart disease in one or more close relatives under the age of 50, a disability due to heart disease in the close relatives before the age of 50, the existence of hypertrophic or dilatative cardiomyopathy, a prolonged QT interval syndrome or other ion channelopathies in family members. During the physical examination, it is important to record heart murmurs, femoral pulse (to exclude coarctation of the aorta), Marfan syndrome signs (connective tissue disease causing sudden death), and elevated blood pressure measured in the resting sitting position (13). A positive response to any of these 12 questions (or more) arouses suspicion of cardiovascular abnormalities and should be an indication for further diagnosis (13).

The AHA's official position is that non-invasive diagnostic methods, such as ECG and echocardiography, should not be conducted as a mass, universal screening. There are several reasons for this: the size of the population of athletes who would be subject to mass screening is very high, while the prevalence of cardiovascular conditions that leads to fatalities in sports is still very small. Furthermore, the availability of resources for performing such screening is currently limited, as does the lack of educated

professionals which are able to adequately interpret the results. Consequently, the number of false positive results would be notable, which would lead to unnecessary anxiety among athletes and unjustified exclusion from sports. However, this is not diminishing the value of ECG, as it can detect 90% of hypertrophic cardiomyopathy cases, which is the most common cardiovascular cause of sudden death of athletes (13).

On the other hand, European recommendations, which take into account 25-year-old Italian research in this area, suggest the importance of non-invasive diagnostic methods, such as the 12-lead ECG, which should be carried out in combination with a history and physical examination (14,15). They report a decline in athletes' mortality due to cardiovascular deaths by as much as 90% annually in the Veneto region of northern Italy due to this approach. New recommendations of the European Society of Cardiology (ESC) are based on the diagnostic evaluation of only those athletes who develop ECG changes unrelated to sports which could be an indicator of a deadly heart disease (16). On the other hand, there are some ECG changes common for highly trained athletes that should be considered as a physiologic phenotype, not warranting additional diagnostics, and allowing for continued participation in sports. Moreover, athletes falling into this physiologic phenotype category are likely engaged in sports an absence of symptoms or positive family history for heart disease or sudden cardiac death. The recommended approach in performing screening involves an evaluation of family and personal history, physical examination with mandatory blood pressure measurement and the 12-lead ECG. In the case of a negative family history, and the absence of symptoms and pathological findings during a physical examination, athletes are allowed to participate in sports without additional evaluation. The athletes who have been diagnosed with ECG changes from group I, which develop as an adaptive response to training (e.g., sinus bradycardia, first-degree atrio-ventricular block, early repolarization, uncomplicated block of the right branch, isolated QRS voltage criteria for the right chamber hypertrophy), are also allowed to continue sports activity (16).

In the case of a the positive family history, the presence of symptoms or pathological findings during physical examination, as well as ECG changes in group II (e.g., T wave inversion, ST segment depression, pathological Q wave, enlargement of the left atrium, deviation of the axis to the left / left anterior fascicular block, deviation of the axis to the right / left posterior fascicular block, right ventricular hypertrophy, preexcitation of the chamber, left or right bundle branch block, prolonged or shortened QT interval, Brugada-like early repolarization), further diagnostics tests, such as echocardiography, stress test, 24-hour holter monitoring, nuclear magnetic resonance imaging of the heart, electrophysiological investigations, angiography, and endomyocardial biopsy, are indicated (14,16,17).

## *Echocardiography*

According to the European Association for Cardiovascular Imaging (EACVI), standard echocardiography is the first line approach to differentiate an athlete's heart from pathological left ventricular hypertrophy. In professional athletes, end-diastolic diameter of the left ventricle greater (on average about 60 mm) compared to hypertrophic cardiomyopathy (about 45 mm) (18,19). In professional athletes, left ventricular hypertrophy involves all segments of the myocardium equally and the thickness of the interventricular septum should not exceed 12 mm (20). In contrast, in hypertrophic cardiomyopathy, the septum is usually  $>15$  mm (21). Sharma et al. Proposed the diagnostic criteria for hypertrophic cardiomyopathy be established at a heart septum thickness of 12 mm or more (22). After three months of physical deconditioning, a reduction in wall thickness of the left ventricle is observed in athletes, but not in hypertrophic cardiomyopathy (23). The EACVI experts have consensus that left ventricular hypertrophy in athletes is characterized by a normal ejection fraction, either normal or increased systolic volume, while the maximal left ventricular systolic wall motion velocity (more precisely its anulus) is greater than 9 cm/s. On the other hand, in hypertrophic cardiomyopathy, this velocity is less than 9 cm/s, and the ejection fraction may be normal or even increased at the onset of the disease, but at an advanced stage will decrease. Diastolic cardiac function is usually supernormal in athletes, which is primarily reflected by the ratio of the early and late diastolic left ventricular filling velocities (E/A), which is in their case greater than 2, whereas in hypertrophic cardiomyopathy less than 1 (24). Using echocardiography, Pelicia et al also proposed the upper limit of the antero-posterior left atrial diameter at athletes be set at 45 mm for women and 50 mm for men; values greater than these indicate pathological conditions (21).

Standard echocardiography is also a preferred method for differentiating right ventricular remodeling in the athlete's heart and pathological enlargement of the right ventricle (25,26).

In addition, it is expected that echocardiography may also diagnose other abnormalities of the cardiovascular system that may be the cause of sudden cardiac death in athletes, such as aortic stenosis, mitral valve prolapse, aortic root dilatation within Marfan's syndrome, dilatative cardiomyopathy, or arrhythmogenic cardiomyopathy of the right ventricle (10).

Apart from resting echocardiography, it is possible to screen athletes by using echocardiography during physical activity (i.e., stress echocardiography). This method is of moderate sensitivity and specificity for determination of the existence of coronary artery disease. For instance, if there is reduced resting ejection fraction in an athlete, usually less than 45%, it is necessary to examine myocardial contractile reserve during

effort. This can be quantified by stress echocardiography. If contractility during physical activity is maintained, the probability of coronary disease is low (27).

### ***Electrocardiography***

In 2012, the American Medical Association of Sports Medicine (AMSSM), sponsored by the FIFA Center for Medical Assessments and Research, held a Summit on the Interpretation of Athletes' Electrocardiograms in Seattle, Washington. At this meeting, the criteria for assessing abnormalities in the electrocardiogram of athletes and their differentiation from the expected and adaptive electrophysiological changes, which do not require further evaluation, were defined (28). These criteria are called the 'Seattle Criteria'. Updated criteria from 2017 (29) include the following:

1. T wave inversion ( $\geq 1$  mm in depth in two or more contiguous leads; excludes leads aVR, III and V1)
2. ST segment depression  $\geq 0.5$  mm in depth in two or more contiguous leads
3. Pathological Q waves Q/R ratio  $\geq 0.25$  or  $\geq 40$  ms in duration in two or more leads (excluding III and aVR)
4. Complete left bundle branch block QRS  $\geq 120$  ms, predominantly negative QRS complex in lead V1 (QS or rS) and upright notched or slurred R wave in leads I and V6
5. Profound non-specific intraventricular conduction delay (any QRS duration  $\geq 140$  ms)
6. Epsilon wave - a distinct low amplitude signal (small positive deflection or notch) between the end of the QRS complex and onset of the T wave in leads V1-V3
7. Ventricular pre-excitation PR interval  $< 120$  ms with a delta wave (slurred upstroke in the QRS complex) and wide QRS ( $\geq 120$  ms)
8. Prolonged QT interval: QTc  $\geq 470$  ms (male), QTc  $\geq 480$  ms (female), QTc  $\geq 500$  ms (marked QT prolongation)
9. Brugada type 1 pattern - coved pattern: initial ST elevation  $\geq 2$  mm (high take-off) with downsloping ST segment elevation followed by a negative symmetric T wave in  $\geq 1$  leads in V1-V3
10. Profound sinus bradycardia ( $< 30$  beats per minute or sinus pauses  $\geq 3$  s)
11. Profound  $1^\circ$  atrioventricular block  $\geq 400$  ms
12. Mobitz type II  $2^\circ$  atrioventricular block (intermittently non-conducted P waves with a fixed PR interval)

13.  $3^{\circ}$  atrioventricular block (complete heart block)
14. Atrial tachyarrhythmias, (supraventricular tachycardia, atrial fibrillation, atrial flutter)
15. Premature ventricular contractions ( $\geq 2$  premature ventricular contractions per 10 s tracing)
16. Ventricular arrhythmias (couplets, triplets and non-sustained ventricular tachycardia)

### ***Other diagnostic methods***

In the late 1980s and the 90s, the importance of contrast nuclear magnetic resonance (NMR) of the heart was recognized as useful diagnostic methods for assessing regional and global myocardial contractility. Contemporary work by Rickers C et al. and Moon JC et al. reveals the high sensitivity and specificity of this method in differentiating the athlete's heart from hypertrophic cardiomyopathy and idiopathic dilatative cardiomyopathy (30,31). Moreover, Scharf M. et al. (32) demonstrated that cardiac NMR imaging is a good alternative to echocardiography in the assessment of left atrial volume, as echocardiography has a tendency for its underestimation.

The EACVI supports consideration of cardiac NMR, coronary computed tomography angiography (CCTA), and perfusion techniques such as single-photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET) in symptomatic patients with suspected anomalies or coronary artery disease.

### ***Conclusion***

Since sudden cardiac death during sport activities remains a major concern and, as such, it is imperative for the physician to diagnose unrecognized pathological conditions in athletes. In athletes found to have cardiac conditions but continue to engage in sport activities, the role of physicians is significant in prescribing exercise intensity. Physical activity has vast beneficial effects, but, as it entails exertional stress, detailed health assessments become important before engaging in high intensity training. Following current expert consensus recommendations on this topic helps to prevent untoward events during physical activity in those who are found to be at elevated risk.

## Literature:

1. Henschen, S. Mitteilungen der Medizinische Klinik Upsala. Jena: Verlag von Gustav Fischer; 1899.
2. Darling EA. The Effects of Training. Boston Med Surg J 1899;141(9): 205-9.
3. Bulychev V, Khmelevskii VA, RutmanIuV. Roentgenological and instrumental examination of the heart in athletes.Klin Med 1965;43:108-14.
4. Moritz F. Uber orthodiagraphische untersuchungen am Herzen. Med Wohenschr 1902; 49.
5. Prior DL, La Gerche A. The athlete's heart Heart.Heart 2012; 98:947-55.
6. Popovic D, Plecas-Solarovic B, Petic V, Petrovic M, Vujisic-Tesic B, Popovic B, et al. How does stress possibly effect cardiac remodeling? Peptides 2014; 57:20-30.
7. Roske WR, O'Rourke RA, Klein A, Leopold G, Karliner JS. Noninvasive evaluation of ventricular hypertrophy in professional athletes. Circulation 1976;53:286-91.
8. Rawlins J, Bhan A, Sharma S. Left ventricular hypertrophy in athletes, Eur J Echocardiogr 2009; 10(3):350–6.
9. Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes: clinical, demographic and pathological profiles. JAMA 1996;276:199–204.
10. Maron, BJ. Sudden Death in Young Athletes.N Engl J Med 2003; 49(11):1064-75.
11. Corrado D, Pelliccia A, Bjørnstad HH, Vanhees L, Biffi A, Borjesson M, et al. Cardiovascular pre-participation screening of young competitive athletes for prevention of sudden death: proposal for a common European protocol: consensus statement of the Study Group of Sport Cardiology of the Working Group of Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology and the Working Group of Myocardial and Pericardial Diseases of the European Society of Cardiology. Eur Heart J 2005;26:516–24.
12. Maron BJ, Zipes DP. 36th Bethesda Conference: eligibility recommendations for competitive athletes with cardiovascular abnormalities. J Am Coll Cardiol 2005;45:1312–75.
13. Maron BJ, Thompson PD, Ackerman MJ, Balady G, Berger S, Cohen D. Recommendations and Considerations Related to Preparticipation Screening for Cardiovascular Abnormalities in Competitive Athletes: 2007 Update A Scientific Statement From the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Endorsed by the American College of Cardiology Foundation. Circulation 2007;115:1643-55.
14. Sharma S, Drezner JA, Baggish A, Papadakis M, Wilson MG, Jordan M et al. International recommendations for electrocardiographic interpretation in athletes, Eur Heart J 2018; 39(16): 1466–80.
15. Corrado D, Basso C, Pavei A, Michieli P, Schiavon M, Thiene G. Trends in sudden cardiovascular death in young competitive athletes after implementation of a preparticipation screening program. JAMA 2006;296(13):1596-601.

16. Corrado D, Pelliccia A, Heidbuchel H, Sharma S, Link M, Basso C et al. On behalf of the Sections of Sports Cardiology of the European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation; and the Working Group of Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology. Recommendations for interpretation of 12-lead electrocardiogram in the athlete. *Eur Heart J* 2010;31(2):243–59.
17. Pelliccia A, Caselli S, Sharma S, Basso S, Bax JJ, Corrado D et al. European Association of Preventive Cardiology (EAPC) and European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) joint position statement: recommendations for the indication and interpretation of cardiovascular imaging in the evaluation of the athlete's heart. *Eur Heart J*. 2017. doi: 10.1093/eurheartj/exz532. [Epub ahead of print]
18. Galderisi M, Cardim N, D'Andrea A, Bruder O, Cosyns B, Davin L, et al. The multi-modality cardiac imaging approach to the Athlete's heart: an expert consensus of the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015;16(4):353.
19. Caselli S, Mango F, Clark J, Pandian NG, Corrado D, Autore C, et al. Prevalence and Clinical Outcome of Athletes With Mitral Valve Prolapse. *Circulation*. 2018;137(19): 2080-82.
20. Spirito P, Pelliccia A, Proschak MA, Granata M, Spataro A, Bellone P, et al. Morphology of the 'athlete's heart' assessed by echocardiography in 947 elites athletes representing 27 sports. *Am J Cardiol* 1994;74:802–6.
21. Pelliccia A, Maron BJ, Di Paolo FM, Biffi A, Quattrini FM, Pisicchio C, et al. Prevalence and clinical significance of left atrial remodeling in competitive athletes. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:690–6.
22. Sharma S, Maron BJ, Whyte G, Firooz S, Elliott PM, McKenna WJ. Physiologic limits of left ventricular hypertrophy in elite junior athletes: relevance to differential diagnosis of athlete's heart and hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1431–36.
23. Maron BJ. Structural features of the athlete hearts defined by echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:190–203.
24. Popovic D, Ostojic MC, Petrovic M, Vujisic-Tesic B, Popovic B, Nedeljkovic I, et al. Assessment of the left ventricular chamber stiffness in athletes. *Echocardiography* 2011; 28(3): 276-87.
25. D'Ascenzi F, Pelliccia A, Corrado D, Cameli M, Curci V, Alvino F, et al. Right ventricular remodelling induced by exercise training in competitive athletes. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2016; 17(3): 301-7.
26. Popovic D, Damjanovic S, Markovic V, Vujisic-Tesic B, Petrovic M, Nedeljkovic I, et al. Systolic right ventricular adaptational changes in athletes as predictors of the maximal functional capacity: a pulsed tissue Doppler study. *J Sport Med Phys Fit* 2011; 51(3):452-61.
27. D'Andrea A, Severino S, Caso P, Liccardo B, Forni A, Fusco A, et al. Prognostic value of supine bicycle exercise stress echocardiography in patients with known or suspected coronary artery disease. *Eur J Echocardiogr* 2005;6:271–9.

28. Drezner J, Ackerman MJ, Anderson J, Ashley E, Asplund CA, Baggish AL, et al. Electrocardiographic interpretation in athletes: the ‘Seattle Criteria’. *Br J Sports Med* 2013;47:122-4.
29. Drezner J, Sharma S, Baggish A, Papadakis M, Wilson MG, Prutkin JM, et al. International criteria for electrocardiographic interpretation in athletes: Consensus statement. *Br J Sports Med*. 2017;51(9):704-31.
30. Rickers C, Wilke NM, Jerosch-Herold M. Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:855–61.
31. Moon JC, Fisher NG, McKenna WJ, Pennell DJ. Detection of apical hypertrophic cardiomyopathy by cardiovascular magnetic resonance in patients with nondiagnostic echocardiography. *Heart* 2004;90:645–9.
32. Scharf M, Brem MH, Wilhelm M, Schoepf UJ, Uder M, Lell MM. Cardiac magnetic resonance assessment of left and right ventricular morphologic and functional adaptations in professional soccer players. *Am Heart J* 2010;159:911–8.

# **Sportsko srce - savremeni dijagnostički pristup**

**Jelena Ćuk<sup>1</sup>, Stanimir Stojiljković<sup>2</sup>, Katarina Milutinović<sup>1</sup>,  
Dimitrije Cvetković<sup>3</sup>, Vesna Pešić<sup>1</sup>, Ross Arena<sup>4</sup>, Dejana Popović<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za fiziologiju, Vojvode Stepe  
450, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja, Univerzitet u Beogradu, Blagoja Parovića 156,  
Beograd, Srbija

<sup>3</sup>Klinika za kardiologiju, Klinički centar Srbije, Višegradska 26, Beograd, Srbija

<sup>4</sup>Department of Physical Therapy, College of Applied Health Science, University of  
Illinois at Chicago, 1919 West Taylor Street, Chicago, IL 60612, USA

**Adresa autora:** Jelena Ćuk, tel: +381691008192, E-mail: jelenacuk108@gmail.com

---

## **Kratak sadržaj**

Atletsko srce je fenomen remodelovanja srčanog mišića, koje je nastalo usled fizičke aktivnosti, a čiji stepen zavisi od intenziteta, trajanja, učestalosti treniranja, individualnih osobina i genetskih faktora. Aktuelne američke preporuke za skrining kardiovaskularnih abnormalnosti među sportistima srednjoškolcima i studentima svih nivoa utreniranosti, inicijalno su bile postavljene od strane Američkog udruženja kardiologa 2007. godine. Ove preporuke čini 12 tačaka i podrazumevaju podatke iz lične i porodične istorije bolesti, kao i fizičkog pregleda. S druge strane, evropske preporuke sugerisu na značaj neinvazivnih dijagnostičkih metoda, kao što je 12-kanalni EKG, čiji rezultati bi trebali biti razmatrani udruženo sa istorijom bolesti i fizičkim pregledom. Prema Evropskom udruženju za kardiovaskularni imidžing, standardna ehokardiografija je prva dijagnostička metoda diferencijacije sportskog srca od patološke hipertrofije leve komore. Godine 2012, Američko udruženje za sportsku medicine je definisalo kriterijume, koji su osveženi 2017. godine, za utvrđivanje abnormalnosti u elektrokardiogramu sportista i njihovu diferencijaciju od adaptivnih elektrofizoloških promena, koje ne zahtevaju dalju evaluaciju. S obzirom na to da iznenadna srčana smrt u sportu zahteva veliku pažnju, neophodno je da lekari budu edukovani da dijagnostikuju neprepoznata patološka stanja kod sportista. Praćenje aktuelnih preporuka koje se bave ovim problemom doprinosi prevenciji neželjenih događaja u sportu i kod osoba koje su iz drugih razloga izložene velikim fizičkim naporima.

**Ključne reči:** atletsko srce, skrining, hipertrofija leve komore

---