

Termodinamika micelizacije heksadeciltrimetilamonijum-bromida u binarnoj smeši propilenglikol-voda

Nataša Pejić*, Aleksandra Janošević, Jelica Rogić, Nikola Paunović

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne metode, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

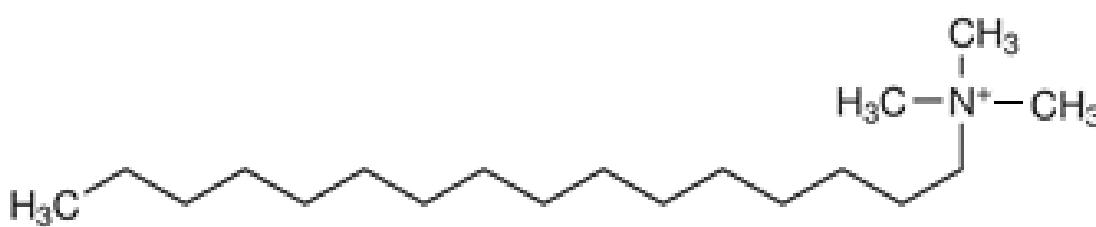
U radu je ispitana uticaj korastvarača (propilenglikola, PG) na micelizaciju katjonskog surfaktanta, heksadeciltrimetilamonijum-bromida (cetyltrimetilamonijum-bromida, CTAB) u vodenom rastvoru. Termodinamika micelizacije i agregaciono ponašanje CTAB u smeši PG-voda na različitim temperaturama (od 298,2 K do 310,2 K) ispitivani su konduktometrijski. Kritična micelarna koncentracija (KMK) i stepen ionizacije micle (α) CTAB u smeši PG-voda (20% (v/v)), na različitim temperaturama (298,2 K, 306,2 K i 310,2 K) odredeni su merenjem specifične provodljivosti. Primenom ravnotežnog modela za proces formiranja micela i iz temperaturne zavisnosti KMK, izračunati su termodinamički parametri (promena standardne molarne Gibsove slobodne energije, (ΔG_m^0), entalpije (ΔH_m^0) i entropije (ΔS_m^0)) micelizacije. Vrednost ΔG_m^0 je negativna na svakoj od ispitivanih temperatura; ove vrednosti se smanjuju po apsolutnoj vrednosti sa povećanjem temperature. Vrednosti ΔH_m^0 i ΔS_m^0 su negativne na svakoj od ispitivanih temperatura i drastično se povećavaju po apsolutnoj vrednosti sa povećanjem temperature u smeši PG-voda. Za proces micelizacije CTAB u smeši PG-voda (20% (v/v)), dobijen je tzv. entalpijsko-entropijski kompenzacioni efekat. Štaviše, na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka može se zaključiti da je proces micelizacije u ispitivanom sistemu suštinski sličan micelizaciji CTAB u vodi, i da prisustvo PG ima neznatan uticaj na interakcije između CTAB i vode.

Ključne reči: cetyltrimetilamonijum-bromid, propilenglikol, kritična micelarna koncentracija, termodinamika micelizacije, entalpijsko-entropijska kompenzacija

*Adresa za korespondenciju: nata@pharmacy.bg.ac.rs

Uvod

Surfaktanti ili površinski aktivne materije (PAM)¹ su hemijska jedinjenja specifične hemijske strukture; monomeri PAM se sastoje iz dva dela: polarnog² („glava” molekula ili hidrofilni deo) i nepolarnog³ („rep” molekula ili hidrofobni (lipofilni) deo) dela, tako da jedan od ova dva dela molekula uvek ima afinitet prema molekulima određenog rastvarača (polarnog ili nepolarnog)⁴. Udeo i priroda polarnih i nepolarnih grupa u molekulu može da varira u vrlo širokom opsegu i da utiče na različite osobine rastvora surfaktanta⁵. Na osnovu prirode hidrofilne grupe, surfaktanti se svrstavaju u tri osnovne grupe: jonski (anjonski i katjonski), amfoterni i nejonski [1,2]. U ovom radu je ispitana katjonski surfaktant heksadeciltrimetilamonijum-bromid (u daljem tekstu, cetiltrimetilamonijum-bromid (CTAB)) (Slika 1.) koji disosuje u vodi dajući pozitivno nanelektrisani jon surfaktanta i negativno nanelektrisani kontrajon (bromid). Ovaj surfaktant se uglavnom koristi kao antisептик, sredstvo za solubilizaciju lekovitih supstancija, kod elektroforeze proteina (za ekstrakciju DNA), u proizvodima za negu kose, itd.



Slika 1. Hemijska struktura cetiltrimetilamonijum-bromida

Figure 1. Chemical structure of cetyltrimethyl ammonium bromide

Zahvaljujući amfifilnim osobinama, monomeri PAM u različitim rastvaračima pokazuju manje ili više izraženu tendenciju da se spontano nagomilavaju na graničnim površinama faza, smanjujući površinski napon rastvora.

¹ Na angloameričkom govornom području za PAM se kaže da je "surface active agent" ili skraćeno "surfactant", na francuskom "agent de surface" i nemackom "waschaktive substanzen". Internacionali komitet za PAM je 1960. godine doneo odluku da se za PAM usvoji internacionalni naziv "tenzid".

² Polarna grupa molekula sadrži heteroatom (O, S, P ili N) određene funkcionalne grupe (alkoholne, tiol, etarske, estarske, sulfatne, sulfonatne, fosfatne, amino, amido, itd.).

³ Nepolarna grupa je dugački ugljovodonični lanac alkil ili alkilbenzenskog tipa.

⁴ Zbog toga se ova jedinjenja često nazivaju amfifili.

⁵ Mogu se koristiti kao detergenti, emulgatori, sredstva za kvašenje, za penjenje, itd.

Osim toga, molekuli PAM u vodenom rastvoru pri određenim uslovima pokazuju izrazitu težnju ka asociranju i obrazovanju agregata molekula koje se zovu micerle⁶.

Koncentracija monomera koja je neophodna za formiranje micerle naziva se kritična micelarna koncentracija (KMK). Da li će doći do formiranja micela, ili ne, i kolika je koncentracija monomera PAM potrebna za obrazovanje micela zavisi od delikatnog balansa sila koje pospešuju micelizaciju (hidrofobni efekat) i onih koje se suprotstavljaju micelizaciji (sterne i elektrostatičke interakcije).

U vodenoj sredini, molekuli PAM u micelama, orijentisani su tako da se polarni delovi nalaze u vodi, dok su nepolarni istisnuti u unutrašnjost micerle. Hidrofobni delovi molekula u unutrašnjosti micerle međusobno se povezuju hidrofobnim (disperznim) silama, odnosno „pakuju” na mala rastojanja sa ciljem minimiziranja kontakta sa molekulima vode; polarne grupe, usled elektrostatičkog odbijanja, kao i njihove solvatacije (hydratacije), nalaze se na određenom rastojanju koje zavisi od odnosa ova dva efekta.

Rastvarač ima ključnu ulogu u procesu micelizacije nekog surfaktanta [2]; ispitivanja površinskih i termodinamičkih osobina surfaktanata u prisustvu korastvarača (polarni organski rastvarač ili smeša rastvarača) pokazuju da se površinske i micelarne osobine surfaktanata modifikuju u prisustvu ovih korastvarača usled njihove specifične interakcije sa njihovim molekulima, kao i zbog promene prirode rastvarača [5,6]. Ispitivanja uticaja korastvarača na aggregaciju i fizičkohemijiske osobine surfaktanata imaju veliki značaj, kako u fundamentalnim, tako i u primjenjenim naučnim istraživanjima [7], s obzirom na značajne tehničke primene surfaktanata u nevodenim sredinama (npr. kao lubrikanata ili sredstava za čišćenje). Najčešće su ispitivani izrazito polarni organski rastvarači (formamid, etilenglikol i glicerol), jer su po osobinama najsličniji vodi (imaju veliku dielektričnu konstantu i kohezionu energiju, kao i izraženu tendenciju ka građenju vodoničnih veza). Najčešće primenjena metodologija ispitivanja procesa micelizacije različitih surfaktanata u smešama vode i organskih rastvarača [5–14], zasniva se na postepenoj zameni vode ispitivanim polarnim rastvaračem (korastvaračem), što omogućava jednostavnu karakterizaciju ispitivanog sistema (određivanje strukturalnih osobina agregata formiranih u ovim sredinama kao i utvrđivanje osobina koje treba da ima rastvarač da bi se formirali agregati monomera PAM). Sa druge strane, s obzirom na to da micelarne osobine surfaktanta zavise od temperature, iz termodinamičkih ispitivanja procesa micelizacije, dobija se veliki broj

⁶ Micerle su relativno male, sferne strukture u kojima je najčešće agregirano 20–100 molekula PAM, a disperzija ovih agregata u vodenom rastvoru naziva se micelarni rastvor [3,4]. Do aggregacije monomera PAM može doći i u nevodenoj sredini (različitim organskim rastvaračima). Micerle formirane u nevodenim sredinama nazivaju se obrnute, ili reverzne micerle [3,4].

informacija o jačini i prirodi rastvarač–surfaktant, kao i rastvarač–rastvarač interakcija. Takođe, na ovaj način ispituje se i tzv. solvofobni efekat [5,15] koji je suprotan od hidrofobnog efekta.

Micelarne osobine i termodinamički parametri micelizacije CTAB su ispitivane, kako u vodenoj sredini [12, 16–18], tako i u smešama vode i različitih organskih rastvarača, kao što su *N*-metilacetamid, *N*-metilpropionamid, dimetilsulfoksid, formamid, *N'*-formamid *N,N*'-dimetilformamid [5, 16], etanol [11] i etilenglikol [11].

Ispitivanje uticaja različitih glikola na agregacione i micelarne osobine surfaktanata je vrlo značajno, s obzirom na to da ovi organski rastvarači imaju vrlo široku primenu u različitim proizvodima (farmaceutskim, kozmetičkim i sredstvima za ličnu higijenu, hrani, itd.), pri čemu većina od njih sadrži i surfaktante. Efekat različitih glikola na termodinamiku i micelarne osobine tetradeciltrimetilamonijum-bromida ispitana je u radu [9]. Sa druge strane, do sada nije ispitana uticaj PG na proces micelizacija CTAB. U ovom radu ispitane su agregacione i micelarne osobine CTAB u binarnoj smeši PG i vode (20% (v/v)) na različitim temperaturama. Kritična micelarna koncentracija (KMK) i stepen jonizacije miclele (α) određeni su konduktometrijski, merenjem specifične provodljivosti. Primenom ravnotežnog modela za proces micelizacije i iz zavisnosti KMK od temperature (298,2 K, 306,2 K i 310,2 K) određeni su termodinamički parametri (ΔG_m^0 , ΔH_m^0 i ΔS_m^0) micelizacije. Pored ovoga, određeni su KMK, α , ΔG_m^0 , ΔH_m^0 i ΔS_m^0 micelizacije CTAB u vodi zbog poređenja rezultata i tumačenja procesa micelizacije CTAB u ispitivanoj binarnoj smeši. Na osnovu literaturnih podataka [12,16,18,19-22], vrednosti KMK CTAB u vodi na $T = 298,2\text{ K}$ dobijene različitim instrumentalnim metodama, nalaze se u granicama od $0,60\text{ mmol L}^{-1}$ do $1,15\text{ mmol L}^{-1}$. U ovom radu, dobijena vrednost KMK CTAB u vodi i na istoj temperaturi iznosi $0,89\text{ mmol L}^{-1}$ i nalazi se u opsegu nađenih vrednosti KMK; razlike u pojedinačnim vrednostima KMK uslovljene su razlikama u eksperimentalnim uslovima merenja, s obzirom na to da ovi uslovi (temperatura, prisustvo jakog elektrolita, osobine supstancije koja se koristi kod indirektnih metoda određivanja KMK, itd.) utiču na dobijene vrednosti KMK.

Eksperimentalni deo

Specifična provodljivost surfaktanta merena je digitalnim konduktometrom HI8820N (Hanna instruments, Portugal) sa tačnošću $\pm 0,5\%$ na tri različite temperature (298,2 K, 306,2 K i 310,2 K) koje su kontrolisane pomoću termostata (Series U8, MLW, Freital, Germany) sa tačnošću $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$.

Eksperimenti su izvođeni u staklenoj posudi sa dvostrukim zidom (Methrom EA 876-20) koja je zatvorena poklopcom sa otvorima kroz koje se, uvek na isto mesto, postavljaju termometar i konduktometrijska celija. Pre merenja specifične provodljivosti, rastvor CTAB određene koncentracije se termostatiraju (20 min) uz

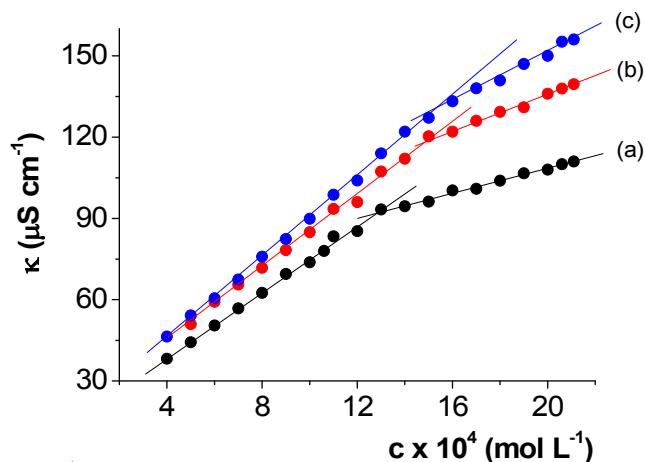
mešanje ($r = 300$ obr. min^{-1}). Za svaki od ispitivanih rastvora HTAB merenja specifične provodljivosti su ponovljena po tri puta.

Reagensi: Cetiltrimetilamonijum-bromid (Merk, Germany) i 1, 2 - propilenglikol (Carlo Erba, Italy), p.a. čistocene. Za pravljene rastvora CTAB u 20% (v/v) PG korišćena je dejonizovana voda specifične otpornosti, $\rho = 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA).

Rastvori CTAB su pravljeni na sledeći način: izmerenu masu CTAB kvantitativno preneti u laboratorijsku čašu u kojoj se nalazi 90 mL PG (20% (v/v)) i lagano mešati staklenim štapićem da ne bi došlo do formiranja pene. Nakon toga, rastvor CTAB preneti u odmerni sud od 100 mL i dopuniti do oznake propilenglikolom (20% (v/v)).

Rezultati i diskusija

Kritična micelarna koncentracija CTAB u smeši PG i vode (20 % (v/v)) pri datim eksperimentalnim uslovima, određena je konduktometrijski, merenjem specifične provodljivosti (κ) CTAB određene koncentracije (c) i konstruisanjem grafika $\kappa = f(c)$. Dobijena grafička zavisnost je kriva koja se sastoji iz dva segmenta (predmicelarnog i postmicelarnog). Zavisnost specifične provodljivosti od ukupne koncentracije CTAB koja pripada ovim segmentima je linearna; tačka u kojoj se dobijene prave seku, određuje KMK. Dobijene prave imaju nagibe S_1 (predmicelarna oblast) i S_2 (postmicelarna oblast); odnos nagiba pravih $\kappa = f(c)$ dobijenih u postmicelarnom (iznad KMK) i predmicelarnom (ispod KMK) segmentu, određuje stepen jonizacije miclele (α).



Slika 2. Zavisnost specifične provodljivosti (κ) od ukupne koncentracije CTAB (c) u smeši PG-voda (20 % (v/v)) na temperaturama: 298,2 K (a), 306,2 (b) i 310,2 (c).

Figure 2. Plots of specific conductivity (κ) versus total concentration of CTAB (c) in PG-water mixture (20 % (v/v)) at different temperatures: 298.2 K (a), 306.2 (b) i 310.2 (c).

Zavisnost specifične provodljivosti od koncentracije CTAB na temperaturama 298,2 K, 306,2 K i 310,2 K, prikazane su na Slici 2. Dobijene KMK, nagibi pravih u premicelarnom i postmicelarnom delu krive $\kappa = f(c)$, kao i stepen ionizacije (α), dati su u Tabeli I. Dobijene vrednosti KMK CTAB u vodi (Tabela I), kao i α su u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima [12,16,18]. Za ispitivani surfaktant u smeši PG–voda, na svakoj od ispitivanih temperatura, KMK i α su veće od vrednosti ovih veličina dobijenih u vodi. Fenomenološki, dobijeni rezultati se slažu sa onima koji su dobijeni ispitivanjem nekih surfaktanata u vodi i u smeši korastvarač–voda [6,11,14] i mogu se objasniti uticajem polarnosti rastvarača na proces micelizacije, odnosno uticajem dielektrične konstante rastvarača na hidrofobne i elektrostatičke interakcije od kojih micelizacija ključno zavisi. Kako PG na temperaturi 298,2 K ima dielektričnu konstantu, ϵ , 30,2 [23], a voda 78,5, dodatak ovog korastvarača u vodenim micelarnim rastvorovima dovodi do smanjenja dielektrične konstante u balk fazi ispitivanog micelarnog rastvora. Smanjenje dielektrične konstante (odnosno polarnosti) dovodi do povećanja elektrostatičkih sila odbijanja između polarnih grupa CTAB na površini miclele i smanjenja hidrofobnih interakcija ugljovodoničnih lanaca u unutrašnjosti miclele. Zbog ovoga, KMK CTAB u smeši PG–voda je veća od KMK CTAB u vodi.

Za CTAB u smeši PG–voda sa povećanjem temperature, KMK i α se povećavaju (Tabela I). Generalno, efekat temperature na KMK može se objasniti uticajem temperature na stepen hidratacije hidrofilnih grupa, koji sa povećanjem temperature opada, što pospešuje micelizaciju; drugi, suprotni efekat (koji se suprotstavlja micelizaciji) je razrušavanje strukture vode oko hidrofobnih grupa surfaktanta, koji se javlja na višim temperaturama. Na osnovu dobijenih rezultata (Tabela I) može se zaključiti da je u ispitivanom temperaturnom opsegu, drugi efekat dominantniji.

Tabela I Kritična micelarna koncentracija (KMK), nagibi pravih u premicelarnom (S_1) i postmicelarnom (S_2) segmentu i stepen jonizacije (α) micela CTAB u vodi i smeši propilenglikol–voda (20% (v/v)) na različitim temperaturama

Table I Critical micellar concentrations (CMC), slopes of lines in both premicellar (S_1) and posmicellar (S_2) region and micellar ionization degrees CTAB in water as well as in mixture propylen glycol–water (20% (v/v)) at different temperatures

Propilenglikol (% (v/v))	T (K)	KMK (mmol L ⁻¹)	S_1^a ($\mu\text{S dm}^2 \text{mol}^{-1}$)	S_2^b ($\mu\text{S dm}^2 \text{mol}^{-1}$)	α
0	298,2	0,89	1008,1	368,6	0,34
	306,2	0,97	1180,0	330,0	0,39
	310,2	1,00	117,3	490,0	0,41
20	298,2	1,28	60,7	24,0	0,40
	306,2	1,48	68,8	35,0	0,51
	310,2	1,54	74,1	44,2	0,60

Termodinamika micelizacije

Primenom ravnotežnog modela za proces micelizacije [24] i na osnovu dobijene zavisnosti KMK od temperature, izračunati su termodinamički parametri micelizacije CTAB u smeši PG–voda.

Promena standardne Gibbsove energije za proces formiranja miclele po molu surfaktanta, ΔG_m^0 , data je izrazom [25]⁷:

$$\Delta G_m^0 = (2 - \alpha) RT \ln X_{KMK} \quad (1)$$

gde je: α – stepen jonizacije miclele, R – univerzalna gasna konstanta, T – apsolutna temperatura i X_{KMK} – kritična micelarna koncentracija izražena u molskom udelu⁸.

Iz Gibbs-Helmholcove jednačine⁹ i diferenciranjem izraza (1) po temperaturi, dobija se izraz za izračunavanje promene standardne entalpije micelizacije:

$$\Delta H_m^0 = -R T^2 [(2 - \alpha) (\frac{\partial \ln X_{KMK}}{\partial T})_p - \ln X_{KMK} (\frac{\partial \alpha}{\partial T})_p] \quad (2)$$

Promena standardne entalpije micelizacije može se izračunati iz izraza (2) ukoliko se konstruišu grafici zavisnosti $\ln X_{KMK} = f(T)$ (slika 3.), kao i $\alpha = f(T)$ (Slika 4.) i nađu

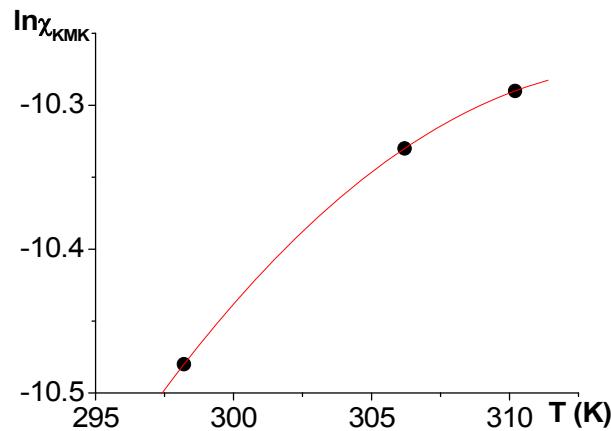
nagibi dobijenih zavisnosti, $(\frac{\partial \ln X_{KMK}}{\partial T})_p$ i $(\frac{\partial \alpha}{\partial T})_p$, na svakoj od ispitivanih temperatura.

Dobijene zavisnosti, $\ln X_{KMK} = f(T)$ i $\alpha = f(T)$ su polinomijalne (Slike 3. i 4.), tj. dobijene jednačine su polinomi drugog stepena, sa korelacionim koeficijentom, $r^2 = 1$ u oba slučaja.

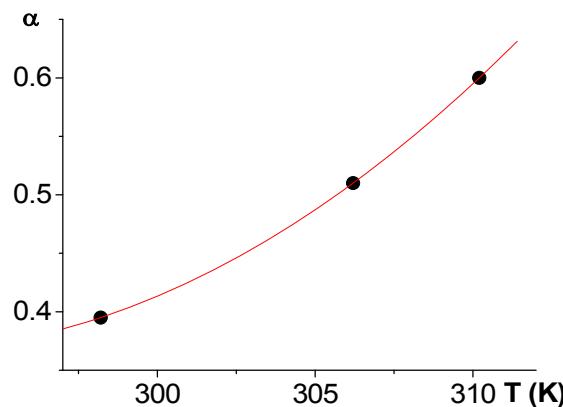
⁷ Izraz (1) se može primeniti kada je agregacioni broj veliki ($n \geq 50$); u drugim slučajevima se ovaj izraz može primeniti kao aproksimativni.

⁸ Kada je $KMK \leq 10^{-2}$ mol L⁻¹, $X_{KMK} = \frac{KMK}{\omega}$, gde je ω – broj molova vode po litru, na datojo temperaturi i iznosi 55,4 (na $T = 298,2$ K).

⁹ Gibbs-Helmholcova jednačina: $(\frac{\partial(\Delta G^0 / T)}{\partial T})_p = \frac{\Delta H^0}{T^2}$



Slika 3. Zavisnost $\ln X_{KMK}$ CTAB u smeši PG–voda od temperature
 Figure 3. Plot of $\ln X_{KMK}$ CTAB in mixture PG–water *versus* temperature



Slika 4. Zavisnost stepena jonizacije, α od temperature
 Figure 4. Plot of degree of ionization, α *versus* temperature

Promena standardne entropije micelizacije, ΔS_m^0 , izračunava se iz izraza:

$$\Delta S_m^0 = \frac{\Delta H_m^0 - \Delta G_m^0}{T} \quad (3)$$

Uticaj ispitivanog korastvarača na proces micelizacije CTAB može se analizirati i preko tzv. slobodne energije transfera, ΔG_T^0 koja je data izrazom [24]:

$$\Delta G_T^0 = (\Delta G_m^0)_{PG-H_2O} - (\Delta G_m^0)_{H_2O} \quad (4)$$

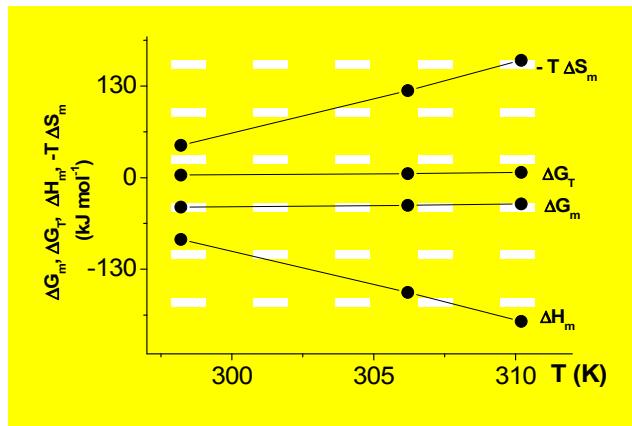
gde su $(\Delta G_m^0)_{PG-H_2O}$ i $(\Delta G_m^0)_{H_2O}$ promene standardne Gibsove energije micelizacije CTAB u smeši PG–voda i CTAB u vodi.

Termodinamički parametri micelizacije CTAB u vodi i u smeši PG–voda, ΔG_m^0 , ΔH_m^0 , ΔS_m^0 i ΔG_T^0 na različitim temperaturama (298,2 K, 306,2 K i 310,2 K), dobijenih iz izraza (1)–(4), dati su u Tabeli II. Zavisnost ovih termodinamičkih parametara od temperature prikazana je na Slici 5.

Tabela II Termodinamički parametri micelizacije CTAB u vodi i smeši propilenglikol–voda (20% (v/v)) na različitim temperaturama

Table II Thermodynamic parameters of micellization of CTAB in water and mixture propylene glycol–water (20% (v/v)) at different temperatures

Rastvarač	298,2 K	306,2 K	310,2 K
$\Delta G_m^0 \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$			
voda	– 45,4	– 44,96	– 44,78
20% (v/v) PG	– 41,70	– 39,21	– 37,26
$\Delta H_m^0 \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$			
voda	– 7,46	– 13,80	– 17,25
20% (v/v) PG	– 87,61	– 162,81	– 204,02
$\Delta S_m^0 \text{ (kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}\text{)}$			
voda	0,13	0,10	0,09
20% (v/v) PG	– 0,15	– 0,40	– 0,54
$T\Delta S_m^0 \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$			
Voda	37,94	31,16	27,50
20% (v/v) PG	– 45,93	– 123,60	– 166,71
$\Delta G_T^0 \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$			
20% (v/v) PG	3,70	5,75	7,52

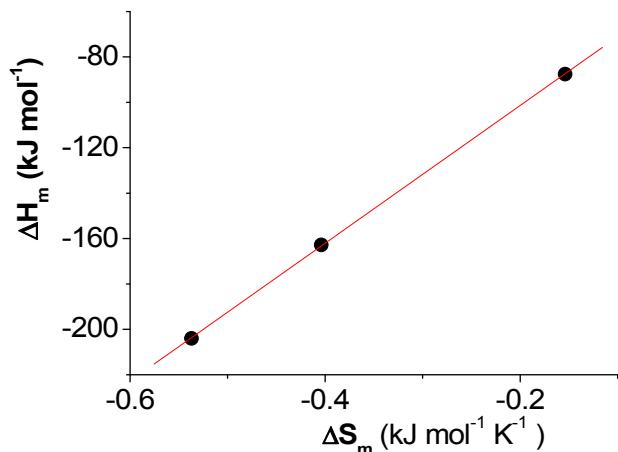


Slika 5. Zavisnost termodinamičkih parametara micelizacije (ΔG_m^0 , ΔH_m^0 , $-T\Delta S_m^0$ i ΔG_T^0) od temperature

Figure 5. Dependence of thermodynamic parameters of micellization (ΔG_m^0 , ΔH_m^0 , $-T\Delta S_m^0$ and ΔG_T^0) on temperature

Vrednosti ΔG_m^0 CTAB su negativne na svakoj od ispitivanih temperatura (proces micelizacije je spontan) i sa porastom temperature se smanjuju po absolutnoj vrednosti (Tabela II). Vrednosti ΔH_m^0 i ΔS_m^0 su negativne na svakoj od ispitivanih temperatura (proces micelizacije je egzoterman) i izrazito zavise od temperature (Tabela II). Kako ΔH_m^0 i ΔS_m^0 imaju isti znak, spontanost procesa micelizacije, odnosno vrednosti ΔG_m^0 , zavise od relativnog odnosa entalpijskog i entropijskog člana (Gibbs-Helmholcova jednačina). Na datoј temperaturi, udeo entropijskog člana u entalpijskom ($\frac{\Delta H_m^0}{T\Delta S_m^0}$) iznosi: 1,9 (298,2 K), 1,3 (306,2 K) i 1,2 (310,2 K). Na svakoj od ispitivanih temperatura, entalpijski doprinos je veći od entropijskog, ali se on smanjuje sa povećanjem temperature, tako da je micelizacija CTAB u smeši PG–voda termodinamički najpovoljnija na nižim temperaturama.

U procesu micelizacije različitih surfaktanata, dobija se tzv. entalpijsko-entropijska kompenzacija [26]; ovaj efekat se manifestuje kao linearna zavisnost ΔH_m^0 od ΔS_m^0 . Dobijeni kompenzacioni grafik je prikazan na Slici 6; kompenzaciona prava ima jednačinu, $\Delta H_m^0 = -40,68 + 303,5 \times \Delta S_m^0$ ($r^2 = 0,9999$). S obzirom na to da je nagib dobijene prave (303,5 K) skoro identičan nagibu (294,7 K) koji je dobijen za proces micelizacije HTAB u vodi, može se zaključiti da PG ima neznatan uticaj na interakcije CTAB i vode, tj. da je proces micelizacije CTAB u smeši PG–voda suštinski sličan micelizaciji CTAB u vodi, iako je prisutan PG. Slično ponašanje je dobijeno za tetradeciltrimetilamonijum-bromid u smeši etilenglikol–voda (20 mas%) [11].



Slika 6. Entalpijsko-entropijski kompenzacioni grafik
Figure 6. Enthalpy-entropy compensation plot

Efekat korastvarača na proces micelizacije se može analizirati i preko tzv. slobodne energije transfera, ΔG_T^0 . Dobijene vrednosti ΔG_T^0 , su pozitivne na svakoj od ispitivanih temperatura i sa povećanjem temperature ove vrednosti se povećavaju (Tabela II). Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da u prisustvu korastvarača (PG) dolazi do povećanja interakcija između hidrofobnih delova (ugljovodoničnih lanaca) surfaktata i PG, tj. do povećanja rastvorljivosti CTAB u smeši PG-voda. Takođe, u prisustvu PG, dolazi do povećanja interakcije između polarnih delova CTAB i vode. Kao rezultat svega ovoga, dolazi do smanjenja hidrofobnih interakcija tj. smanjenja disperznih sila između ugljovodoničnih lanaca CTAB u unutrašnjosti micele što dovodi do povećanja KMK (Tabela I). Slično ponašanje je dobijeno za tetradeciltrimetilamonijum-bromid u smešama etanolvoda i etilenglikolvoda [11].

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Vrednosti KMK CTAB u smeši korastvarač (PG) i voda (20% (v/v)) i α , su veće od ovih vrednosti dobijenih u sistemu CTAB i voda, što znači da je agregacioni proces CTAB u smeši PG–voda manje favorizovan u odnosu na ovaj proces u čistoj vodi.
- Proces micelizacija CTAB u smeši PG–voda je spontan ($\Delta G_m^0 < 0$) i egzoterman ($\Delta H_m^0 < 0$), na svakoj od ispitivanih temperatura.
- Vrednosti KMK CTAB u smeši PG–voda i α , povećavaju se sa porastom temperature. U čistoj vodi, na proces micelizacije dominantno utiče entropijski

član u Gibbs-Helmholcovoj jednačini. U smeši PG-voda, proces micelizacije zavisi od oba člana (entropijskog i entalpijskog), čiji udeli zavise od temperature.

- d) Micelizacija CTAB u smeši PG-voda termodinamički je povoljnija na nižim temperaturama.
- e) Proces micelizacije CTAB u smeši PG-voda, suštinski je sličan micelizaciji CTAB u vodi, a prisustvo PG ima neznatan uticaj na interakcije između CTAB i vode.
- f) Prisustvo PG dovodi do povećanja interakcija između hidrofobnih delova CTAB i PG, tj. do povećanja rastvorljivosti CTAB u smeši PG i vode, kao i povećanja interakcije između polarnih delova CTAB i vode. Zbog svega ovoga dolazi do smanjenja hidrofobnih interakcija, što ima za posledicu povećanje KMK CTAB u smeši PG-voda.

Zahvalnica

Autori su zahvalni Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije (projekat br. 172015) na finansijskoj podršci.

Literatura

1. Đaković Lj. Koloidna hemija. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 2006.
2. Rosen MJ. Surfactants and interfacial phenomena, 3th ed. New York: J. Wiley & Sons, 2004.
3. Joshi JV, Aswal VK, Goyal PS, Bahadur P. Role of counterion of the surfactant molecule on the micellar structure in aqueous solution. *Curr Sci* 2002; 83: 47–52.
4. Moulik SP. Micelles: self-organized surfactant assemblies. *Curr Sci* 1996; 71: 368–76.
5. Palepu R, Gharibi H, Bloor DM, Wyn-Jones E. Electrochemical studies associated with the micellization of cationic surfactants in aqueous mixtures of ethylene glycol and glycerol. *Langmuir* 1993; 9: 110–2.
6. Rodríguez A, Graciani MM, Moyá ML. Effects of addition of polar organic solvents on micellization. *Langmuir* 2008; 24: 12785–92.
7. Lee YS, Woo KW. Micellization of aqueous cationic surfactant solutions at the micellar structure transition concentration-based upon the concept of the pseudophase separation. *J. Colloid Interface Sci* 1995; 169: 34–8.
8. Rodríguez A, Graciani MM, Moyá ML. Effects of organic solvent addition on the aggregation and micellar growth of cationic dimeric surfactant 12-3-12,2Br⁻. *Langmuir* 2007; 23: 11496–505.
9. Rodríguez A, Graciani MM, Fernández G, Moyá ML. Effects of glycols on the thermodynamic and micellar properties of TTAB in water. *J Colloid Interf Sci* 2009; 338: 207–15.

10. Kolay S, Ghosh KK, Mac Donald A, Palepu RM. Micellization behavior of alkyltriphenylphosphonium bromides in ethylene glycol, diethylene glycol / water mixture. Themodynamic and kinetic investigation. *J Solution Chem* 2008; 37: 59–63.
11. Ruiz CC. Thermodynamic of micellization of tetradecyltrimethylammonium bromide in ethylene-water binary mixture. *Colloid Polym Sci* 1999; 277: 701–7.
12. Akbaş H, Kartal Ç. Conductometric studies of hexadecyltrimethylammonium bromide in aqueous solutions of ethanol and ethylen glycol. *Colloid J* 2006; 68: 125–30.
13. Bakshi MS, Kaur G. Effects of glycol additives on the mixed micelle formation by hexadecyltrimethylammonium bromide + dodecylpyridinium chloride mixtures. *J Mol Liq* 2000; 88: 15–32.
14. Shrivastava A, Ghosh KK. Micellization of cetyl triphenyl phosphonium bromide surfactant in binary aqueous solvents. *J Surfact Deterg* 2008; 11: 287–92.
15. Moyá ML, Rodríguez A, Graciani MM, Fernández G. Role of the solvophobic effect on micellization. *J Colloid Interface Sci* 2007; 316: 787–95.
16. Singh HN, Saleem SM, Singh RP. Micelle formation of ionic surfactants in polar nonaqueous solvents. *J Phys Chem* 1980; 84: 2191–4.
17. Paredes S, Tribout M, Sepulveda L. Enthalpies of micellization of quaternary tetradecyl- and cetyltrimethylammonium. *J Phys Chem* 1984; 88: 1871–5.
18. Jiang N, Li P, Wang Y, Wang J, Yan H, Thomas R. Aggregation behavior of hexadecyltrimethylammonium surfactants with various counterions in aqueous solution. *J Coll Interface Sci* 2005; 286: 755–60.
19. Mandal AB, Nair BU. Cyclic voltammetric technique for the determination of the critical micelle concentration of surfactants, self-diffusion coefficient of micelles, and partition coefficient of an electrochemical probe. *J Phys Chem* 1991; 95: 9008–13.
20. Gerakis AM, Koupparis MA. Physicochemical studies of the cetyltrimethyl-ammonium bromide micellar system using a bromide selective electrode. *Talanta* 1994; 41: 765–73.
21. Aguiar J, Carpeta P, Molina-Bolívar JA, Carnero Ruiz C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J Colloid Interface Sci* 2003; 258: 116–22.
22. Cifuentes A, Bernal JL, Diez-Masa JC. Determination of critical micelle concentration values using capillary electrophoresis instrumentation. *Anal Chem* 1997; 69: 4271–4.
23. Sengwa RJ. A comparative dielectric study of ethylene glycol and propylene glycol at different temperatures. *J. Mol. Liq.* 2003; 108: 47–60.
24. Atwood D, Florence AT. Surfactants Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology, New York: Chapman and Hall, 1983.
25. Evans DF, Wenneström H. The colloidal domain: where physics, chemistry and biology meets, New York: VCH, 1994.
26. Sugihara G, Hisatomi M. Enthalpy-entropy compensation phenomenon observed for different surfactants in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* 1999; 219: 31–6.

Thermodynamics of micellization of hexadecyltrimethylammonium bromide in propylen glycol-water binary mixture

Nataša Pejić, Aleksandra Janošević, Jelica Rogić, Nikola Paunović

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Sumary

The effect of cosolvent (propylen glycol, PG) on micellization of an cationic surfactant, hexadecyltrimethylammonium bromide (hereinafter cetylecyltrimethylammonium bromide, CTAB) in aqueous solution was studied. The thermodynamic of micellization and the aggregation behaviour of CTAB in PG–water mixture at different temperatures (from 298.2 K to 310.2 K) have been studied conductometrically. The conductivity data were used to determine the critical micellar concentration (CMC) and degree of micellar ionization (α) of CTAB in PG–water (20% v/v) binary mixtures at different temperatures (298.2 K, 306.2 K and 310.2 K). The equilibrium model of micelle formation was applied to obtain the thermodynamics parameters (the standard molar Gibbs free energy (ΔG_m^0), enthalpy (ΔH_m^0) and entropy (ΔS_m^0)) of micellization. Those parameters were determined using temperature dependance of CMC. Value of ΔG_m^0 was found to be negative at all temperatures and becomes less negative as the temperature increases. Values of ΔH_m^0 and ΔS_m^0 were found to be negative in all cases, and increase dramatically with temperature in 20 % (v/v) PG. An enthalpy-entropy compensation effect was observed. Moreover, based on experimental data, it can be concluded that the micellization process in the examined system is substantially similar to the CTAB micellization in water, and the presence of PG has a negligible effect on the CTAB–water interactions.

Key words: cetyltrimethyl ammonium bromide, propylen glycol, critical micellar concentration, thermodynamic of micellization, enthalpy-entropy compensation

Oksidativni i nitrozativni stres - medijatori neurotoksičnosti dikvata

Mirjana Đukić¹, Milica Ninković², Ivana Stevanović²,
Marijana Ćurčić¹, Katarina Ilić³, Dragan Đurđević²,
Dragana Vučanović¹

¹ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

² Institut za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija

³ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Adresa autora za korespondenciju: Dr sc. Mirjana Đukić, profesor
Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Farmaceutski fakultet
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija
e-mail: mirjana.djukic@pharmacy.bg.ac.rs
Telefon (kancelarija): +381 11 3951 308; Faks: +381 11 3972840
URL: <http://www.pharmacy.bg.ac.rs/fakultet/ljudi/nastavnik/64>

Kratak sadržaj

Najčešće zapaženi efekti sistemskog trovanja herbicidom dikvatom (DK) na centralni nervni sistem (CNS) su opšta depresija i letargija. Opšte je prihvaćeno da se toksičnost DK ostvaruje posredstvom povećanog stvaranja superoksid anjon radikala (O_2^{\bullet}) tokom njegovog red-oks metabolizma, u prisustvu molekularnog kiseonika, koji dalje inicira lančanu reakciju radikalinskog tipa i razvoj oksidativnog stresa (OS). Do danas mehanizmi neurotoksičnog efekta DK nisu u potpunosti poznati.

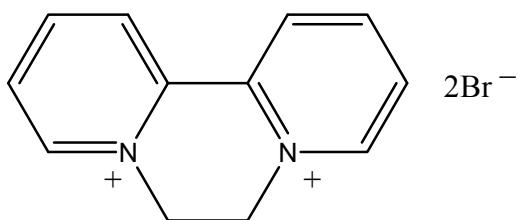
Cilj ove studije je bio da ispitamo da li OS posreduje u neurotoksičnosti indukovanoj DK. Eksperiment je sproveden na mužjacima Wistar pacova, intrastrijatalno tretiranih (*i.s.*) DK. Parametri oksidativnog statusa, kao što su: superoksid anjon radikal (O_2^{\bullet}), nitrati (NO_3^-), kao finalni metaboliti reaktivnih vrsta azota; malondialdehid (MDA), indikator lipidne peroksidacije; aktivnost enzima; superoksid dizmutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx); i glutation (GSH) mereni su u hipokampusu, 30 minuta, 24 sati i 7 dana posle tretmana.

Stopa smrtnosti od 30 do 40 % ustanovljena je u grupi pacova tretiranih DK, tokom 2-3 sata od buđenja iz anestezije. Dodatno, pacovi ove grupe su pokazali neurološke simptome letargije. Značajno povećana lipidna peroksidacija pokazuju da OS posreduje u neurotoksičnom odgovoru indukovanim *i.s.* primenom DK.

Ključne reči: dikvat, neurotoksičnost, oksidativni stres, hipokampus

Skraćenice: DK, dikvat; i.s., intrastrijatalno; i.p., intraperitonealno; LPO, lipidna peroksidacija; O₂, molekularni kiseonik; MDA, malondialdehid; NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; NO_x azotni oksidi; NO₃⁻, nitrati; NS, nitrozativni stres; O₂^{•-}, superoksidni anjon radikal; OS, oksidativni stres; PK, parakvat; SOD, superoksidna dizmutaza; RAV, reaktivne azotove vrste; RKV, reaktivne kiseonične vrste.

Uvod



Dikvat (DK) (1,1'-etilen-2,2'-dipiridin) spada u grupu kontaktnih herbicida sa neselektivnim, ali brzim delovanjem (desikanat i regulator rasta biljaka) (1). Sa ekološkog aspekta, DK se smatra pogodnim herbicidom zbog brze bio- i foto-degradacije (2, 3). Maksimalna dozvoljena koncentracija (MDK) u vazduhu za DK iznosi 0,5 mg/m³, što odgovara dozi od 0,07 mg/kg dnevnog unosa. Oralna smrtna doza za 50 % eksperimentalnih životinja (LD₅₀) za DQ iznosi: 120 mg/kg za pacove, 233 mg/kg za miševe, 188 mg/kg za zečeve, 187 mg/kg za zamorce i pse. Dikvat može da se unese u organizam oralnim putem, inhalacijom i preko kože. Trovanja su najčešće samoubilačka, a mogu biti i profesionalna ili slučajna (1, 5, 6). Kod sistemskog trovanja DK dolazi do oštećenja gastrointestinalnog trakta, bubrega i jetre, a ključni poremećaj predstavlja poremećen metabolizam vode i stanje dehidratacije; pri većim dozama DK, opisani su i neurološki poremećaji kao što su tremor i konvulzije. Patofiziološki mehanizam promena u centralnom nervnom sistemu (CNS) nije razjašnjen, mada se zna da DK prolazi krvno-moždanu barijeru (7).

Dikvat podleže redukciji u mitohondrijskoj i mikrozomskoj frakciji ćelija jetre, pluća i bubrega. U jetri se DK metaboliše do netoksičnog metabolita dikvat-monopiridona (6',7',-dihidro-4-okso-[1,2-a':2',1'-c] pirazinijum jon) (8). Postoji više potvrda da je sistemska toksičnost DK posredovana povećanim stvaranjem slobodnih radikala (9, 10). Poznato je da se tokom oksidativnog stresa (OS) troše reduktivne ćelijske rezerve nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NAD(P)H) i glutation (GSH), tako je u proksimalnim tubulima bubrega pokazano da DK smanjuje odnos

NAD(P)H/NAD(P)⁺. Dodatno, DK utiče na povećano oslobođanje gvožđa iz feritina, što doprinosi stvaranju hidroksilnih radikala (HO^{\bullet}), posredstvom Fentonove reakcije (11). Dikvat je u prometu u formi di-katjona (DK^{2+}). Pod dejstvom citochroma P450 reduktaze DK^{2+} se redukuje do bipiridil monokatjon radikala ($\text{DK}^{\bullet+}$), koji se dalje, u reakciji sa O_2 oksidiše nazad do DK^{2+} , a O_2 redukuje do superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (12). U poređenju sa parakvatom (PK) (široko primjenjen herbicid, dipiridinski analog DK), DK je snažniji oksidans, bazirano na njihovim redoks potencijalima ($\text{EO}' = -349 \text{ mV}$ za DK i $\text{EO}' = -446 \text{ mV}$ za PK) (13). Studije Fussella i saradnika (2011) na rekombinantnoj humanoj NADPH-citochrom P450 reduktazi su pokazale da je DK 10-40 puta efikasniji u stvaranju ROS od PK i da je oko 10 puta potentniji u stvaranju H_2O_2 (koristeći mikrozome jetre pacova) (12). Povećano stvaranje $\text{O}_2^{\bullet-}$, kroz redoks metabolizam DK, pokreće lanac lančanih reakcija. Posredstvom superoksid dizmutaze (SOD), $\text{O}_2^{\bullet-}$ se spontano i brzo prevodi u H_2O_2 i O_2 , ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pri pH 7,0). Poznato je da je H_2O_2 jedan od izvora HO^{\bullet} , najsnažnijeg pokretača oksidativnih oštećenja svih klase biomolekula, uključujući lipide tj. inicira lipidnu peroksidaciju (LPO) ćelijskih membrana i nastanak citotoksičnih efekata (14). Masivan utrošak O_2 tokom intezivnog redoks metabolizma DK, prouzrokuje anoksiju tkiva, koja u CNS rezultira letargijom (15).

Moždano tkivo je posebno podložno oksidativnim oštećenjima (16, 17). Brojne eksperimentalne studije pokazale su da su pojedini delovi mozga osjetljiviji u odnosu na druge moždane strukture na različite faktore oštećenja (otrovi, ishemija, starenje, neurodegenerativni procesi CNS). U ove strukture spadaju i piramidni neuroni CA₁ i CA₃ sektora hipokampus. Uzimajući u obzir prethodno navedene činjenice, a u cilju razjašnjenja patofiziološkog mehanizma neurotoksičnosti DK, opredelili smo se da parametre oksidativnog stresa merimo u hipokampusu, selektivno osjetljivoj strukturi na OS.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi: a) da li je povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) i reaktivnih azotovih vrsta (RAV) u hipokampusu nakon *i.s.* aplikacije DK; b) da li se razvija OS i/ili nitrozativni stres (NS) u obimu koji ishoduje oksidativnim oštećenjem lipida; i c) da li je glutationski ciklus uključen u odgovor selektivno osjetljivih struktura na neurotoksični efekat DK.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

Eksperimentalne životinje su tretirane u skladu sa vodičem za eksperimentalne studije, No. 282-12/2002 (Etički komitet Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija). Eksperimenti su izvođeni na odraslim mužjacima Wistar pacova težine oko 220 g. Pacovi su bili podeljeni u tri grupe (dve kontrolne i jedna eksperimentalna), smešteni u

kavezima pod standardizovanim uslovima (temperatura: 23 ± 2 °C, relativna vlažnost: 55 ± 3 % i ciklus svetlo/tamno: 13/11 sati) i imali su slobodan pristup hrani i vodi. Svi eksperimenti su rađeni posle adaptacije životinja na laboratorijske uslove od 7 dana i u periodu od 9h ujutru do 13h popodne.

Eksperimentalni dizajn

Pacovi su anestezirani pentobarbital natrijumom [45 mg/kg telesne mase (TM)] intraperitonealno (*i.p.*). Testirane supstance su aplikovane u pojedinačnoj jednokratnoj dozi, intrastrijatalno (*i.s.*) u finalnoj koncentraciji od 10 µL, da se nervno tkivo ne bi opteretilo volumenom. Supstance su aplikovane u zapremini od 10 µL *i.s.* preko Hamiltonovog šprica, pomoću stereotaksičnog instrumenta, a prema odgovarajućim koordinatama za male laboratorijske životinje (koordinate: 8,4 mm iza bregme, 2,6 mm levo od srednje linije suture i 4,8 mm ventralno od dure) (18).

Životinje su podeljene u tri eksperimentalne grupe: dve kontrolne grupe: intaktna grupa (netretirani pacovi), n=8 i lažno-operisani pacovi (0.9% NaCl), n=8; i jedna eksperimentalna DK grupa (2.5 µg DK /10 µL), n=24. Radi praćenja efekta neurotoksicitosti DQ na parametre OS/NS u hipokampusu, eksperimentalne životinje su dekavitovane, 30 minuta, 24 h i 7 dana od tretmana, (n=8 / terminu). Biohemski parametri OS mereni su ipsi- i kontra-lateralnom hipokampusu.

Reagensi

Korišćene hemikalije su analitičke čistoće: Diquat - Reglone® (200 g/L) (Zeneca - Agrochemicals); Pentobarbital natrijum - Vетанаркол® (0,162 g/mL) (Werfft - Chemie, Vienna, Austria); glutation reduktaza (EC 1.6.4.2), Tip III, iz kvasca [9001-48-3], Sigma Chemical Co (St Luis, MO, USA) – visoko rafinisana suspenzija u 3.6M (NH₄)₂SO₄, na pH 7,0; 2500 U/1,6 mL (9,2 mg prot/mL) 170 U/mg proteina (1 jedinica redukuje 1µmol GSSG/min, pH 7,6 na 25 °C); fiziološki rastvor (0,9 % NaCl) (Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija); glutation, glutation disulfid i NADPH (Boehringer Corp. - London, UK); NaNO₃ (Mallinckrodt Chemical Works - St. Louis, MO, USA); etilendiamintetra sirćetna kiselina – EDTA (Sigma - Sr. Louis, USA); natrijum fosfat - Na₂HPO₄, kalijum dihidrogen fosfat - KH₂PO₄, trihlorsirćetna kiselina, tiobarbiturna kiselina – TBA (Merck - Darmstadt, Germany); natrijum tetraborat i borna kiselina (Zorka - Šabac, Srbija); karbonatni pufer (50 mM, pH 10.2), (Serva, Feinbiochemica - Heidelberg, New York); NaNO₃, Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, USA); natrijum glukonat, Merck (Darmstadt, Germany); glicerol, Merck (Darmstadt, Germany); metanol, HPLC čistoće, Merck (Darmstadt, Germany); acetonitril, HPLC čistoće, Merck (Darmstadt, Nemačka); standardni puferi pH 7,0 i pH 10,0, HI 7710P (Vila do Conde, Portugal). Dejonizovana voda je pravljena preko Millipor mili-Q sistema za prečišćavanje vode (Waters - Millipore, Milford, MA, USA).

Priprema tkiva i merenja

Homogenat selektivno osetljive moždane strukture hipokampa pripreman je kao što je opisano ranije (19). Izolovan je ipsi i kontralateralni hipokampus i sve vreme procedure držan je na ledu. Izolovana moždana struktura je prebačena u saharozni medijum (0,25 mol/L saharoza, 0,1 mmol/L EDTA u natrijum-kalijum fosfatnom puferu, pH 7) i homogenizovana u staklenom homogenizeru s teflonskim tučkom na 800 obrtaja/min (Tehnica Zelezniki Manufacturing, Slovenia). Nakon dva uzastopna centrifugiranja na 1000 g, u trajanju od 15 min na 4 °C, odvojen je supernatant, a grubi talog je resuspendovan u 1 mL dejonizovane vode. Solubilizacija subcelularnih membrana u hipotoničnom rastvoru postignuta je Pasterovom pipetom konstantnim mešanjem od 1h. Zatim su homogenati centrifugirani na 2000 x g, 15 min na 4 °C, a dobijeni supernatant je korišćen za analizu. Ukupna koncentracije proteina je merena metodom po Lowriju (20).

Analitika parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa

Parametri OS/NS (superoksid anjon radikal, nitrati, superoksid dizmutaza, malondialdehid, ukupni glutation i glutation peroksidaza) mereni su obostrano u hipokampusu posle 30 min, 24h i 7 dana nakon tretmana.

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) - Sadržaj $O_2^{\bullet-}$ je određivan metodom koja se bazira na redukciji nitroblutetrazolijuma (NBT) u monoformazan, posredstvom $O_2^{\bullet-}$. Žuta boja redukovanih produkta merena je spektrofotometrijski na 550 nm (21). Rezultati se izražavaju kao μmol redukovanog NBT/mg proteina.

Nitrati (NO_3^-) - Tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa UV-diode array (HPLC-DA) detekcijom korišćena je za merenje sadržaja nitrata u homogenizatu hipokampa. Merenje je vršeno na sobnoj temperaturi. Mobilna faza sadrži boratni pufer/glukonat koncentrat: metanol: acetonitril: dejonizovana voda (2:12:12:74, V/V/V/V), pH = 8,5. Boratni pufer/glukonat koncentrat se sastoji od 0,07 mol/L natrijum glukonata, 0,3 mol/L H_3BO_3 , 0,1 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 3,8 mol/L glicerola u dejonizovanoj vodi (1,6 g natrijum glukonata, 1,8 g H_3BO_3 , 2,5 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 25 ml glicerola i dejonizovana voda do 100 ml). Boratnim puferom je podešen pH mobilne faze na 8,5. Kalibracija pH-metra na pH 7,01 i pH 10,01 je vršena standardnim puferskim rastvorima. Pre upotrebe mobilna faza je filtrirana kroz membranski filter veličine pora 0,45 μm . UV-DAD detekcija je vršena na talasnoj dužini 214 nm. Protok mobilne faze je bio 1,3 mL/min. Zapremina uzorka koji se injektuje u tečni hromatograf iznosi 50 μL (22).

HPLC Aparatura: pumpa HPLC (LKB 2150, Bromma, Sweden); petlja za injektovanje, 50 μL ; detektor, UV-diode array (UV-DAD) (LKB 2152, Bromma, Sweden); program za obradu podataka, Wavescan EG/Nelson commander (LKB,

Bromma, Sweden); hromatografska anjonska kolona (bazirana na strukturi kvaternernih amina): IC-PAKTM, (Waters, Millipore, Milford, MA, USA), 50 mm x 4,6 mm, 10 µm veličine pora; i predkolona: Anion Guard-PAKTM, (Waters, Millipore, Milford, MA, USA).

Superoksid dizmutaza (SOD) - Aktivnost SOD je merena spektrofotometrijski, inhibicijom spontane autooksidacije adrenalina na 480 nm. Kinetika enzimske aktivnosti praćena je u karbonatnom puferu (50 mM, pH 10.2, sadrži 0.1 mM EDTA), posle dodavanja 10 mM adrenalina (23). Rezultati se izražavaju kao U SOD/mg proteina.

Malondialdehid (MDA) - Koncentracija MDA se određuje spektrofotometrijskim metodom (24). MDA, kao sekundarni produkt LPO daje crvenu boju posle inkubacije sa tiobarbiturnim reagensom (15 % trihlorsiréetna kiselina i 0,375 % TBA), na 95 °C i pH 3,5. Absorbanca je merena na 532 nm. Rezultati se predstavljaju kao pmol MDA/mg proteina.

Glutation (GSH) - Za određivanje ukupnog GSH koristi se reciklirajuća reakcija oksidacije GSH do GSSG u prisustvu Elmanovog reagensa: 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina (DTNB), a zatim se nastali GSSG redukuje nazad do GSH uz prisustvo enzima glutation reduktaze (GR) (25). Rezultati se izražavaju u nmol GSH/mg proteina.

Glutation peroksidaza (GPx) - Ova metoda se zasniva na indirektnom određivanju aktivnosti GPx spektrofotometrijskim merenjem potrošnje NADPH na 340 nm. Ukratko, enzim GPx katalizuje redukciju lipidnih hidroperoksida u alkohol/H₂O korišćenjem redukujućih ekvivalenata GSH, pri čemu nastaje GSSG. U prisustvu GR GSSG se redukuje do GSH, uz utrošak NADPH (donor reduktivnih ekvivalenata). Za redukciju svakog mola GSSG potreban je jedan mol NADPH (26). Rezultati su predstavljeni kao U GPx/mg proteina.

Statistička analiza

Podaci su analizirani korišćenjem verzije Statistica software 7.0 (Stat Soft, Inc.). Poređenje parametara OS sa kontrolnim vrednostima je urađeno korišćenjem nezavisnog Student t-testa. Razlike su smatrane statistički značajne za p < 0,05.

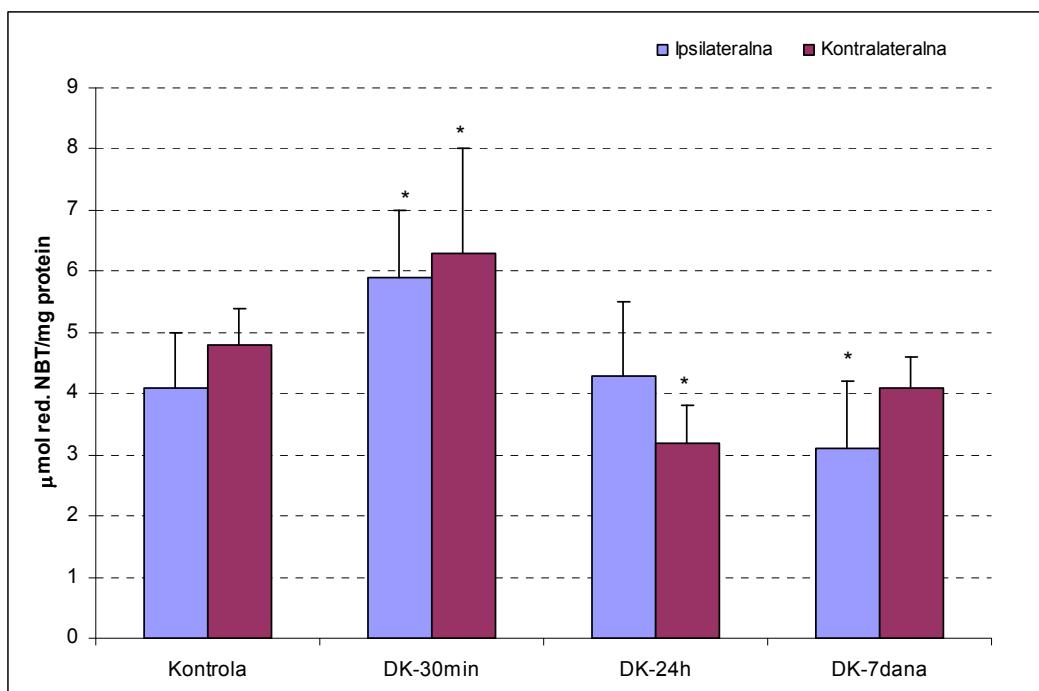
Rezultati

Ne postoji značajna razlika u analiziranim parametrima OS/NS između intaktne i lažno-operisane grupe, što govori da sam tretman nije doveo do oksidativne povrede moždanog tkiva (rezultati nisu predstavljeni). Rezultati analiziranih parametara OS/NS su predstavljeni grafički za obe strane hipokampusa, a kontrolne vrednosti se odnose na lažno-operisane pacove. Rezultati pokazuju da se nakon *i.s.* aplikacije DK razvio

OS/NS u hipokampusu obostrano, kako tretirane (ipsilateralne) tako i suprotne, kontralateralne strane.

Eksperimentalne grupe životinja su bile pod aktivnim nadzorom tokom trajanja eksperimenta. Životinje koje su tretirane DK su nakon buđenja iz anestezije pokazivale letargičnost, a tokom 2-3 sata zapažena je značajna stopa smrtnosti od 30 - 40 %.

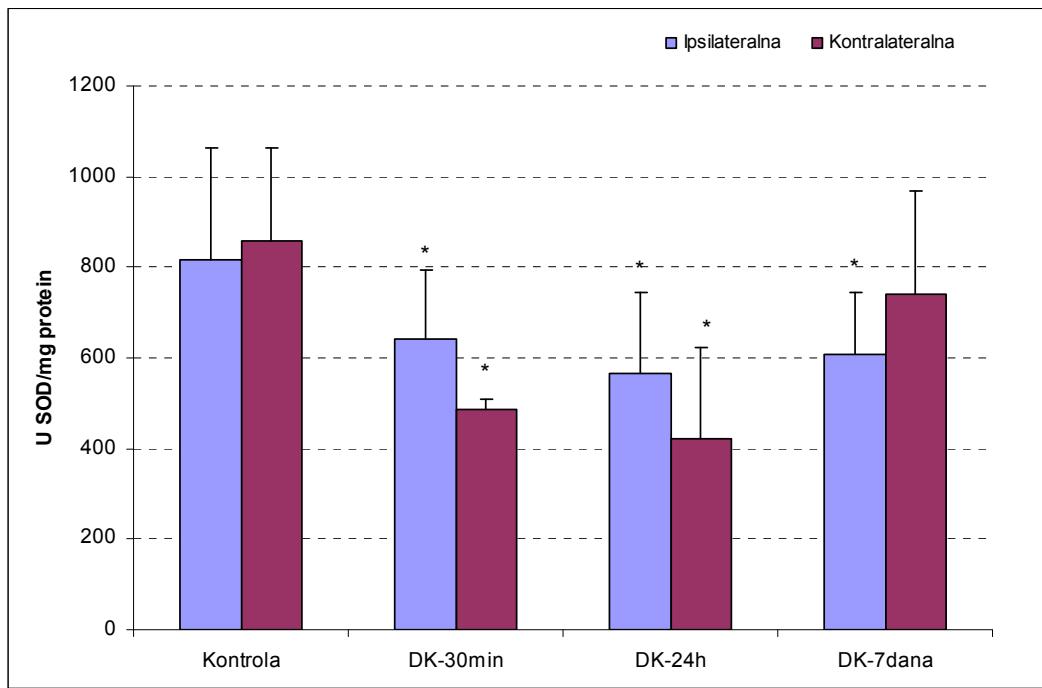
Koncentracija $O_2^{\bullet-}$ je povećana u hipokampusu obostrano ($p < 0,05$) 30 minuta nakon aplikacije DK. U ipsilateralnom hipokampusu, 24. časa izmerena koncentracija $O_2^{\bullet-}$ je na nivou kontrolnih vrednosti, dok se 7. dana nakon tretmana, značajno smanjuje ($p < 0,05$). U kontralateralnom hipokampusu, koncentracija $O_2^{\bullet-}$ nakon 24 časa je značajno niža ($p < 0,05$), a 7. dana je u nivou kontrolnih vrednosti (Grafik 1).



Grafik 1: Sadržaj superoksidnog anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: $\mu\text{mol red. NBT}/\text{mg proteina}$. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

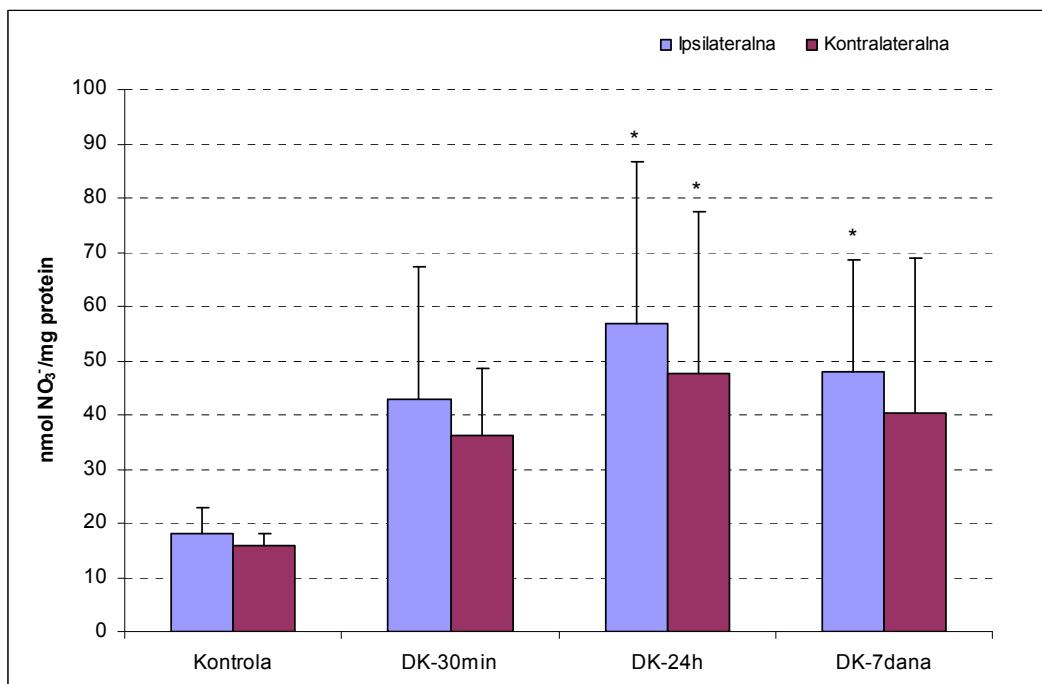
Aktivnost SOD je značajno smanjena u hipokampusu obostrano ($p < 0,05$) tokom 24 časa od aplikacije DK, nakon čega postoji blagi trend porasta aktivnosti SOD, mada je aktivnost SOD i dalje značajno niska ($p < 0,05$) u ipsilateralnom hipokampusu 7. dana (Grafik 2).



Grafik 2: Aktivnost superoksidne dizmutaze (SOD) u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: U SOD /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

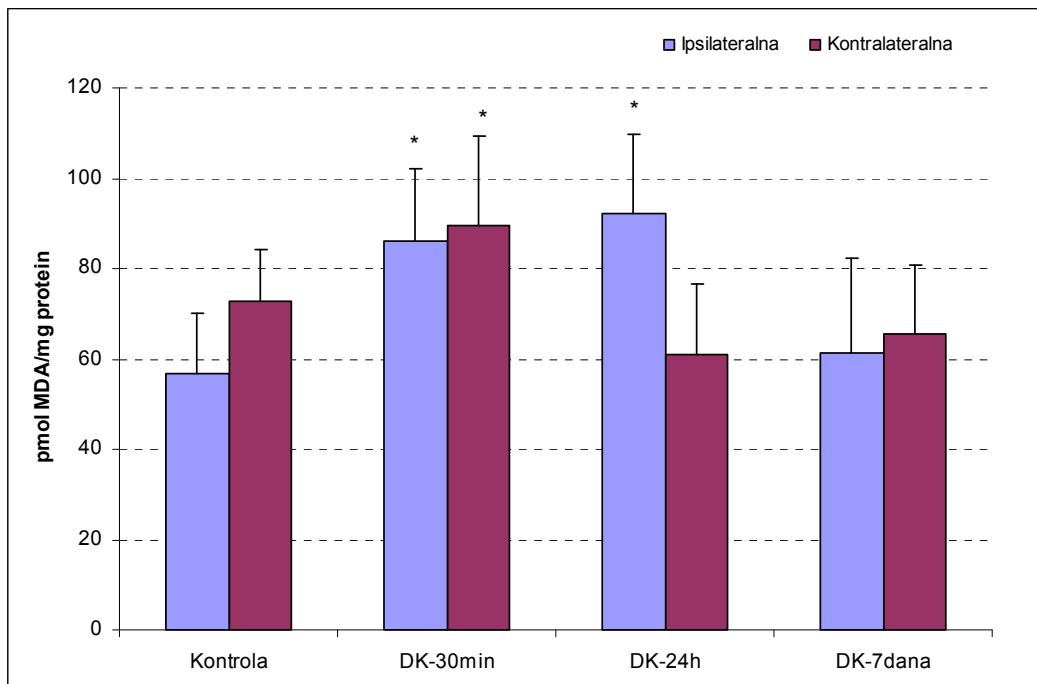
Poređenjem vrednosti sadržaja NO_3^- dobijenih nakon davanja DK sa kontrolnim vrednostima, statistički značajno više vrednosti dobijene su u hipokampusu 24. sata obostrano ($p < 0,05$) i 7. dana u ipsilateralnoj strani ($p < 0,05$) (Grafik 3).



Grafik 3: Sadržaj nitrata (NO_3^-) u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: nmol NO_3^- /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, n = 8. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

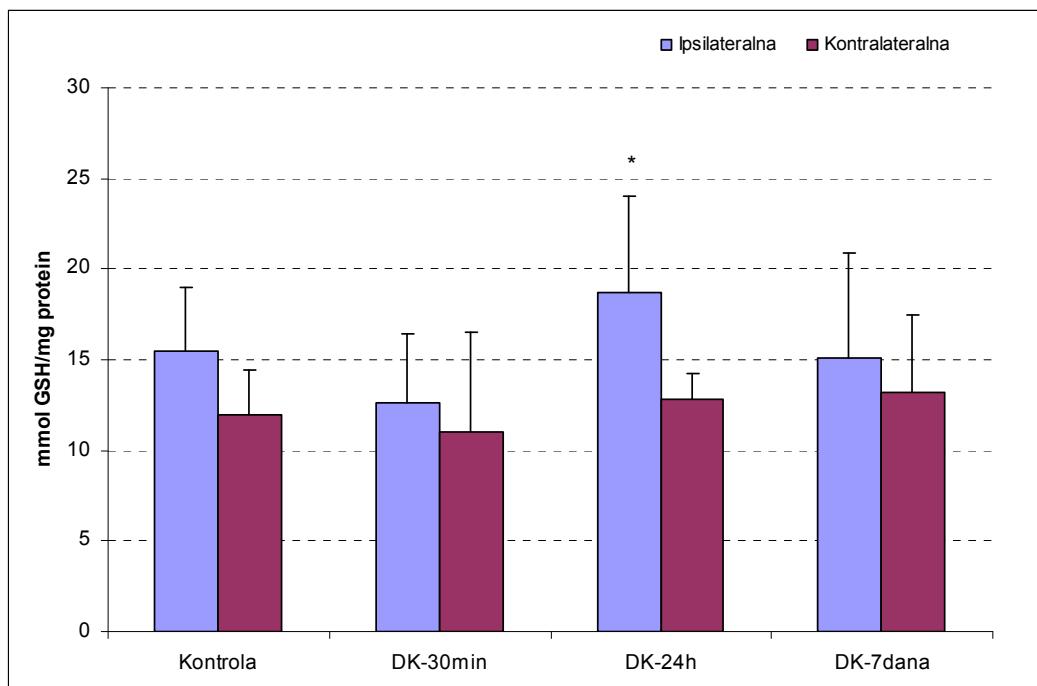
Lipidna peroksidacija je značajno povećana 30. minuta nakon aplikacije DK, obostrano ($p < 0,05$) i u ipsilateralnom hipokampusu 24. časa ($p < 0,05$). Kasnije tokom eksperimenta, MDA vrednosti nisu značajno odstupale od kontrolnih vrednosti (Grafik 4).



Grafik 4: Lipidna peroksidacija u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: pmol MDA /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, n = 8. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

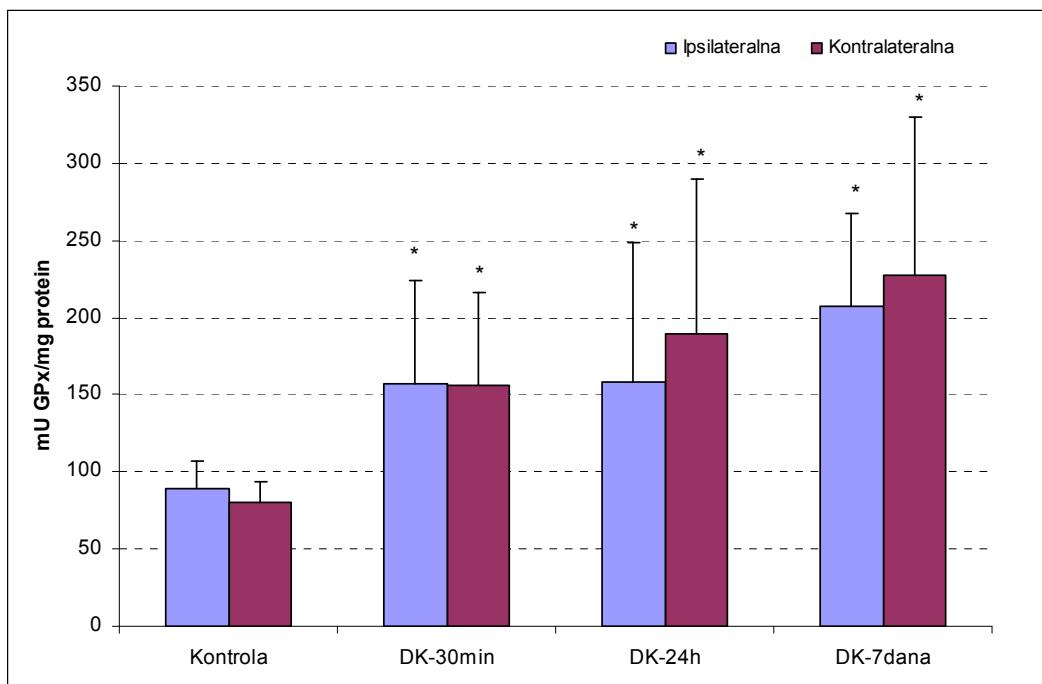
Značajnost promena sadržaja GSH u smislu povećanja izmerena je samo 24. časa u ipsilateralnom hipokampusu ($p < 0,05$) (Grafik 5).



Grafik 5: Sadržaj ukupnog glutationa (tGSH) u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: nmol GSH /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, n = 8. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

Aktivnost GPx se nakon aplikovanja DK značajno povećava, obostrano, od 30. minuta do 7. dana ($p < 0,05$) (Grafik 6).



Grafik 6: Aktivnost glutation peroksidaze u kontralateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikkvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: mU GPx/mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, n = 8. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

Diskusija

U našem eksperimentu je zabeležena učestala smrtnost Wistar pacova (30 - 40 %) neposredno po trovanju DK (tokom 2 - 3 časa od buđenja iz anestezije), što je u korelaciji sa redoks potencijalom DK (27). Takođe, životinje koje su tretirane DK nakon buđenja iz anestezije su pokazale simptome letargije.

Dobijeni rezultati potvrđuju nastanak OS kao pokretača neurotoksičnih efekata DK u hipokampusu u periodu od 24 h nakon njegove aplikacije. Specifična biohemiska organizacija ove moždane strukture, obilje glutamatnih receptora, visok metabolički obrt glutamata, posebno piramidne neurone sektora C1 i C3, čini je podložnim OS. U našem eksperimentu pokazali smo da se toksični efekti delovanja DK koji je aplikovan u strijatum, proširuje i na hipokampus. Povezanost energetskog metabolizma, stvaranje

slobodnih radikala, funkcionisanje jonskih pumpi, kao i nivo intracelularnog, naročito mitohondrijskog Ca^{2+} , sustiću se kako u celokupnom funkcionisanju ćelije, tako i u indukovanim programiranim smrti ćelija mozga (28). Na osnovu literaturnih podataka pretpostavljeno je da *i.s.* aplikacija DK kod Wistar pacova dovodi do neurotoksičnih efekata u selektivno osetljivim moždanim regijama (korteks, striatum i hipokampus) posredovanjem OS (preko RKS) i NS (preko RAV, posebno azot oksida - NO). Naš eksperiment je potvrdio da primarno oštećenje jednog dela moždanog tkiva neminovno vodi kasnjem poremećaju u drugim strukturama i da se odvija slična dinamika promena sadržaja ispitivanih indikatora OS u ispitivanom periodu od 30. minuta do 7. dana (Grafici 1-6). Objasnjenje podjednake propagacije procesa OS/NS nakon jednokratne aplikacije otrova, leži u anatomsко-funkcionalnoj organizaciji ovih moždanih struktura. Poznato je da peroksinitrit (ONOO^-) difunduje u okolno tkivo i za nekoliko ćelijskih dijametara, ovo bi mogao da bude jedan od načina prostorne i vremenske propagacije neurotoksičnog efekata dipiridila na moždane strukture koje su udaljene od primarnog mesta aplikacije.

Povećano stvaranje $\text{O}_2^\bullet-$ u hipokampusu, 30 minuta nakon aplikacije DK je u korelaciji sa smanjenjem aktivnosti SOD, što govori o nemogućnosti enzimskog sistema da ukloni povećanu koncentraciju $\text{O}_2^\bullet-$ (Grafici 1 i 2). Toksični efekti povećanog stvaranja $\text{O}_2^\bullet-$ koji su uočeni obostrano već nakon 30 minuta od aplikovanja DK, potenciraju se redoks metabolizmom DK, pri čemu u reakciji $\text{O}_2^\bullet-$ sa NO, nastaje toksični ONOO^- koji je i verovatniji put metabolisanja $\text{O}_2^\bullet-$. Normalizacija sadržaja $\text{O}_2^\bullet-$ u hipokampusu nakon 24 časa, stoga ne bi morala da znači smanjeno stvaranje $\text{O}_2^\bullet-$, već njegovu intenzivnu reakciju sa NO u kojoj nastaje toksični ONOO^- .

Uloga NO u ovim procesima je praćena merenjem sadržaja nitrata, krajnjih produkata metabolizma NO i drugih RAV (Grafik 3). Literaturni podaci govore da se 70 % nastalog ONOO^- razgrađuje do NO_3^- , a preostalih 30 % do CO_2 i NO_2 , pa delimično potkrepljuju tvrdnju da povećana produkcija ONOO^- vodi povećanju koncentracije nitrata (28).

Potvrđeno je da ONOO^- može procesom nitrozilacije da smanji aktivnost SOD, što bi moglo da objasni nađeno smanjenje SOD u najranijem terminu, od 30 minuta do 24^h, od aplikovanja DK. U literaturi se navodi da ONOO^- može da istisne Fe i Cu iz stabilnih kompleksa, kakvi su metaloproteini, što bi značilo da ONOO^- na taj način može inhibirati metaloenzim SOD, koji sadrži upravo Cu (29). Aktivnost enzima SOD bi trebalo da ima negativan uticaj na sadržaj NO_3^- , s obzirom da „uklanja” $\text{O}_2^\bullet-$, polazno jedinjenje pored NO za sintezu ONOO^- , a time i njegov krajnji metabolički produkt NO_3^- . Poznato je da od aktivnosti ovog enzima umnogome zavisi koncentracije $\text{O}_2^\bullet-$ u mikrosredini, jer se ovaj enzim praktično takmiči sa NO za reakciju sa $\text{O}_2^\bullet-$, uz napomenu da je reakcija sa NO ipak brža (28). Uklanjanje $\text{O}_2^\bullet-$ putem autooksidacije (dizmitacije) je četiri puta sporija (reakcija katalizovana enzimom SOD). Tako se

smatra de je vanćelijski prostor, gde je koncentracija SOD vrlo niska, najverovatnije mesto produkcije ONOO^- *in vivo*. Dobijeni rezultati sadržaja NO_3^- i aktivnosti SOD u istim vremenskim intervalima govore u prilog teoriji o povezanosti ova dva mehanizma u okviru kompleksnog biohemijskog procesa uključenog u razvoj OS/NS.

Sedam dana nakon toksičnog delovanja DK, aktivnost SOD se približava kontrolnim vrednostima što je verovatno rezultat normalizacije redoks stanja u ovoj selektivno osetljivoj moždanoj strukturi.

Nastalo povećanje LPO u hipokampusu koje se obostrano registruje već nakon 30 minuta i održava se u ipsilateralnom hipokampusu do 24. časa (Grafik 4) potvrđuje razvoj OS kao mehanizma oštećenja ćelijskih membrana čija je funkcionalnost od posebnog značaja sa aspekta ekscitabilnosti, ali i ekscitotoksičnosti (29). Pretpostavljeni metaboličko usmerenje reakcije O_2^- sa NO je potkrepljeno literaturnim podacima o povećanoj regionalnoj distribuciji azot oksid sintaze (NOS) i gvožđa u selektivno osetljivim moždanim strukturama (30). Montague i sar. su pokazali da aktivacija N-metil-d-aspartat (NMDA) receptora, kojima obiluje hipokampus, usled oslobađanja glutamata iz presinaptičkih terminala, korelira sa oslobađanjem NO, koji difunduje i van ćelije, reagujući tako i sa stvorenim O_2^- (31). Važno je istaći, da su naši rezultati pokazali podudarnost promena sadržaja NO_3^- i O_2^- u istim vremenima u okviru iste moždane regije kod trovanja DK.

U odnosu na vremenski determinisane promene u oksidativnom stanju hipokampa, promene u koncentraciji GSH i aktivnosti GPx podržavaju napred iznete pretpostavljene događaje. U ranom terminu, 30 minuta nakon aplikovanja DK, nema smanjenja koncentracije GSH i pored povećane aktivnosti GPx što govori o izraženoj osetljivosti i velikom antioksidativnom potencijalu ovog enzima. Poznato je da je GSH donor reduktivnih ekvivalenta u reakcijama redukcije lipidnih hidroperoksida i vodonik peroksida, katalizovanim GPx.

U toksičnom delovanju DK očuvanost (i čak povećanje) GSH (Grafik 5) doprinosi povećanoj aktivnosti GPx. Sedmog dana od tretmana, značajno se povećava aktivnost GPx (Grafik 6) što je od značaja za smanjenje procesa LPO (Grafik 4). Naši rezultati o povećanoj aktivnosti GPx u neurotoksičnosti DK su u skladu sa literaturnim podacima (32).

Poznato je da GSH u reakciji sa NO gradi S-nitrozo produkt, GSNO. Potencijalna kompeticija za NO od strane GSH i O_2^- , može rezultirati zaštitnim efektom ako je reakcija usmerena ka stvaranju GSNO umesto toksičnog ONOO^- . Imajući u vidu da sadržaj GSH nije bio snižen i pored povećane funkcije GPx, očigledno da je put stvaranja ONOO^- bio favorizovan, što se može potvrditi povećanom LPO u ovom periodu. Naša pretpostavka, bazirana na literaturnim podacima, jeste da verovatno neki

od intermedijera izomeracije degradacionih produkata ONOO⁻ doprinose citotoksičnom efektu dipiridila, uključujući DK (34).

Zaključak

Rezultati našeg istraživanja potvrđuju prostorno i vremensko širenje toksičnog efekta jednokratne I.S. aplikacije DK u hipokampus, strukturu koja je prostorno odvojena, ali funkcionalno povezana sa striatumom, mestom aplikacije DK. Oštećenje se manifestuje ranim razvojem OS i NS - već posle 30 minuta, a održava se i 24 časa nakon aplikacije, što se podudara sa visokom stopom mortaliteta pacova iz DK grupe u ovom periodu. Intenzivan oksidativni metabolizam DK, direktno dovodi do anoksije tretiranih moždanih struktura, neposredno posle *i.s.* administracije DK, Sedmog dana od *i.s.* aplikacije DK, tkivo hipokampusa obnavlja svoje homeostatsko oksidativno stanje.

Zahvalnost

Zahvaljujemo recenzentima na konstruktivnim sugestijama. Ovaj rad je podržan sredstvima sa projekata Ministarstva prosvete i nauke, Republike Srbije (Projekat No. III 41018) i Ministarstva odbrane Republike Srbije (Projekat No. MMA/06-10/B.3).

Literatura

1. Occupational Health Services, Inc. 1991 (Sept. 16). MSDS for Diquat. OHS Inc., Secaucus, NJ.
2. Hayes WJ. Pesticides studied in man. Baltimore: Williams and Wilkins, 1990.
3. Maceljski M, Hrlec G, Ostojić Z. Pregled sredstava za zaštitu bilja u Jugoslaviji. Glasnik zaštite bilja 1986; 9: 65.
4. Pasi A. The toxicity of paraquat, diquat and morfamquat. Vienna: Hans Huber publisher, 1978: 13-5.
5. Badah H, Nazimek T, Kaminska IA. Pesticide content in drinking water samples collected from orchard areas in central Poland. Ann Agric Environ Med. 2007; 14: 109-14.
6. INCHEM: International Programme on Chemical Safety: Environmental health criteria 39: Paraquat and Diquat. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc39.htm> 1984.
7. Hayes, W. J. Pesticides studied in man. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. 1982.
8. WSSA Herbicide Handbook Committee. Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America, 6th Ed. WSSA, Champaign, IL. EXTOXNET 1989.
9. Fuke C, Ameno K, Ameno S, Kiri T, Shinohara T, Ijiri I. In vitro studies of the metabolism of paraquat and diquat using rat liver homogenates-isolation and identification of the metabolites of paraquat and diquat. Nippon Hoigaku Zasshi 1993; 47(1): 33-45.
10. Wolfgang GH, Jolly R, Petry T. Inhibition of diquat-induced lipid peroxidation and toxicity in precision+cut liver slices by novel antioxidants. Toxicol Appl Pharmacol 1991; 108(2): 321-329.

11. Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 8-14.
12. Fussella KC, Udasina RG, Grayb JP, Mishina V, Smithc P, Heckd DE, Laskine JD. Redox cycling and increased oxygen utilization contribute to diquat-induced oxidative stress and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells overexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 50(7): 874–882.
13. Lewinson E, Gressel J. Benzyl Viologen-Mediated Counteraction of Diquat and Paraquat Phytotoxicities. *Plant Physiol.* 1984; 76: 125-130.
14. Heinrich, Peter; Georg Löffler; Petro E. Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie* (German Edition). Berlin: Springer - Lehrbuch. 2006: 123
15. Swamy M, Salleh Mohd Jamsani Mat, Sirajudeen K N S, Wan Yusof Wan Roslina, Chandran G. Nitric oxide (NO), citruline - NO cycle enzymes, glutation synthetase and oxidative stress in anoxia (hypobaric anoxia) and reperfusion in rat brain. *J Med Sci.* 2010; 7(3): 147-154.
16. Đukic M, Curcic-Jovanovic M, Ninkovic I, Vasiljevic M, Jovanovic M. The role of nitric oxide in paraquat-induced oxidative stress in rat striatum. *Ann Agric Environ Med* 2007; 14(2): 247-52.
17. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Gluthatione metabolism and its implication for health. *J Nutr* 2004; 134: 489–92.
18. König JFR, Klippel RA. The rat brain. The Williams and Wilkins Company A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Baltimore, USA. 1963: 53.
19. Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterisation of rat brain synaptic plasma membrane. *J Neurochem* 1974; 2: 281-90.
20. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
21. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA. Ed. *Handbook of methods for oxygen radicals research*, CRC Press, Inc, Boca Raton, 1985: 123-32.
22. Curcic Jovanovic M, Đukic M, Vasiljevic I, Ninkovic M, Jovanovic M. Determination of nitrate by the IE-HPLC-UV method in the brain tissues of Wistar rats poisoned with paraquat. *J Serb Chem Soc* 2007; 72(4): 347-56.
23. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine auto-oxidation. *Anal Biochem* 1978; 90: 81-9.
24. Villacara A, Kumami K, Yamamoto T, Mrsulja BB, Spatz M. Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity and inducible in vitro lipid peroxidation. *J Neurochem* 1989; 53: 595-601.
25. Anderson ME. Tissue glutathione. The DTNB-GSSG reductase recycling assay for total glutathione (GSH+1/2 GSSG). In: Greenwald RA. ed. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Reseach*, CRC Press Inc, Florida, 1986: 317-23.
26. Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 77: 1525-35.

27. Abe T, Kinda T, Takano Y, Chikazawa S, Higuchi M, Kawasaki N, Orino K, Watanabe K. Relationship between body iron stores and diquat toxicity in male Fischer-344 rats Biometals 2006; 19: 651–7.
28. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of Nitric Oxide and Related Species: Free Radical Reactions and Modification of Biomolecules. Mol Aspects Med 1998; 19: 221-357.
29. Farooqui AA and Horrocks LA. Excitatory amino acids receptors, neuronal membrane, phospholipid metabolism and neuronal disorders. Brain Res Rev 1991; 16: 171-91.
30. Prakash T, Kotresha D, Nedendla RR. [Neuroprotective activity of Wedelia calendulacea on cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative stress in rats](#). Indian J Pharmacol. 2011 Nov;43(6):676-82.
31. Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. Science 1994; 263(5149): 973-7.
32. Fu Y, Cheng WH, Ross AD, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat. Pros Soc Exp Biol Med. 1999; 222: 164-169.
33. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Sánchez Navarro A, Bastos ML, Carvalho F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. Neurotoxicol 2006; 27: 1110-22.
34. Ebadi M, Sharma SK. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease, Antioxid Redox Signal. 2003; 5: 319-35.

Dozvola Etičkog odbora za rad sa životinjama

Autori su obavljali eksperiment u skladu sa institucionalnom politikom humanog i etičkog tretmana eksperimentalnih životinja, i spremni su da dostave o tome podatke i originalne materijale, ako se traži. Eksperimentalne životinje su tretirane u skladu sa Smernicama za proučavanje životinja, br 282-12/2002 (Etički komitet Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija).

Izjava o originalnosti rada

Rezultati predstavljeni u rukopisu nisu objavljeni ili predati za objavljivanje negde drugde.

Izjava o sukobu interesa

Autori izjavljuju da nema sukoba interesa.

Oxidative and nitrosative stress - mediators of diquat neurotoxicity

Mirjana Đukić¹, Milica Ninković², Ivana Stevanović²,
Marijana Ćurčić¹, Katarina Ilić³, Dragan Đurđević²,
Dragana Vučanović¹

¹ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology „Academician Danilo Soldatovic”, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

² Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Crnotravska 17, 11000 Belgrade, Serbia

³ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Correspondence address: Mirjana Đukic, PhD. Professor,
Department of Toxicology „Academician Danilo Soldatovic”, Faculty of Pharmacy,
Belgrade University, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia.
e-mail: mirjana.djukic@pharmacy.bg.ac.rs
Phone (office): +381 11 3951 308; fax: +381 11 3972840
URL: <http://www.pharmacy.bg.ac.rs/fakultet/ljudi/nastavnik/64>.

Summary

Most commonly observed central nervous system (CNS) effects induced by systemic toxicity of herbicide diquat (DQ) are general depression and lethargy. Generally, it is accepted that DQ exerts its toxicity through the production of superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) during its red-ox metabolism in the presence of molecular oxygen, which further initiates radical chain reaction, contributing developing of oxidative stress (OS) as well. Mechanisms of DQ neurotoxic effect is not rationalized till now.

The objective of the study was to examine whether OS contributes to DQ neurotoxicity. For this purpose, male Wistar rats were intrastriatally (*i.s.*) treated with DQ and oxidative status parameters such as: superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$); nitrates (NO_3^-), as a final metabolite of reactive nitrogen species; malondialdehyde (MDA), an indicator of lipid peroxidation; activity of superoxide dismutase (SOD); glutathione peroxidase (GPx), and glutathione (GSH), were measured in the hippocampus at 30 minutes, 24 hours and 7 days post treatment.

Noteworthy, mortality rate (30 - 40 %) was observed in the group of rats treated with DQ, within 2-3 hours after awakening from anesthesia. Additionally, lethargy was the only neurological symptom observed in that group. Analyzed parameters indicate that OS mediates DQ neurotoxicity, which is documented with significant increase of lipid peroxidation.

Key words: diquat, oxidative stress, neurotoxicity, hippocampus.

Uticaj hipertrigliceridemije na male, guste LDL i HDL čestice u koronarnoj arterijskoj bolesti

Aleksandra Zeljković^{1*}, Jelena Vekić¹,
Vesna Spasojević-Kalimanovska¹, Zorana Jelić-Ivanović¹,
Nataša Bogavac-Stanojević¹, Slavica Spasić¹,
Dimitra Kalimanovska-Oštrić²

¹ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za medicinsku biohemiju,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

² Institut za kardiovaskularne bolesti, Klinički centar Srbije, 11000 Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Poremećaji koncentracije lipoproteina doprinose progresiji ateroskleroze u koronarnoj arterijskoj bolesti (KAB). Ispitivanjem zastupljenosti malih, gustih čestica lipoproteina niske (LDL) i visoke gustine (HDL), kao i otkrivanjem faktora koji utiču na njihovo povećano stvaranje, moguće je smanjiti rizik za pojavu budućih kardiovaskularnih dogadaja. U ovoj studiji ispitivali smo uticaj koncentracije triglicerida (TG) na veličinu i raspodelu LDL i HDL subfrakcija kod 181 pacijenta sa KAB i 178 zdravih osoba. LDL i HDL subfrakcije su razdvojene metodom vertikalne elektroforeze na gradijentu poliakrilamida, a koncentracije lipidnih parametara su određene rutinskim laboratorijskim metodama. Utvrđili smo da KAB pacijenti imaju značajno manje dijametre LDL i HDL čestica ($P<0,001$), veći udeo LDL III, a manje HDL 2b subfrakcija ($P<0,05$). U KAB grupi povišena koncentracija TG bila je u korelaciji sa manjim LDL i HDL dijametrima i nižim udelom LDL I subfrakcija. Pacijenti sa hipertrigliceridemijom imali su manje LDL dijametre ($P<0,01$) i veći udeo malih, gustih LDL čestica ($P<0,05$) u odnosu na normotrigliceridemične pacijente. Sem toga, kod pacijenata sa hipertrigliceridemijom uočena je preraspodela HDL subfrakcija ka manjim česticama. Naši rezultati ukazuju da je koncentracija TG u serumu glavni lipidni faktor rizika koji determiniše količinu malih, gustih LDL i HDL čestica u KAB.

Ključne reči: koronarna arterijska bolest; LDL; HDL; hipertrigliceridemija.

*Adresa za korespondenciju : Aleksandra Zeljković

Katedra za medicinsku biohemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
Beograd, Srbija, Tel: (+381 11) 3970284 Fax: (+381 11) 3972840
E-mail: aleksandra.zeljkovic@pharmacy.bg.ac.rs

Uvod

Ateroskleroza je kompleksan proces koji ima multifaktorsku etiologiju i hroničan tok. U nizu suksesivnih događaja tokom aterogeneze primarno mesto zauzima akumulacija holesterola u intimi krvnog suda. Stoga se povišena koncentracija holesterola u lipoproteinima niske gustine (LDL-h) i snižena koncentracija holesterola u lipoproteinima visoke gustine (HDL-h) smatraju glavnim lipidnim faktorima rizika za nastanak ateroskleroze. Ipak, i pored snažnih dokaza u prilog lipidnoj hipotezi, brojne studije su pokazale da određivanje koncentracija LDL-h i HDL-h nije uvek dovoljno za pravovremenu dijagnozu, kao i za prepoznavanje osoba sa povišenim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB).

U novije vreme dokazano je da etiopatogeneza ateroskleroze podrazumeva sadejstvo dislipidemije, inflamacije i oštećenja endotela pod dejstvom slobodnih kiseoničnih radikala (1), što je uticalo na pomeranje težišta istraživanja sa kvantitativnih na kvalitativna svojstva serumskih lipoproteina (2). Naime, lipoproteini predstavljaju heterogenu grupu čestica sastavljenu od većeg broja subfrakcija, koje se razlikuju po sadržaju lipida i proteina. Prethodna istraživanja pokazala su da pojedine LDL i HDL subfrakcije imaju različita funkcionalna svojstva i, sledstveno, različit stepen aterogenog, odnosno ateroprotективног delovanja. Sa stanovišta ateroskleroze najznačajnije su male, guste LDL čestice, jer imaju najveći aterogeni potencijal (3). S druge strane, kompleksan metabolizam i očigledne razlike u strukturi pojedinih HDL subfrakcija sugerisu i različitu protektivnu ulogu u aterogenezi, odnosno manje ili više izražena antiaterogena svojstva (4).

Funkcionalna svojstva LDL i HDL čestica u mnogome zavise od ukupnog vaskularnog okruženja u kome se one nalaze (3, 4). U tom smislu, važan modulatorni efekat mogu imati i promene u koncentraciji serumskih lipida. Dobro je poznato da povišena koncentracija triglicerida (TG) u serumu povećava rizik za razvoj KVB. Kako je metabolizam lipoproteina suštinski povezan, povišena koncentracija TG značajno utiče na remodelovanje lipoproteinskih čestica i tako doprinosi povećanju njihovog aterogenog potencijala (5). Dokazano je da lipoproteini obogaćeni TG predstavljaju jedan od ključnih elemenata aterogeneze (6). Nelipidni faktori rizika za KVB kao što su gojaznost, pušenje, fizička neaktivnost, prekomeren unos alkohola, metaboličke bolesti i neki lekovi, takođe su unakrsno povezani sa serumskom koncentracijom TG, što dodatno komplikuje tumačenje laboratorijskih nalaza i evaluaciju pojedinačnog doprinosa TG razvoju bolesti (7).

Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita uticaj koncentracije TG na veličinu i raspodelu LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolesću (KAB) i kod zdravih osoba.

Materijal i metode

Ispitanici

U istraživanju je učestvovao 181 pacijent (118 muškaraca i 63 žene) sa KAB i 178 zdravih osoba. Pacijenti su na Institutu za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbije podvrnuti koronarnoj angiografiji na osnovu koje je procenjena težina koronarnog oboljenja. Indikacije za invazivnu dijagnostiku bile su: stabilna angina pektoris, nestabilna angina pektoris, infarkt miokarda ili atipičan bol u grudima sa pozitivnom istorijom KVB u porodici. Procenjivano je suženje na desnoj koronarnoj arteriji, levoj descendenternoj arteriji i levoj circumflexus arteriji. Dva iskusna kardiologa su bez prethodnog znanja o stanju pacijenta procenjivali koronarografski nalaz, a konačna odluka se donosila konsenzusom. Kontrolna grupa je formirana u toku redovnih sistematskih pregleda u Domu zdravlja „Palilula” i Domu zdravlja „Novi Beograd”, a činili su je zdravi ispitanici upareni sa pacijentima po kriterijumu pola i starosti. Kriterijumi za isključivanje prilikom formiranja kontrolne grupe bili su: prisustvo KVB, bilo koje druge sistemske inflamatorne ili metaboličke bolesti, bolesti jetre ili bubrega, te uzimanje lekova koji mogu uticati na lipidni status.

Sa svim učesnicima u istraživanju obavljen je standardizovan intervju. Sakupljeni su anamnestički podaci koji su uključivali: pol, godine, visinu, težinu, krvni pritisak, osnovne životne navike i porodičnu istoriju KVB u prvostepenom srodstvu. Zabeleženi su i podaci o uzimanju lekova. Iz podataka za visinu i težinu izračunat je indeks telesne mase (ITM). Hipertenzija je definisana kao sistolni pritisak ≥ 140 mg Hg, dijastolni pritisak ≥ 90 mg Hg, ili uzimanje antihipertenzivne terapije. Dijabetes melitus je definisan kod pacijenata kod kojih je koncentracija glukoze bila $\geq 6,1$ mmol/L ili su bili na terapiji hipoglikemicima. Ispitanici su smatrani hipertrigliceridemičnim ukoliko je izmerena koncentracija TG bila $\geq 1,69$ mmol/L (8). Istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Deklaracijom iz Helsinkija, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi ispitanici su dali pismeni pristanak za učestvovanje u istraživanju.

Biohemijske analize

Uzorci krvi iz prednje kubitalne vene su uzeti od svih ispitanika posle dvanaestočasovnog noćnog gladovanja. Krv je uzeta u epruvete sa EDTA, citratom ili separacionim gelom. Serum i plazma su odvojeni od krvnih ćelija u roku od jednog sata, a uzorci su zatim podeljeni u porcije od 200 μL i čuvani u zamrzivaču na -80°C do izvođenja analiza. Koncentracije ukupnog holesterola (UH), LDL-h, HDL-h, TG, apolipoproteina B (apoB) i apolipoproteina AI (apoAI) određene su standardnim biohemijskim metodama.

Razdvajanje i evaluacija LDL i HDL subfrakcija

Za istovremeno razdvajanje LDL i HDL subfrakcija korišćena je metoda vertikalne elektroforeze na kompozitnom poliakrilamidnom gradijent (3-31%) gelu (9, 10). Ukratko, elektrofororetsko razdvajanje LDL i HDL subfrakcija se vršilo u vertikalnoj kadi Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) na 8°C u Tris puferu pH 8,35. Za kalibraciju gelova korišćeni su tireoglobulin (17,0 nm), feritin (12,2 nm), laktat dehidrogenaza (8,4 nm), albumin (7,1 nm) i standardizovana humana plazma sa dve LDL subfrakcije poznatog dijametra (26,99 i 25,52 nm). Denzitometriranje gelova je vršeno na skeneru Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria), uz korišćenje programa Image Quant software (version 5.2;1999; Molecular Dynamics). Na osnovu denzitometrijskog prikaza određeni su dominantni LDL i HDL dijametri, te relativni (%) udio svake pojedinačne subfrakcije u ukupnom LDL ili HDL profilu ispitanika. Relativni udio malih, gustih LDL čestica definisali smo kao zbir relativnih udela svih subfrakcija čiji je dijametar $\leq 25,5$ nm, odnosno kao zbir relativnih udela LDL III i LDL IV subfrakcija. Analogno tome, relativni udio malih HDL čestica je definisan kao zbir relativnih udela subfrakcija HDL 3a, 3b i 3c, odnosno svih subfrakcija čiji je dijametar $\leq 8,8$ nm (11).

Statistička analiza

Kontinuirani podaci su prikazani kao aritmetičke srednje vrednosti i standardne devijacije za normalno distribuirane parametre, odnosno kao geometrijske srednje vrednosti i intervali pouzdanosti (CI) za parametre koji nisu normalno distribuirani, ali im logaritmovane vrednosti prate normalnu raspodelu. Kategorički podaci su prikazani kao absolutne frekvence. Razlike između kontinuiranih varijabli proveravane su Studentovim t-testom, a između kategoričkih varijabli upotrebom χ^2 testa (tablice kontigencije). Za proveru korelacije između različitih parametara korišćena je Spearanova neparametarska korelaciona analiza, dok je multipla linearna regresiona analiza primenjena za ispitivanje nezavisnih faktora uticaja na varijacije u veličini LDL i HDL čestica.

Rezultati

Opšte kliničke i demografske karakteristike učesnika u studiji prikazane su u Tabeli I. Evaluacijom nelipidnih faktora rizika za KVB utvrdili smo značajno više vrednosti BMI i veći procenat pušača kod pacijenata. Očekivano, prevalenca arterijske hipertenzije je bila veća kod pacijenata. Koncentracija TG bila je značajno viša u KAB grupi, dok su koncentracije HDL-h i apoAI bile niže. Međutim, nije bilo značajne razlike u koncentracijama UH, LDL-h i apoB između posmatranih grupa. Dominantni dijametri LDL i HDL čestica bili su značajno niži kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela I Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa KAB i kontrolne grupe
Table I Demographic and clinical characteristics of CAD patients and controls

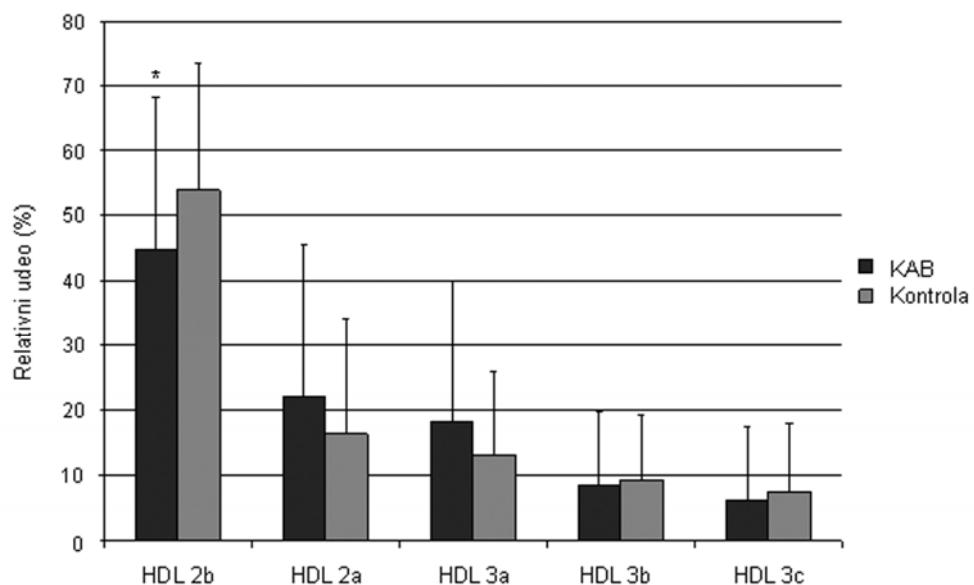
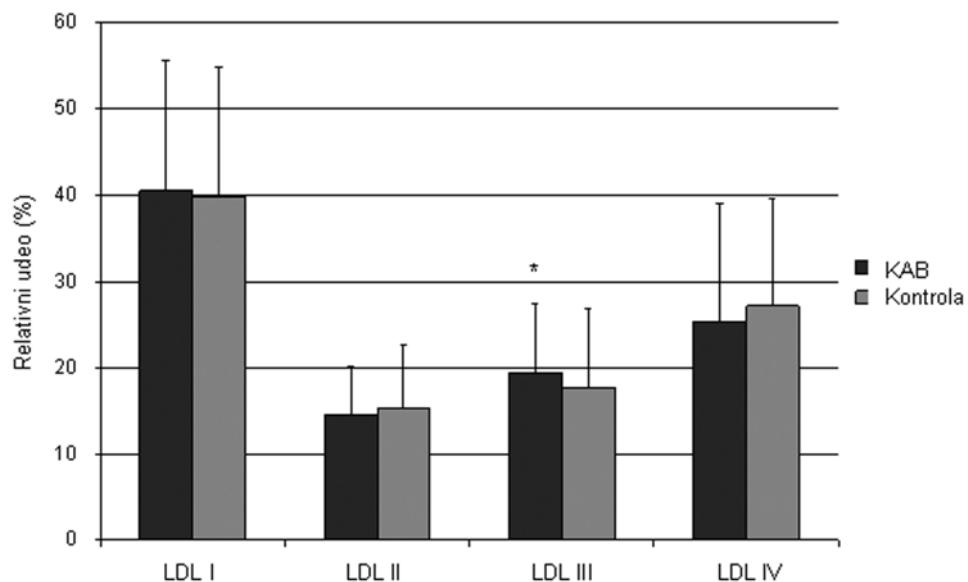
	Pacijenti (181)	Kontrola (178)	P ^a
Pol, muškarci (%)	65,2	55,1	0,149
Starost (godine)	56,08 ± 9,10	55,33 ± 10,43	0,464
BMI (kg/m ²)	27,77 ± 3,71	26,21 ± 3,60	<0,001
Pušači (%)	50,3	29,7	<0,001
Hipertenzija (%)	86,8	45,5	<0,001
Infarkt miokarda (%)	38,3	0,0	<0,001
Dijabetes melitus (%)	16,6	0,0	<0,001
UH (mmol/L)	5,37 ± 1,11	5,44 ± 0,98	0,516
LDL-h (mmol/L)	3,68 ± 1,06	3,61 ± 0,92	0,506
HDL-h (mmol/L)	0,82 ± 0,21	1,18 ± 0,32	<0,001
TG* (mmol/L)	2,04 (1,91 - 2,16)	1,36 (1,27 - 1,45)	<0,001
ApoAI (g/L)	1,39 ± 0,29	1,85 ± 0,42	<0,001
ApoB (g/L)	1,38 ± 0,35	1,32 ± 0,31	0,117
Dominantni LDL dijametar (nm)	25,85 ± 1,38	26,62 ± 1,09	<0,001
Male, guste LDL čestice (%)	44,76 ± 16,78	44,84 ± 15,17	0,959
Dominantni HDL dijametar (nm)	9,69 ± 1,15	10,30 ± 1,09	<0,001
Male HDL čestice (%)	29,7 ± 17,1	32,7 ± 22,9	0,160

Vrednosti su predstavljene kao aritmetičke srednje vrednosti ± standardne devijacije, ili kao procenti.

* Za TG je prikazana geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti.

^a Uporedivanje je vršeno Student-t testom za kontinuirane promenljive i χ² testom (tablice kontingencije) za kategoričke podatke.

Raspodele LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata i kontrola prikazane su na Slici 1. Pacijenti su imali značajno veći udeo malih, gustih LDL III subfrakcija, dok je udeo HDL 2b čestica bio značajno veći u kontrolnoj grupi.



Slika 1. Relativni udeli LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa KAB i u kontrolnoj grupi *P<0,05

Figure 1. Relative proportions of LDL and HDL subclasses in CAD patients and controls

Povezanost veličine i relativnih udela LDL i HDL subfrakcija sa parametrima lipidnog statusa u grupi pacijenata sa KAB ispitivane su Spearman-ovom korelacionom analizom. Utvrđili smo da je koncentracija TG u negativnoj korelaciji sa dijametrima dominantnih LDL ($r = -0,216; P < 0,01$) i HDL ($r = -0,141; P < 0,05$) čestica, kao i sa udelom LDL I subfrakcija ($r = -0,251; P < 0,01$). Koncentracija HDL-h je bila u pozitivnoj korelaciji sa dominantnim LDL dijametrom ($r = 0,184; P < 0,05$) i udelom LDL I subfrakcija ($r = 0,228; P < 0,01$), a u negativnoj sa udelom malih, gustih LDL III ($r = -0,142; P < 0,05$) i LDL IV ($r = -0,202; P < 0,01$) čestica. Sa porastom koncentracije apoB smanjivao se dominantni dijametar HDL čestica ($r = -0,182; P < 0,05$), dok je sa porastom koncentracije apoAI rastao dijametar LDL čestica ($r = 0,184; P < 0,05$) i udeli LDL I ($r = 0,183; P < 0,05$) i LDL II ($r = 0,168; P < 0,05$), a smanjivao se udeo LDL IV ($r = -0,227; P < 0,01$) subfrakcija.

Da bi se ispitao nezavisni uticaj lipidnih faktora rizika na veličine LDL i HDL čestica kod pacijenata sa KAB, ovi parametri su uključeni u *forward stepwise* multiplu regresionu analizu (Tabela II). U model koji je ispitivao nezavisne faktore uticaja na LDL dijametar uključeni su i dominantni HDL dijametar i relativni udeo malih HDL subfrakcija (HDL 3a-3c), dok je model za procenu uticaja na dominantni HDL dijametar uključivao i dominantni LDL dijametar i relativni udeo malih LDL subfrakcija (LDL III-IV). Dobijeni rezultati pokazali su da je povišena koncentracija TG nezavisno doprinosila smanjenju LDL dijametra. Takođe, male HDL čestice su izdvojene kao nezavisni prediktori LDL dijametara. Analiza je takođe pokazala da su koncentracije TG, UH, HDL-h, apoAI i apoB nezavisne determinante veličine HDL čestica.

U daljoj analizi ispitivan je efekat hipertrigliceridemije poređenjem dominantnih LDL i HDL dijametara i raspodela njihovih subfrakcija između ispitanika sa poželjnim i rizičnim koncentracijama serumskih TG u obe grupe. U Tabeli III prikazane su razlike u dominantnim dijametrima i udelima malih, gustih LDL i HDL čestica između hipertrigliceridemičnih i normotrigliceridemičnih pacijenata, kao i razlike između zdravih ispitanika sa poželjnim i povišenim koncentracijama TG.

Utvrđili smo da pacijenti sa hipertrigliceridemijom imaju značajno manji LDL dijametar, te povećan udeo malih, gustih LDL čestica u odnosu na normotrigliceridemične pacijente (Tabela III). Kod pacijenata sa povećanom koncentracijom TG došlo je do značajnog smanjenja u dela LDL I, a povećanja u dela LDL III subfrakcija (Slika 2). U ovoj grupi pacijenata primetan je trend ka smanjenju HDL dijametra (Tabela III) i preraspodeli HDL subfrakcija ka manjim česticama (Slika 2). U kontrolnoj grupi ispitanici sa povišenim koncentracijama TG imali su statistički značajno veći udeo malih, gustih LDL čestica (Tabela III), usled smanjenog u dela LDL I, a povećanog u dela LDL III subfrakcija (Slika 2). Ovi ispitanici imali su i značajno manji udeo HDL 2b subfrakcija (Slika 2).

Tabela II Stepwise multipla linearna regresiona analiza odnosa između dominantnog dijametra LDL i HDL subfrakcija i parametara lipidnog statusa

Table II Stepwise multiple linear regression analysis for the associations of dominant LDL and HDL diameters with lipid status parameters

Dominantni LDL dijametar*		
Nezavisni prediktori	β (standardna greška za β)	P
TG (mmol/L)	-0,213 (0,104)	<0,01
Male HDL čestice (%)	-0,269 (0,005)	<0,001
Dominantni HDL dijametar**		
Nezavisni prediktori	β (standardna greška za β)	P
TG (mmol/L)	-0,364 (0,095)	<0,001
UH (mmol/L)	0,820 (282)	<0,01
HDL-H (mmol/L)	-0,420 (0,685)	<0,01
apoAI (g/L)	0,251 (0,465)	<0,05
apoB (g/L)	-0,509 (0,471)	<0,001

* U model su uključeni: koncentracija UH, TG, LDL-H, HDL-H, apoB, apoAI, dominantni HDL dijametar i relativni udeo malih HDL subfrakcija (sve kontinuirane promenljive).

** U model su uključeni: koncentracija UH, TG, LDL-H, HDL-H, apoB, apoAI, dominantni LDL dijametar i relativni udeo malih LDL subfrakcija (sve kontinuirane promenljive).

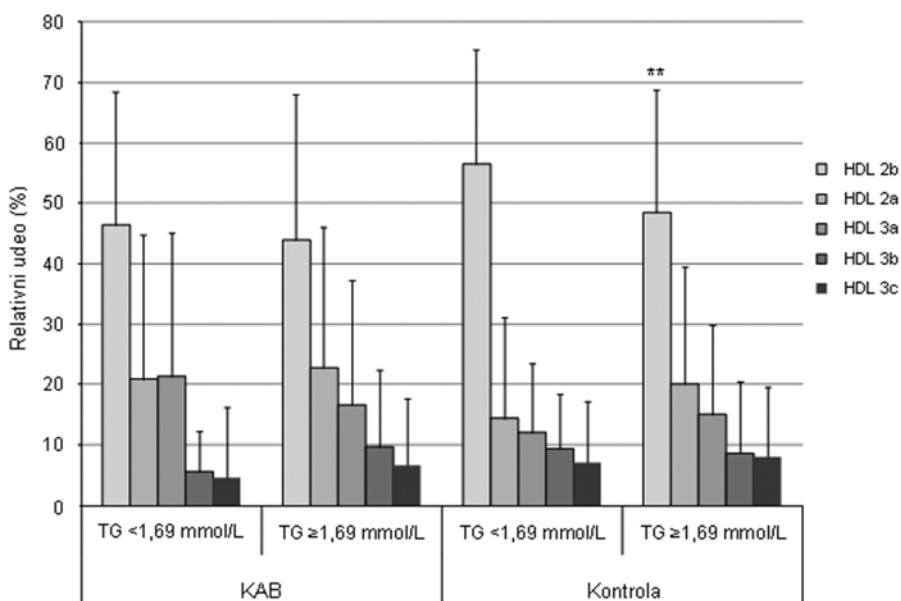
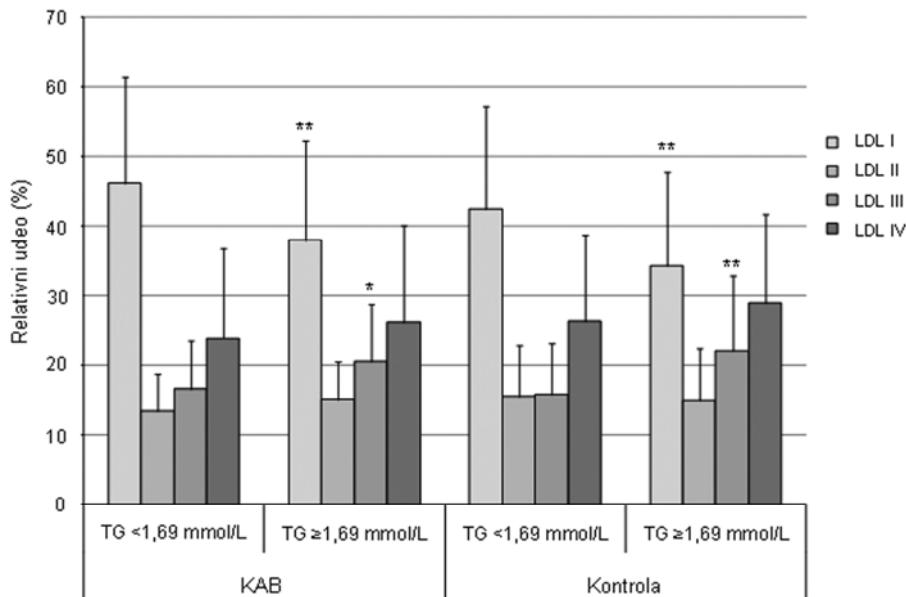
Tabela III Uticaj hipertrigliceridemije na dominantne dijametre i ideo malih, gustih LDL i HDL čestica kod pacijenata i kontrola

Table III Influence of hypertriglyceridemia on dominant diameters and relative proportions of small, dense LDL and HDL particles in CAD patients and controls

	KAB		Kontrola	
	TG < 1,69 mmol/L	TG ≥ 1,69 mmol/L	TG < 1,69 mmol/L	TG ≥ 1,69 mmol/L
Veličina uzorka	58	123	122	56
Dominantni LDL dijametar (nm)	26,36 ± 1,54	25,61 ± 1,24 **	26,30 ± 1,19	26,77 ± 1,01 ***
Male, gусте LDL честице (%)	40,5 ± 15,7	46,7 ± 16,9 *	42,1 ± 14,9	50,8 ± 14,2 ***
Dominantni HDL dijametar (nm)	9,8 ± 1,1	9,7 ± 1,2	10,4 ± 0,9	10,1 ± 1,3
Male HDL čestice (%)	31,8 ± 23,1	33,2 ± 23,0	28,7 ± 16,1	31,8 ± 19,1

Vrednosti su predstavljene kao aritmetičke srednje vrednosti ± standardne devijacije.

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.



Slika 2. Uticaj hipertrigliceridemije na raspodelu LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa KAB i u kontrolnoj grupi $^*P<0,05$; $^{**}P<0,01$.

Figure 2. Influence of hypertriglyceridemia on LDL and HDL subclasses distributions in CAD patients and controls

Diskusija

Poremećaji koncentracije lipida i lipoproteina igraju ključnu ulogu u razvoju ateroskleroze. Poznato je da je povišena koncentracija LDL-h osnovni činilac koji doprinosi nastanku i progresiji aterosklerotskog plaka (8), međutim sve više dokaza sugerise da uloga lipoproteina u razvoju ateroskleroze prevazilazi efekat koji se može pripisati samo povećanoj koncentraciji LDL-h (12). Kompletnije razumevanje nudi termin „aterogeni lipoproteinski fenotip” (ALP) ili „aterogena trijada” (12) koji podrazumeva tri najčešće lipidne abnormalnosti koje se sreću kod pacijenata sa uznapredovalom aterosklerozom: povećanu koncentraciju TG, smanjenu koncentraciju HDL-h i prisustvo malih, gustih LDL čestica.

Kada se uporede opšte karakteristike pacijenata i kontrolne grupe zdravih ispitanika (Tabela I), uočavaju se razlike u lipidnom profilu. Pacijenti su imali izrazito više koncentracije TG i niže koncentracije HDL-h. Prisustvo ALP-a potvrđeno je analizom LDL i HDL subfrakcija. Naime, utvrdili smo da pacijenti imaju značajno manje LDL dijametre (Tabela I) i pomerenu raspodelu LDL subfrakcija ka manjim i gušćim česticama (Slika 1). Slično, analiza HDL čestica pokazala je da KAB pacijenti imaju značajno manje dijametre, usled smanjenog udela HDL 2b subfrakcija (Tabela I, Slika 1), što je saglasno sa rezultatima prethodnih studija (13-15). Ključni element razvoja ateroskleroze predstavlja modifikacija lipoproteinskih čestica, zapravo promene njihovih fizičko-hemijskih karakteristika, koje zatim menjaju njihovu funkciju, odnosno normalan metabolizam. Brojna fundamentalna istraživanja, epidemiološke i kliničke studije ukazale su da kvalitet LDL čestica značajno utiče na njihovu aterogenost (3). Male, guste LDL čestice se duže zadržavaju u cirkulaciji i lakše prolaze u subendotelni prostor, gde su podložnije oksidaciji, te zbog toga imaju najveći aterogeni potencijal (3). Takođe, aktuelna je hipoteza po kojoj dislipidemija, povišen nivo oksidativnog stresa ili inflamacija u neposrednom vaskularnom okruženju mogu uzrokovati smanjenje, ili čak potpun izostanak antiaterogenih svojstava HDL čestica (3, 4).

U daljoj analizi ispitivali smo korelacije između LDL i HDL subfrakcija i lipidnih parametara. Među dobijenim rezultatima izdvaja se snažna korelacija između LDL i HDL dijametara i koncentracije TG, a multipla linearna regresiona analiza dodatno je pokazala da su TG nezavisni faktori uticaja na veličinu LDL i HDL subfrakcija (Tabela II). Na ovaj način smo potvrdili centralnu ulogu TG u remodelovanju cirkulišućih lipoproteinskih čestica (5). Porast koncentracije TG u serumu reflektuje povećanu količinu lipoproteina vrlo niske gustine (VLDL). Dalje, promene u aktivnosti lipolitičkih enzima utiču da se VLDL čestice sporije uklanjaju iz cirkulacije. Naime, aktivnost hepatične lipaze (HL) pozitivno korelira sa koncentracijama TG, apoB i udelima većih VLDL i malih LDL čestica (16). Utvrđena je značajna inverzna korelacija između aktivnosti postheparinske lipoproteinske lipaze (LPL) i LDL dijametara, dok su smanjenje aktivnosti LPL i povećanje aktivnosti HL dokazane kod

pacijenata sa dominantno malim, gustim LDL česticama (17). Konačno, u hipertrigliceridemiji je pojačana razmena TG i estara holesterola između VLDL, LDL i HDL čestica, pod dejstvom helesterol-estar transfernog proteina (CETP), te nastaju LDL i HDL čestice koje su bogate TG (18). Njih zatim hidrolizuje HL, što dalje dovodi do konverzije većih subfrakcija u male, guste čestice. Kao rezultat, male, guste LDL čestice se sporije uklanjaju iz cirkulacije, dok je klirens malih HDL čestica povećan (3, 4), što se reflektuje kroz smanjenje koncentracije HDL-h. Krajnji efekat je uspostavljanje ALP-a, karakterističnog poremećaja metabolizma lipoproteina u klinički značajnoj aterosklerozi. U prilog značaja TG u remodelovanju lipoproteinskih čestica i razvoju ateroskleroze govori i činjenica da se prediktivni značaj malih, gustih LDL čestica u proceni rizika za razvoj KVB značajno smanjuje kad se TG uključe u analizu (19). Nedavno dobijeni rezultati iz EPIC-Norfolk prospective population studije pokazali su da se prediktivna vrednost broja i veličine LDL čestica značajno smanjuje nakon korekcije za koncentraciju TG i HDL-h (20).

Da bi se dalje istražio efekat hipertrigliceridemije, analiza je nastavljena poređenjem veličine i raspodele LDL i HDL čestica između ispitanika sa poželjnim i rizičnim vrednostima serumskih TG. Pacijenti sa hipertrigliceridemijom imali su značajno manji LDL dijametar, povećan deo malih, gustih LDL čestica, a uočena je i tendencija ka smanjenju dijametra i preraspodeli HDL subfrakcija u korist manjih čestica (Tabela III, Slika 2). Ukupno uzevši, može se prepostaviti da je hipertrigliceridemija u klinički značajnoj aterosklerozi udružena sa malim HDL česticama, koje imaju kompromitovanu antiaterogenu funkciju, te nisu u stanju da adekvatno spreče modifikaciju nagomilanih malih, gustih LDL čestica, što će doprineti daljoj progresiji KAB. Činjenica da smo i u kontrolnoj grupi uočili pomeranje raspodele ka manjim česticama kod hipertrigliceridemičnih ispitanika ukazuje na to da hipertrigliceridemija sama po sebi uzrokuje promene u metabolizmu LDL i HDL, nezavisno od statusa bolesti.

Aterosklerozu je kompleksno oboljenje, što predstavlja veliki izazov, kako u prevenciji, tako i u lečenju. Iako je snižavanje koncentracije LDL-h i dalje primarni cilj terapije, novije studije ispituju mogućnosti farmakološkog uticaja na kvalitet LDL čestica. Slično, kako je učinak trenutno dostupnih lekova koji imaju za cilj povećanje koncentracije HDL-h prilično skroman, u kreiranju novih terapijskih strategija teži se ka poboljšanju funkcionalnosti HDL čestica. Do sada je potvrđeno da pojedini hipolipemici imaju povoljan učinak na male, guste LDL čestice (21-23). Ovi rezultati upućuju da modifikacija veličine LDL čestica može značajno usporiti dalji razvoj KVB, čak i ako se uzmu u obzir ostali lipidni i nelipidni faktori rizika. Štaviše, u velikim kliničkim ispitivanjima je pokazano da modulacija veličine LDL čestica pod dejstvom fibrata može dovesti do smanjenja rizika za razvoj KVB (24, 25). Budući da fibrati svoje dejstvo primarno ostvaruju snižavanjem koncentracije TG, ovi rezultati mogu

poslužiti kao još jedan argument da se korekcijom hipertrigliceridemije može poboljšati lipoproteinski profil u klinički značajnoj aterosklerozi.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da KAB pacijenti imaju aterogeni profil LDL i HDL čestica, koji se dodatno pogoršava u prisustvu hipertrigliceridemije. Takođe, utvrdili smo da je koncentracija TG glavni lipidni faktor rizika koji determiniše količinu malih, gustih LDL i HDL čestica, što može imati primenu kod definisanja adekvatnih terapijskih mera u prevenciji budućih kardiovaskularnih događaja.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansijski podržan sredstvima Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (Projekat br. 175035).

Literatura

1. Chisolm GM and Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1815–26.
2. Rosenson RS. Clinical role of LDL and HDL subclasses and apolipoprotein measurement. *ACC Curr J Rev* 2004;13:33-7.
3. Rizzo M, Berneis K, Zeljkovic A, Vekic J. Should we routinely measure low-density and high-density lipoprotein subclasses? *Clin Lab* 2009;55:421-9.
4. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006;58:342-74.
5. Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 1998;81:13B-7B.
6. Malloy MJ, Kane JP. A risk factor for atherosclerosis: triglyceride-rich lipoproteins. *Adv Intern Med* 2001;47:111-36.
7. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 1998;81:18B-25B.
8. National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143–421.
9. Vekic J, Topic A, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle-aged Serbian population. *Clin Biochem* 2007;40:310-6.
10. Zeljkovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J, Jelic-Ivanovic Z, Topic A, Bogavac-Stanojevic N, et al. Does simultaneous determination of LDL and HDL particle size improve prediction of coronary artery disease risk? *Clin Exp Med* 2008;8:109-16.

11. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B, et al. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis* 2010;210:548-54.
12. Rizzo M, Berneis K. Lipid triad or atherogenic lipoprotein phenotype: a role in cardiovascular prevention? *J Atheroscler Thromb* 2005;12:237-9.
13. Miwa K. Low density lipoprotein particles are small in patients with coronary vasospasm. *Int J Cardiol* 2003;87:193-201.
14. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Despres JP, et al. Comparision of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation* 2001;104:2295-9.
15. Asztalos BF, Cupples A, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2004;24:2181-7.
16. Campos H, Dreon DM, Krauss RM. Associations of hepatic and lipoprotein lipase activities with changes in dietary composition and low density lipoprotein subclasses. *J Lipid Res* 1995; 36:462-72.
17. Jansen H, Hop W, van Tol A, Bruschke AV, Birkenhager JC. Hepatic lipase and lipoprotein lipase are not major determinants of the low density lipoprotein subclass pattern in human subjects with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1994; 107:45-54.
18. Deckelbaum RJ, Granot E, Oschry Y, Rose L, Eisenberg S. Plasma triglyceride determines structure-composition in low and high density lipoproteins. *Arteriosclerosis* 1984;4:225-31.
19. Rizzo M, Berneis K. Who needs to care about small, dense low density lipoproteins? *Int J Clin Pract* 2007; 61:1949-56.
20. El Harchaoui K, van der Steeg WA, Stroes ES, Kuivenhoven JA, Otvos JD, Wareham NJ, et al. Value of low-density lipoprotein particle number and size as predictors of coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:547-53.
21. Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am J Cardiol*. 2002;90(2):89-94.
22. Miller BD, Alderman EL, Haskell WL, Fair JM, Krauss RM. Predominance of dense low-density lipoprotein particles predicts angiographic benefit of therapy in the Stanford Coronary Risk Intervention Project. *Circulation* 1996; 94:2146-53
23. Zambon A, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation* 1999; 99:1959-64.
24. Tenkanen L, Manttari M, Manninen V. Some coronary risk factors related to the insulin resistance syndrome and the treatment with gemfibrozil. Experience from the Helsinki Heart Study. *Circulation* 1995; 92:1779-85.
25. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high density lipoprotein cholesterol: Veterans Affairs High-density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trials Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341:410-8.

Influence of hypertriglyceridemia on small, dense LDL and HDL particles in coronary artery disease

Aleksandra Zeljković^{1*}, Jelena Vekić¹,
Vesna Spasojević-Kalimanovska¹, Zorana Jelić-Ivanović¹,
Nataša Bogavac-Stanojević¹, Slavica Spasić¹,
Dimitra Kalimanovska-Oštrić²

¹ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Medical Biochemistry,
Belgrade, Serbia

² Institute for Cardiovascular Diseases, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

Summary

Alterations in serum lipoprotein levels contribute to the progression of atherosclerosis in coronary artery disease (CAD). Screening for the presence of small, dense low-density (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) particles and identification of the factors affecting their excessive production, could have beneficial effects on reducing the risk of future cardiovascular events. In this study, we investigated the effect of serum triglyceride concentration on LDL and HDL size and subclasses in 181 CAD patients and 178 healthy controls. LDL and HDL particles were separated by polyacrylamide gradient gel electrophoresis, while serum lipid parameters were determined by routine laboratory methods. CAD patients had significantly smaller LDL and HDL particle sizes ($P<0.001$), more LDL III, but less HDL 2b subclasses ($P<0.05$) than controls. In CAD group, higher TG levels were associated with smaller LDL and HDL sizes and lower proportions of LDL I subclasses. Patients with hypertriglyceridemia had reduced LDL diameters ($P<0.01$) and higher proportions of small, dense LDL particles ($P<0.05$) than normotriglyceridemic patients. In addition, hypertriglyceridemic patients had HDL subclasses distribution shifted towards smaller particles. Our results indicate that serum TG level is the main lipid risk factor that determines the amount of small, dense LDL and HDL particles in CAD.

Keywords: coronary artery disease; LDL; HDL; hypertriglyceridemia.

*Address for correspondence: Aleksandra Zeljković

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Medical Biochemistry,
Belgrade, Serbia,

Phone: (+381 11) 3970284 Fax: (+381 11) 3972840

E-mail: aleksandra.zeljkovic@pharmacy.bg.ac.rs

Testiranje robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća primenom frakcionog faktorskog dizajna

Irena Kasagić Vujanović¹, Marko Jovanović², Tijana Rakić²,
Biljana Jančić - Stojanović^{2*}, Darko Ivanović²

¹ Univerzitet u Banjoj Luci - Medicinski fakultet, Katedra za analitiku lijekova,
Ulica Save Mrkalja 14, 78000 Banja Luka

² Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

Kratak sadržaj

Test robusnosti metode predstavlja deo validacije metode, a izvodi se na kraju razvoja metode ili na početku validacije. Testiranje robusnosti je uvedeno da bi se izbegli problemi u međulaboratorijskim ispitivanjima i da bi se definisali faktori koji imaju najveći uticaj na metodu. Izabrani faktori ispituju se u intervalu koji blago prevazilazi varijacije koje se očekuju kada se metoda prenosi sa jednog instrumenta/laboratorije na drugi. Za testiranje robusnosti korisno je primeniti eksperimentalni dizajn. U ovom radu opisana su dva najčešće korišćena, Plakett-Burman-ov i frakcioni faktorski dizajn. Takođe, opisani su i načini procene značajnosti faktora, zatim načini izračunavanja intervala neznačajnosti za značajne faktore, kao i postupak određivanja parametara za procenu pogodnosti sistema. Ovakav pristup procene robusnosti metode primjenjen je na metodu tečne hromatografije za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća B i F. Robusnost je testirana primenom frakcionog faktorskog dizajna, a analizirana su četiri faktora kroz 11 eksperimenta. Sprovodeći i analizirajući sve predložene korake za robusnost procenjen je uticaj faktora na faktore rezolucije kao odgovore sistema, definisani su intervali neznačajnosti i određeni limiti za proveru pogodnosti sistema predložene metode.

Ključne reči: robusnost; frakcioni faktorski dizajn; itrakonazol; nečistoće;
reverzno – fazna tečna hromatografija

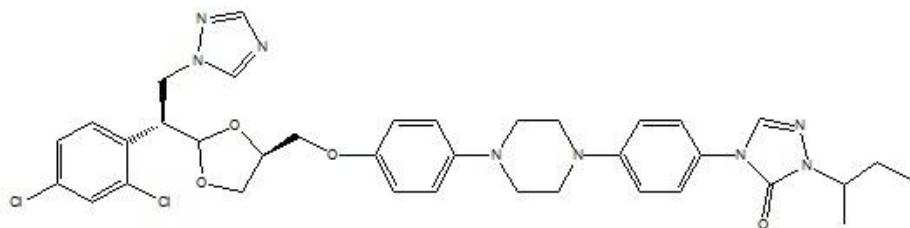
*autor za prepisku: Biljana Jančić Stojanović,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
tel: +381 11 3951 333; e-mail: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs

Uvod

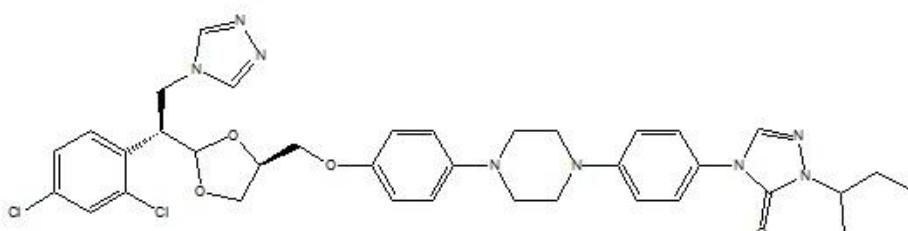
Robusnost metode za farmaceutsku analizu mera je njene sposobnosti da se odupre malim i namernim promenama u eksperimentalnim uslovima metode, a ujedno je i mera pouzdanosti metode tokom rutinske primene [1]. Postoji nekoliko definicija robusnosti koje su veoma slične, ali se u farmaceutskoj analizi danas najviše koristi definicija Međunarodne Konferencije za harmonizaciju tehničkih zahteva za registraciju farmaceutskih proizvoda za humanu upotrebu (eng. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH*). ICH smernice [1], takođe, navode da „*jedna od posledica procene robusnosti treba da bude i određivanje graničnih vrednosti parametara za procenu pogodnosti sistema, kako bi se obezbedila pouzdanost analitičke metode kada god se koristi*“. Naime, podaci dobijeni iz testa robusnosti mogu se upotrebiti za definisanje graničnih vrednosti parametara za procenu pogodnosti sistema (eng. *System Suitability Tests – SST*). Ovakav način definisanja SST limita na osnovu eksperimentalnih podataka pouzdaniji je i značajniji od arbitarnog pristupa koji se zasniva na iskustvu analitičara.

Cilj ovog rada je da se prikaže testiranje robusnosti metode reverzno – fazne tečne hromatografije (eng. *Reversed – Phase High Performance Liquid Chromatography – RP – HPLC*) za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća primenom frakcionog faktorskog dizajna. Pregledom literature ustanovljeno je da nema radova koji opisuju testiranje robusnosti LC metode za analizu itrakonazola i njegovih nečistoća. Takođe, primena eksperimentalnog dizajna u testiranju robusnosti predstavlja relativno nov pristup za koji nema puno podataka u literaturi, a posebno kada je reč o frakcionom faktorskom dizajnu. Struktura analiziranog itrakonazola i njegovih nečistoća označenih kao B i F prikazana je na Slici 1.

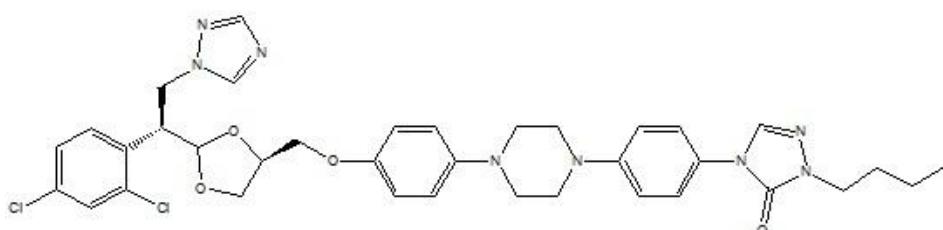
Itrakonazol je antimikotik i kao takav je oficinalan u Ph. Eur. 7, koja za određivanje srodnih supstanci propisuje LC metodu sa gradijentnim eluiranjem u trajanju od 30 minuta uz upotrebu ion par reagensa tetra-butil-amonijum-hidrogenfosfata [2]. Pored toga, u literaturi je opisana optimizacija metode tečne hromatografije za analizu itrakonazola i njegovih 12 nečistoća [3], ali za predloženi postupak nije izvršena procena robusnosti. Metoda tečne hromatografije primenjena je za analizu itrakonazola i drugih azola u kozmetičkim preparatima [4]. Takođe, može se naći veliki broj radova u kojima su prikazane metode za određivanje itrakonazola i njegovog aktivnog metabolita iz biološkog materijala [5–8]. Ekiert i saradnici [9] dali su pregled hromatografskih i elektroforetskih metoda koje su korištene za analizu različitih triazola, između ostalog i itrakonazola. Pored toga, u literaturi je opisana spektrofotometrijska metoda za određivanje itrakonazola u supstanci za humanu upotrebu i tabletama [10].



Itrakonazol



Nečistoća B



Nečistoća F

Slika 1. Strukturne formule itrakonazola i nečistoća B i F
Figure 1. Structures of itraconazole and impurities B and F

Teorija robusnosti

Za procenu robusnosti metoda koje se primenjuju u farmaceutskoj analizi, mogu se koristiti različite vrste eksperimentalnog dizajna, a kao najčešće korišćeni su Plackett – Burman–ov dizajn [11 – 12]. i *frakcioni faktorski dizajn*. Oba dizajna, kao skrining dizajni, omogućavaju procenu uticaja glavnih faktora, što za procenu robusnosti metode i jeste od najvećeg značaja. S obzirom na to da je u ovom radu primjenjen frakcioni faktorski dizajn, o njemu će biti više reči.

Frakcioni faktorski dizajn

Frakcioni faktorski dizajn [13] predstavlja redukovani *pun faktorski dizajn*, pri čemu broj eksperimenata može biti redukovan za $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$ itd. Broj eksperimenata koji je potrebno izvesti u ovom dizajnu je k^{n-p} gde n označava broj faktora, p veličinu frakcije, a k broj nivoa faktora (uglavnom je $k = 2$). Frakcioni faktorski dizajn omogućava da se sa relativno malim brojem eksperimenata ispita uticaj velikog broja faktora čime se znatno skraćuje vreme i cena eksperimenata. Primena ovog dizajna pogodna je kada želimo da ispitamo samo uticaj glavnih faktora, što je upravo slučaj u testiranju robusnosti gde se smatra da se uticaji faktorskih interakcija mogu zanemariti.

Analiza frakcionog faktorskog dizajna

Efekti faktora izračunavaju se prema sledećem izrazu [11, 14]:

$$E_x = \frac{\sum Y(+) - \sum Y(-)}{N/2} \quad (1)$$

gde je E_x efekat odgovarajućeg faktora, $\sum Y(+)$ i $\sum Y(-)$ sume odgovora gde je Y na ekstremnim (+) i (-) nivoima, a N broj eksperimenata definisanog dizajna. Za identifikaciju značajnih faktora koriste se grafičke i statističke metode.

Grafičko tumačenje značajnosti efekata postiže se najčešće primenom *half-normal probability* grafikona [14]. U cilju kreiranja *half-normal probability* grafikona, efekti su rangirani u nizu prema svojim absolutnim vrednostima. „Neznačajni“ faktori su oni čiji su efekti pozicionirani oko nule, dok efekti značajnih faktora znatno odstupaju od te vrednosti. Prema tome, „neznačajni“ efekti koji imaju normalnu raspodelu sa središtem oko nule grupisani su oko prave linije, dok značajni efekti od te prave odstupaju [11]. Iako je upotreba *half – normal* grafikona preporučljiva u odabiru statistički značajnih efekata, u nekim slučajevima primena *Pareto* dijagrama takođe može biti korisna i dati dobre rezultate.

S druge strane, za statističku procenu značajnosti E_x koristi se *statistički t test* [11, 14]:

$$t = \frac{|E_x|}{(S.E.)_e} \quad (2)$$

gde je E_x efekat određenog faktora, a $(S.E.)_e$ standardna greška efekta. Izračunata t vrednost se poredi sa tabelarnom vrednošću, t_{tab} . Efekti kod kojih je $t \geq t_{tab}$ su značajni, dok vrednosti za $t \leq t_{tab}$ ukazuju na efekte koji nemaju značajan uticaj.

Iz prethodnog izraza može se izvesti izraz za određivanje kritične vrednosti E ($E_{kritično}$):

$$E_{\text{kritično}} = t_{\text{tab}} (\text{S.E.})_e \quad (3)$$

gde je $E_{\text{kritično}}$ kritični efekat odgovora [10]. Efekti faktora smatraju se značajnim ako je $|E_X| \geq E_{\text{kritično}}$. Vrednost t_{tab} zavisi od broja stepeni slobode (eng. *Degree of Freedom* – D. F.) za (S.E.) i primjenjenog nivoa značajnosti α . Greška (S.E._e) može biti procenjena na različite načine, a ovde će biti opisan i primjenjen Dong–ov algoritam.

Dong – ov algoritam [11] podrazumeva da se inicijalna procena greške bazirana na svim efektima dobija iz izraza:

$$s_0 = 1,5 \times \text{medijana} |E_i| \quad (4)$$

gde je E_i vrednost efekta i . Dalje, iz s_0 izračunava se standardna greška (s_1) prema izrazu:

$$s_1 = \sqrt{m^{-1} \sum E_j^2} \quad (5)$$

gde je E_j efekat čija je apsolutna vrednost manja ili jednaka $2,5 \times s_0$, a m je broj takvih efekata. Zatim se s_1 koristi za računanje tzv. granice greške (eng. *Margin of Error* – ME), koja je jednaka kritičnom efektu:

$$E_{\text{kritično}} = ME = t_{(1-\alpha/2, df)} \times s_1 \quad (6)$$

gde je $df = m$, a $\alpha=0,05$ ili $0,01$. Efekti faktora su značajni ako je vrednost $|E_X| \geq ME$.

Određivanje intervala u kojem faktor sa značajnim uticajem ne ispoljava efekat

Kada faktor ima značajan efekat na odgovor, postavlja se pitanje u kom intervalu nivoi faktora treba da budu kontrolisani da bi se eliminisao efekat [11]. Ovaj interval definiše do kog stepena je moguće varirati faktore sa značajnim uticajem, a da to ne utiče na odgovor sistema, što je od velikog značaja kod postavljanja metode u rutinskoj analizi. Ovi nivoi se računaju na sledeći način:

$$\left[X_{(0)} - \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{\text{critical}}}{2|E_X|}, X_{(0)} + \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{\text{critical}}}{2|E_X|} \right] \quad (7)$$

gde su $X_{(0)}$, $X_{(1)}$ i $X_{(-1)}$ stvarne vrednosti faktora za nivoe (0), (1) i (-1).

Definisanje limita za procenu pogodnosti sistema (SST limita)

Na osnovu ICH smernica preporučuje se da se SST limiti određuju upotrebom eksperimenta iz procene robusnosti koji je pokazao najneprihvatljiviji odgovor, tzv. „uslovi sa najgorim odgovorom” [15]. „Uslovi sa najgorim odgovorom” predviđaju se iz izračunatih efekata, tako da u stvari predstavljaju kombinaciju faktora koja rezultuje

najnižim faktorom rezolucije. Da bi se definisali „uslovi sa najgorim odgovorom”, uzimaju se u obzir samo statistički značajni faktori (na $\alpha = 0,05$), a izraz koji se koristi za izračunavanje glasi:

$$Y = b_0 + \frac{E_{F_1}}{2} * F_1 + \frac{E_{F_2}}{2} * F_2 + \dots + \frac{E_{F_k}}{2} * F_k \quad (8)$$

U izrazu (8), Y predstavlja odgovor, b_0 srednju vrednost odgovora dobijenih iz dizajna, E_{F_i} efekat faktora koji se uzima kao eksperiment koji je rezultovao najgorim retencionim parametrima i F_i nivo tog faktora (-1 ili +1). Faktori koji nisu značajni održavaju se na nominalnoj vrednosti ($F_k = 0$). Dobijena vrednost odgovora Y istovremeno predstavlja i SST limit za dati odgovor.

Eksperimentalni deo

Hromatografski sistem. Analiza je vršena na hromatografskom sistemu *Waters Breeze* koji se sastoji iz Waters 1525 binarne HPLC pumpe, Waters 2487 UV/VIS detektora i *Breeze Software, Windows XP* za prikupljanje i obradu podataka.

Reagensi. Za pripremu mobilne faze i rastvora korišćeni su reagensi HPLC čistoće: acetonitril (*Sigma Aldrich*, Nemačka), tetrahidrofuran (*J. T. Backer*, Holandija), koncentrovana *erto-fosforna kiselina* (*Merck*, Nemačka) i voda HPLC kvaliteta dobijena sistemom *Millipore*.

Standardi. Itrakonazol, radni standard, *Chemo*, Quimica Sintética, Španija, Nečistoće itrakonazola (B, F), radni standardi, *Chemo*, Quimica Sintética, Španija.

Rastvori. Osnovni rastvor itrakonazola koncentracije 2 mg/mL i nečistoća B i F koncentracije 0,01 mg/mL pripremljeni su rastvaranjem odgovarajuće količine standarda u smeši metanol-tetrahidrofuran 50:50 V/V. Dalja razblaživanja su vršena u smeši ACN – H₂O 70:30, pH 3,5, pri čemu su dobijene koncentracije radnih rastvora za itrakonazol 200 µg/mL, a za nečistoće B i F 1 µg/mL. Mobilne faze za procenu robustnosti pripremljene su prema planu eksperimenata prikazanog u Tabeli I.

Tabela I Plan eksperimenata za testiranje robustnosti i dobijeni rezultati za faktor rezolucije
Table I Plan of experiments for robustness testing

Eksperiment	A	B	C	D	R ₁	R ₂
1	48	2,3	28	0,9	12,861	2,518
2	52	2,3	28	1,1	11,539	2,405
3	48	2,7	28	1,1	14,193	2,664
4	52	2,7	28	0,9	13,583	2,201
5	48	2,3	32	1,1	12,121	2,381
6	52	2,3	32	0,9	12,906	2,127
7	48	2,7	32	0,9	15,207	2,790
8	52	2,7	32	1,1	11,028	2,008
9	50	2,5	30	1,0	13,597	2,474
10	50	2,5	30	1,0	13,584	2,474
11	50	2,5	30	1,0	13,614	2,476

A – sadržaj acetonitrila (%);

B – pH vodene faze;

C – temperatura (°C);

D – protok (ml/min)

R₁ – faktor rezolucije između nečistoće B i itrakonzola;

R₂ – faktor rezolucije između itrakonazola i nečistoće F

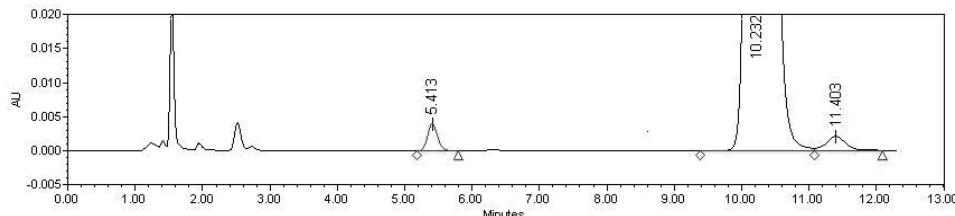
Optimalni hromatografski uslovi. Kolona: Zorbax Eclipse plus XDB – C18 (150 mm × 4,6 mm i 5 µm veličine čestica, mobilna faza smeša acetonitrila – vode u odnosu 50 : 50 V/V, pH mobilne faze 2,5 podešen koncentrovanom *ortho*-fosfornom kiselinom. Protok mobilne faze je 1 mL/min, temperatura kolone 30 °C i talasna dužina detekcije 256 nm.

Rezultati i diskusija

Testiranje robustnosti metode predstavlja složen postupak koji se mora sprovesti sistematično u više koraka koji podrazumevaju: izbor faktora koji će biti testirani, definisanje nivoa faktora, izbor eksperimentalnog dizajna, definisanje eksperimentalnog protokola, definisanje odgovora koji će se pratiti, izvođenje eksperimenata i određivanje odgovora metode, izračunavanje efekata, statistička i/ili grafička analiza efekata i izvođenje hemijski relevantnih zaključaka iz statističke analize, a ukoliko je potrebno, preduzimanje mera za poboljšanje metode.

U ovom radu, opisano je sistematično izvođenje testa robustnosti za metodu RP – HPLC za analizu itrakonazola i njegove dve nečistoće B i F. Test robustnosti ranije se

izvodio na kraju postupka validacije, ali kako postoji rizik da se pokaže da metoda nije robusna, u tom slučaju metoda se mora ponovo postaviti i optimizirati, pa je preporuka da se izvodi na samom početku validacije, tj. nakon optimizacije. Za razdvajanje ispitivanih jedinjenja postavljeni su optimalni hromatografski uslovi koji su navedeni u eksperimentalnom delu. Hromatogram itrakonazola i njegovih nečistoća pod optimalnim hromatografskim uslovima prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Hromatogram u centralnoj tački frakcionog faktorskog dizajna (nečistoća B ($t_r = 5,413$ min), itrakonazol ($t_r = 10,232$ min) i nečistoća F ($t_r = 11,403$ min)) pri optimalnim hromatografskim uslovima: acetonitril – voda (50:50 V/V), pH vodene faze 2,5, temperatura kolone 30 °C, protok 1 mL/min i talasna dužina detekcije $\lambda = 256$ nm.

Figure 2. Chromatogram in central point of fractional factorial design (impurity B ($t_r = 5.413$ min), itraconazole ($t_r = 10.232$ min) and impurity F ($t_r = 11.403$ min) under the following chromatographic conditions: acetonitrile – water (50:50 v/v), pH of the aqueous phase adjusted to 2.5, column temperature 30 °C, flow rate 1 mL min⁻¹ and $\lambda = 256$ nm

Definisani optimalni uslovi bili su osnova za pravljenje plana za izvođenje testa robusnosti. Za početak, kao faktori koji će se ispitivati u testu robusnosti izabrani su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%), pH mobilne faze, temperatura kolone (°C) i protok (mL/min). S obzirom da testiranje robusnosti podrazumeva proveru ponašanja sistema koje nastaje malim i namernim promenama eksperimentalnih uslova metode, nivoi ispitivanja faktora biraju se tako da imaju mala variranja u odnosu na optimalne uslove. Tako je za acetonitril odabранo variranje $\pm 2\%$, za pH vrednost mobilne faze $\pm 0,2$ pH jedinice, za temperaturu ± 2 °C i za protok $\pm 0,1$ mL/min. Nakon toga, odabran je eksperimentalni dizajn kojim će se ovi faktori testirati. Za odabrana 4 faktora izabran je frakcioni faktorski dizajn 2^{4-1} . Za ovaj dizajn je potrebno izvesti 8 eksperimenata, ali u cilju provere linearnosti ponašanja odgovora, potrebno je dodati i određeni broj ponavljanja u centralnoj tački. U ovom slučaju urađena su tri ponavljanja tako da je izvedeno ukupno 11 eksperimenata. Plan eksperimenta, kao i faktori i njihovi nivoi prikazani su u Tabeli I. Na ovaj način definisan je eksperimentalni protokol. Sledeći korak podrazumeva izbor odgovora koji će se pratiti. Kako faktor rezolucije (R) najbolje definiše hromatografsko razdvajanje komponenti, samim tim je najbolji

pokazatelj ponašanja nekog hromatografskog sistema, to je on odabran kao odgovor koji će se pratiti.

Kada su definisani faktori, njihovi nivoi, plan eksperimenta i odgovor sistema koji će se pratiti pristupilo se izvođenju eksperimenata prema planu datom u Tabeli I. Eksperimenti su izvedeni randomizirano – nasumično čime je izbegnut uticaj nekontrolisanih faktora koji postoje u svakom sistemu. Dobijeni rezultati za R_1 i R_2 dati su u Tabeli I.

Nakon toga, ispitana je uticaj faktora i to primenom statističke (Dong–ov algoritam) i grafičkih metoda (Pareto dijagrami i *half-normal probability* grafikoni).

Značajnost uticaja faktora najpre je procenjena primenom Dong–ovog algoritma. Načini izračunavanja i odgovarajući obrasci dati su u teorijskom delu uvoda, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli II.

Tabela II Efekti faktora i rezultati za $E_{\text{kritično}}$

Table II Factor effects and results for E_{critical}

Faktori	R_1	R_2
A	-1,33	-0,4
B	1,15	-0,058
C	-0,23	-0,12
D	-1,42	-0,044
$E_{\text{kritično}} (\alpha=0,05)$	3,153	0,258

A – koncentracija acetonitrila (%);

B – pH vodene faze;

C – temperatura (°C);

D – protok (ml/min)

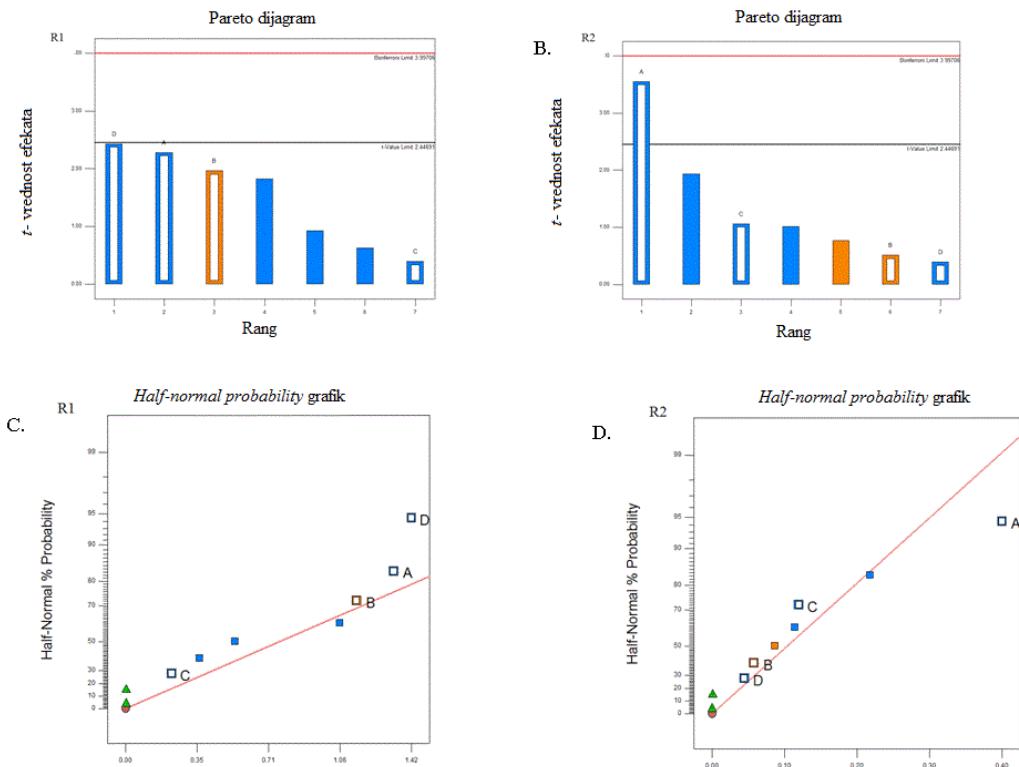
R_1 – faktor rezolucije između nečistoće B i itrakonzola;

R_2 – faktor rezolucije između itrakonazola i nečistoće F

Statistička procena efekata pokazuje da se odgovor R_1 ponaša robustno u ispitivanom opsegu, tj. sve vrednosti efekata imaju niže vrednosti od $E_{\text{kritično}}$ za verovatnoću 0,05 što pokazuje da uticaj ispitivanih faktora nije značajan. S druge strane, uticaj sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi je značajan (vrednost efekta veća je od kritične vrednosti) za odgovor R_2 dok je odgovor robustan na promene ostalih ispitivanih faktora.

Postoji preporuka da se procena uticaja faktora uvek vrši na više načina, tj. najmanje primenom dve vrste metoda (statističkih i grafičkih). Zato je ovde izvršena

procena faktorskih efekata primenom Pareto dijagrama i *half – normal probability* grafikona koji su prikazani na Slici 3.



Slika 3. A. Pareto dijagram za faktor rezolucije R₁; B. Pareto dijagram za faktor rezolucije R₂; C. *half – normal probability* grafikon za faktor rezolucije R₁; D. *half – normal probability* grafikon za faktor rezolucije R₂

Figure 3. A. Pareto dijagrame for resolution factor R₁; B. Pareto dijagrame for resolution factor R₂; C. *half-normal probability* graph for resolution factor R₁; D. *half-normal probability* graph for resolution factor R₂

Sa Slike 3 (A i B) može se zaključiti da je prema Pareto dijagramu odgovor R₁ robustan, tj. vrednosti efekata faktora su niže od odgovarajućeg *t* – limita. Za odgovor R₂ faktor A je identifikovan kao značajan. S druge strane, *half – normal probability* grafikoni (Slika 3 C i 3 D) pokazuju da je odgovor R₁ osetljiv na promene faktora A i D, dok je odgovor R₂ osetljiv na promenu faktora A i C.

Upotrebom Dong–ovog algoritma izведен je zaključak da je osetljiv samo odgovor R₂ na faktor A.

Dobijeni različiti rezultati analizom robusnosti iz dva grafička pristupa i jednim statističkim pristupom (*Dongovim* algoritmom) u skladu su sa načinom na koji različiti prisutni procenjuju kritičan efekat. Naime, *Dongov* algoritam meri odstupanja efekata

faktora od većine efekata koje su pokazali ostali faktori. Sa druge strane, tumačenje značajnosti faktora primenom grafičkih metoda može biti prilično arbitrarno, stoga je preporučljivo da se oni koriste kao potvrda statističke interpretacije, ali ne i kao jedini pouzdani način za identifikaciju značajnih faktora. U slučaju odgovora R_1 , može se primetiti da većina faktora ima ujednačen efekat na odgovor, stoga Dongovim algoritmom nijedan faktor nije identifikovan kao značajan. Pareto dijagram je dao saglasne rezultate. *Half-normal probability plot* je identifikovao faktore A i D kao potencijalno značajne, ali kako njihovo odstupanje od prave linije nije drastično veliko, može se smatrati da oni imaju nešto veći uticaj u odnosu na ostale faktore, ali da se ne moraju smatrati značajnim. Stoga je zaključeno da je odgovor R_1 robustan na ispitivane faktore. Kada je reč o odgovoru R_2 , Dongov algoritam i Pareto dijagram identifikovali su faktor A kao značajan. *Half-normal probability plot* je potvrdio značajnost faktora A, ali je ukazao i na potencijalnu značajnost faktora C. Zbog već naglašene subjektivne interpretacije rezultata ovim pristupom, izведен je zaključak da se kao definitivno značajan faktor za odgovor R_2 može smatrati faktor A.

Prednost pristupa testiranju robusnosti primenom eksperimentalnog dizajna ogleda se i u mogućnosti izračunavanja intervala u kojem faktori sa značajnim uticajem ne ispoljavaju efekat. Upotrebom Dong-ovog algoritma izведен je zaključak da je osjetljiv samo odgovor R_2 na faktor A, u skladu sa čime je prema izrazu 7 izračunat dati interval koji iznosi $48,71 - 51,29$. To znači, da se faktor A može menjati u naznačenom intervalu, a da se pri tome odgovor R_2 ne menja značajno i da je u okviru njega metoda robusna.

Potom je određen SST limit. U Tabeli III, prikazani su nivoi faktora na kojima je dobijen najneprihvataljiviji rezultat za posmatrane odgovore sistema. Izračunate su vrednosti SST limita i prikazane u Tabeli III.

Tabela III Faktorski nivoi za „njegori slučaj” i SST limiti

Table III Factor levels for „the worst case experiment” and SST limits

	Odgovori	
Faktori	R_1	R_2
A	+1	+1
B	+1	+1
C	+1	+1
D	+1	+1
SST limiti	13,112	2,211

A – sadržaj acetonitrila (%);

B – pH vodene faze;

C – temperatura (°C);

D – protok (ml/min)

R₁– faktor rezolucije između nečistoće B i itrakonzola;

R₂– faktor rezolucije između itrakonazola i nečistoće F

Na ovaj način izvršena je procena robusnosti metode tečne hromatografije za analizu itrakonazola i njegovih nečistoća. Takođe, iz istog seta podataka dobijene su i vrednosti intervala u kojem faktori sa značajnim uticajem ne ispoljavaju efekat, kao i odgovarajući limiti za procenu pogodnosti sistema. Pristup koji uključuje eksperimentalni dizajn omogućio je da se iz rezultata dobijenih iz relativno malog broja dobro isplaniranih eksperimenata dobije veliki broj podataka koju su značajni za postavljenu RP – HPLC metodu.

Zaključak

U radu je opisan sistematičan pristup testiranju robusnosti metode RP – HPLC za analizu itrakonazola i njegove dve nečistoće B i F. Izabrani faktori ispitivani su primenom frakcionog faktorskog dizajna 2^{4-1} a robusnost postavljene metode procenjena je primenom statističkih i grafičkih postupaka. Prema Pareto dijagramima metoda je robusna na promene faktora u ispitivanom opsegu, dok je analiza *half-normal probability* grafikona pokazala veću osetljivost metode na ispitivane faktore. Konačna procena robusnosti urađena je primenom Dong–ovog algoritma koji je pokazao da je posmatrani odgovor sistema (faktor rezolucije) osetljiv na promenu sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi. Na osnovu dobijenih rezultata definisan je interval u okviru kojeg se može menjati sadržaj acetonitrila a da to nema značajan uticaj na odgovor sistema. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata definisan je parametar za proveru pogodnosti sistema (rezolucija između itrakonazola i nečistoće F treba da bude najmanje 2,2).

Zahvalnica

Autori zahvaljuju Ministarstvu za prosvetu i nauku za finansiranje istraživanja u okviru projekta 172052.

Literatura

1. ICH Harmonised Tripartite Guidline prepared within the Third International Conference on Harmonisation of Technical Requirments for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Text on Validation of Analytical Procedures, 1994.
2. European Pharmacopoeia, 7th edition, 2011, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Council of Europe, Strasbourg
3. Dumarey M, Sneyers R, Janssens W, Somers I, Vander Heyden Y. Drug impurity profiling: Method optimization on dissimilar chromatographic systems: Part I: pH optimization of the aqueous phase. *Anal. Chim. Acta* 2009; 656: 85–92.
4. Gagliardi L, De Orsi D, Chimenti P, Porra' R, Tonelli D. HPLC determination of imidazole antimycotics in antidandruff cosmetic products. *Anal. Sci.* 2003; 19: 1195–1197.
5. Srivatsan V, Dasgupta AK, Prashant, Datla RR, Soni S, Patel P, Patel R, Mavadhiya C. Simultaneous determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma by high – performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2004; 1031: 307–313.
6. Koksa CHW, Sparidansb RW, Lucassenb G, Crommentuyn KML, Beijnen JH Selective high – performance liquid chromatographic assay for itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma from human immunodeficiency virus – infected patients. *J. Chromatogr. B* 2002; 767: 103–110.
7. Chena W, Gua B, Wangb H, Pana J, Lua W, Houb H. Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles. *Intern. J. Pharmaceut.* 2008; 362: 133–140.
8. Wong JW, Nisar UR, Yuen KH. Liquid chromatographic method for the determination of plasma itraconazole and its hydroxy metabolite in pharmacokinetic/bioavailability studies. *J. Chromatogr. B: Anal Technol Biomed Life Sci* 2003; 798: 355–360.
9. Ekiert RJ, Krzek J, Talik P. Chromatographic and electrophoretic techniques used in the analysis of triazole antifungal agents – a review. *Talanta* 2010; 82: 1090–1100.
10. Parikh SK, Patel AD, Dave JB, Patel CN, Sen DJ. Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of Itraconazole bulk drug and pharmaceutical formulation. *Inter. J. Drug. Develop. Res.* 2011; 3: 324–328.
11. Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers–Verbeke J., Vandeginste B.G.M., Massart D.L.: Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 24: 723–753.
12. Mašković M, Jančić-Stojanović B, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Assessment of liquid chromatographic method robustness employing Plackett–Burman design. *Acta Chromatogr.* 2010; 22: 281–296.
13. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström A, Petterson J, Bergman R. Experimental desing and optimization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1998; 42: 3–40.
14. Dejaegher B, Dumarey M, Capron X, Bloomfield MS, Vander Heyden Y. Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Anal Chim. Acta* 2007; 595: 59–71.
15. Vander Heyden, Y., Jimidar, M., Hund, E., Niemeijer, N., Peeters, R., Smeyers – Verbeke, J., Massart, D.L., Hoogmartens, J.: Determination of system suitability limits with a robustness test. *J. Chromatogr. A*, 1999; 845: 145–154.

Robustness testing of liquid chromatographic method for determination of itraconazole and its impurities applying fractional factorial design

**Irena Kasagić Vujanović¹, Biljana Jančić Stojanović^{2*}, Tijana Rakić²,
Marko Jovanović², Darko Ivanović²**

¹ University of Banja Luka, Faculty of Medicine, Department of Drug Analysis,
Save Mrkalja 14, 78000 Banja Luka, Republic of Srpska

² University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

* Corresponding author: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs; tel.: +381 11 3951 333;
fax.: +381 11 3972 840; University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Drug
Analysis, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Summary

Test of robustness is a part of the method validation and it is carried out in the end of the method development or in the beginning of the method validation. The purpose of robustness testing is to avoid problems in interlaboratory studies and to define parameters with the greatest impact on the method. The chosen factors are investigated within the range that slightly exceeds the expected variations when the method is transferred from one instrument/laboratory to another. The application of experimental design is recommended to perform robustness testing and two most often utilized - Plackett-Burman and fractional factorial design - are described. Furthermore, the manners of evaluation of factor significance, the methods for calculation of the range of insignificance for significant factors and the procedure for determination of system suitability test parameters are described. Such an approach of robustness testing was applied to the high performance liquid chromatographic method for determination of itraconazole and its impurities B and F. The robustness is tested by using fractional factorial design and 4 factors in 11 experiments were analyzed. After the application and the analysis of all the suggested steps for robustness, the impact of factors on the system responses was evaluated, insignificance ranges were defined and system suitability test limits for suggested method were determined.

Key words: Robustness; fractional factorial design; itraconazole; impurities;
liquid chromatography

Crveni pirinač u farmaceutskoj praksi

Maja Nikolić

Univerzitet u Nišu - Medicinski fakultet, Bulevar dr Zorana Đindjića 81,
18000 Niš, Srbija

Korespondencija: Prof. dr Maja Nikolić
Univerzitet u Nišu - Medicinski fakultet,
Bulevar dr Zorana Đindjića 81, 18000 Niš
tel: 064-213-4441, e-mail: mani@junis.ni.ac.rs

Kratak sadržaj

Osobe sa potvrđenom dijagnozom koronarne bolesti zahtevaju dugotrajno lečenje, koje pored upotrebe lekova za sekundarnu prevenciju, obuhvata modifikaciju faktora rizika, promenu stila života i odgovarajuću ishranu koja se može dopuniti dijetetskim suplementima. Cilj ovog rada je bio analizirati mogućnost veće upotrebe crvenog pirinča u farmaceutskoj praksi na osnovu dokazanih pozitivnih uticaja na kardiovaskularni sistem. Aktivni sastojak ekstrakta crvenog pirinča je lovastatin, koji je poznat kao lek za kontrolu dislipidemija. U radu je dat prikaz rezultata iz odgovarajućih studija o povoljnim efektima dijetetskih suplemenata koji sadrže ekstrakt crvenog pirinča, pre svega na snižavanje holerolemijske. Za češću primenu ovih suplemenata u farmaceutskoj praksi, potrebni su dokazi iz studija koje duže traju i njihovo poznавanje od strane lekara i farmaceuta.

Ključne reči: crveni pirinač, kardiovaskularne bolesti, dijetetski suplementi

Uvod

Ishrana bitno utiče na mnoge od promenljivih faktora rizika za kardiovaskularne bolesti (1), tako da Svetska zdravstvena organizacija (SZO) i druge međunarodne i nacionalne organizacije ulažu velike napore kako bi promovisale poželjan način ishrane i stil života kod što većeg broja stanovnika i time smanjile opterećenje zdravstvenih službi. Preporuke za pravilnu ishranu (smernice, vodiči) se neprestano menjaju i usklađuju sa najnovijim naučnim saznanjima, karakteristikama i uslovima života lokalnog stanovništva, a zdravstveni radnici imaju odlučujuću ulogu u formiranju pravilnih navika u ishrani.

Pojedini sastojci hrane imaju poseban značaj u prevenciji i kontroli kardiovaskularnih bolesti, posebno oni kojima se pripisuje odgovarajući uticaj na dislipidemije i aterogenezu (2). Utvrđeno je da snižavanje nivoa LDL-holesterola u krvi za 10% dovodi do 25%-tnog smanjivanja incidence ishemijske bolesti srca (3). Takođe, dokazano je da kombinacija dijetetskih suplemenata sa odgovarajućom ishranom dovodi do poboljšanja kontrole metabolizma lipida (4), tako da se kod mnogih nutraceutika i dijetetskih suplemenata koji su danas prisutni na tržištu i u kliničkoj praksi potenciraju njihovi pozitivni dislipidemijski efekti.

Cilj rada je bio analizirati mogućnost veće upotrebe crvenog pirinča u farmaceutskoj praksi na osnovu dokazanih pozitivnih uticaja na zdravlje.

Nutritivni i zdravstveni značaj crvenog pirinča

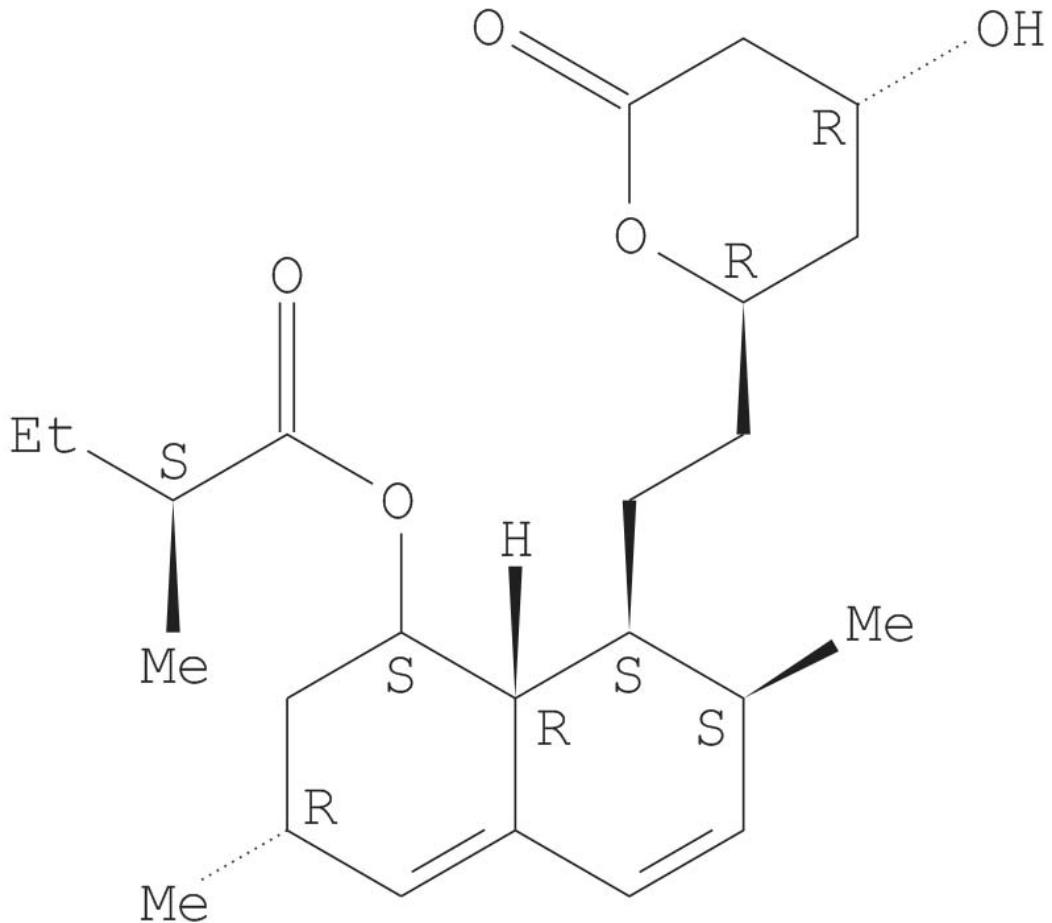
Crveni (fermentisani) pirinač se tradicionalno pravi potapanjem zrna pirinča u vodu do potpunog zasićenja, a zatim fermentacijom gljivicama *Monascus purpureus*, koje menjaju boju pirinča u purpurnu.

Energetska vrednost jedne porcije (1/4 šolje) crvenog pirinča (oko 220 kcal) zamenjuje otprilike jedno parče hleba. Kao i kod ostalih žitarica, glavni energetski sastojak u crvenom pirinču su ugljeni hidrati (185 kcal u jednoj porciji), pretežno skrob, tako da je ova namirnica lako svarljiva. Mnogo manje ima proteina (20 kcal u jednoj porciji) i masti, i to isključivo nezasićenih (15 kcal u jednoj porciji).

Crveni pirinač sadrži brojne minerale (kalijum, fosfor, magnezijum, kalcijum, mangan, gvožđe, bakar, cink, fluor, kobalt) i vitamine (vitamine B grupe i vitamin E). Priprema se kuvanjem na tihu vatri 45 minuta u odnosu sa vodom 1:2.

U tradicionalnoj kineskoj medicini crveni pirinač koristio se kao lek još tokom vladavine Ming dinastije (5). Poznata je njegova upotreba kod problema sa varenjem, što je logično budući da pirinčana voda ima antidijaroične efekte, a pirinčano brašno se koristi u ishrani odojčadi. Takođe, prema kineskoj medicini, redovna upotreba crvenog pirinča jača slezinu, popravlja cirkulaciju i povoljno deluje na srce.

Povoljno delovanje crvenog pirinča na kardiovaskularni sistem potiče od izoflavona, koji imaju antioksidativna svojstva, sterola (blokiraju apsorpciju holesterola u digestivnom traktu) i poliketida, koji su sekundarni metaboliti gljivice tzv. monakolini. Od devet poznatih monakolina - prirodnih statina (6-8), najaktivniji i preovladavajući u crvenom pirinču je Monakolin K (hemski identičan lovastatinu), koji inhibira hepatičnu HMG-CoA reduktazu, a verovatno ima i dodatne mehanizme, koji nisu potpuno poznati (Slika 1).



Slika 1. Hemijska formula monakolina K (lovastatin)
Figure 1. Chemical structure of monocolin K (lovastatin)

Prepostavlja se da upravo kombinacija monakolina i ostalih jedinstvenih sastojaka dovodi do pozitivnih efekata crvenog pirinča na srce. Mnogi pacijenti

preferiraju prirodne preparate u odnosu na hemijski sintetisane supstance, sa neosporno jačim dejstvom, pa tim više treba istražiti preparate koji eventualno slično deluju kao lekovi.

Kardiovaskularni efekti crvenog pirinča

U poslednje dve decenije istraživači u različitim zemljama uglavnom su ispitivali dejstvo crvenog pirinča na hiperlipidemije, a rezultati o tome se mogu naći u uglednim naučnim časopisima.

Meta-analiza kojom su obuhvaćene 93 randomizovane prospektivne studije sa 9625 pacijenata potvrdila je korisne efekte i bezbednost ispitanih preparata koji su sadržali crveni pirinač na modifikaciju lipidnog statusa kod primarne hiperlipidemije, kao i njihovu superiornost u odnosu na nikotinsku kiselinu i riblja ulja, a jednako ili slabije dejstvo u odnosu na fenofibrate i gemfibrozil (9).

Kod pacijenata koji su uzimali ekstrakt crvenog pirinča 4 meseca, LDL-cholesterol je bio značajno smanjen (23.0%), kao i ukupni cholesterol (15.5%) u poređenju sa placebom i nisu zabeležena neželjena dejstva (10). U drugoj studiji, posle 12 nedelja uzimanja dijetetskog suplementa sa crvenim pirinčem ukupni cholesterol u krvi je snižen 18%, LDL-cholesterol -23%, a sniženi su i trigliceridi u poređenju sa placebom (7).

Crveni pirinač je jedna od strategija i dobra alternativa za pacijente koji su intolerantni na terapiju statinima (11-13).

Kod 62 pacijenta koji su prestali da piju statine zbog mialgija, a zatim su dva puta dnevno u trajanju od 6 meseci uzimali ekstrakt crvenog pirinča (1800 mg) ili placebo, prosečno sniženje LDL iznosilo je 21%, a ukupnog cholesterola - 16%, s tim da mialgije i poremećaji rada jetre nisu zabeleženi (14). Isti autor je, u drugoj studiji, uporedno pratio dejstvo 40 mg simvastatina i izmene životnog stila (pre svega ishrane), uz upotrebu ekstrakta crvenog pirinča (1200-1800 mg dva puta dnevno, u zavisnosti od LDL nivoa) i ribljeg ulja, i kod obe grupe ispitanih potvrđeno je snižavanje LDL cholesterola za 40% (15).

Kod starijih pacijenata sa hipercholesterolemijom i visokim LDL-om, intolerantnih na statine, crveni pirinač u kombinaciji sa drugim dijetetskim suplementima (16) značajno smanjuje cholesteroliju (-20%) i LDL-C (-31%), a popravljena je i insulinska rezistencija (-10%). Ekstrakt crvenog pirinča u kombinaciji sa polikozanolom popravlja efikasnost dijete kod osoba sa hipercholesterolemijom (17). Nedavna, dobro dizajnjirana studija koja je pratila 1751 pacijenta sa dislipidemijama dokazala je da promena načina ishrane u kombinaciji sa prirodnim nutriceuticima, koji u osnovi imaju crveni pirinač, polikozanol i berberin (nalazi se u vinovoj lozi i pored snižavanje cholesterola, utiče i na snižavanje triglicerida!), mogu značajnije popraviti lipidni profil u odnosu na primenu samo dijete (18).

Crveni pirinač se može koristiti i u sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Prema kineskim istraživačima, ekstrakt crvenog pirinča smanjuje koronarnu smrtnost posle infarkta miokarda za 32%, kao i rizik od novog srčanog udara bez smrtnih posledica za skoro 70% (19). Primena preparata crvenog pirinča kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom u ranom stadijumu, poboljšava endotelijalnu funkciju (20-22), smiruje inflamatorni odgovor (23) i dovodi do stabilizacije ateromatoznog plaka. Takođe, kod istih pacijenata dolazi do brzog snižavanja nivoa C-reaktivnog proteina (tokom 24 h) i popravljanja lipidnog profila za 2 nedelje (24). Iako prvenstveno deluje na holesterol, crveni pirinač može se koristiti i u lečenju pacijenata sa koronarnom bolešću sa normalnim i blago povećanim trigliceridima (25).

Ekstrakt crvenog pirinča povoljno deluje i kod pacijenata sa aneurizmom abdominalne aorte (26). Delimično objašnjenje za kardioprotективне ефекте crvenog pirinča može biti inhibicija hiperkoagulacije i ekspresija inhibitora aktivacije spoljašnjeg puta koagulacije (27).

Čak i kod dece sa hiperholisterolemijom crveni pirinač (u dijetetskom suplementu sa polikozanolom) se pokazao kao efektivan, bezbedan i dobro tolerantan (28).

Za sada nije dokazan povoljan efekat crvenog pirinča na krvni pritisak (29).

U sporadičnim istraživanjima (30-32) je dokazano da ekstrakt crvenog pirinča ima antitumorske efekte, a povoljno deluje i na kosti (33,34), pre svega stimulacijom ćelijske proliferacije i aktivnosti alkalne fosfataze u osteoblastima.

Zbog povećanog interesa za komplementarnu i alternativnu medicinu (35), a posebno nakon završetka nekoliko dobro kontrolisanih studija koje su potvrdile sigurnost i efikasnost ekstrakta crvenog pirinča kod različitih grupa ispitanika, upotreba ovog dijetetskog suplementa je sve češća u kliničkoj praksi. Posebno obećava njegova uloga kao alternative za kontrolu lipidemije kod pacijenata koji odbijaju ili ne mogu da uzimaju statine iz bilo kog razloga (36).

Značaj standardizacije preparata crvenog pirinča

Zbog nepostojanja standardizacije i odgovarajućih zakonskih propisa za preparate koji sadrže ekstrakt crvenog pirinča, sadržaj monakolina K u komercijalnim preparatima može da varira (37), ali je u svakom slučaju mnogo niži u odnosu na standardnu preporučenu početnu dozu lovastatina (38). Istraživanja sprovedena u nezavisnim laboratorijama su dokazala veliku razliku između nađenog sadržaja monakolina K u dijetetskim suplementima i količine koja stoji u deklaraciji. Problem nedostatka standardizacije (procesa koji ujednačava sadržaj lekovitih materija u jedinici mere preparata) prisutan je i ovde, kao i kod mnogih drugih dijetetskih suplemenata. Standardizaciju monakolina K u preparatima sa ekstraktom crvenog pirinča otežavaju različiti uslovi proizvodnje, kompleksnost sastava sastojaka iz prirodnih izvora, od kojih

mnogi imaju nepoznatu ulogu u farmakološkom smislu, različito sproveđenje postupaka provere kvaliteta od strane proizvođača i dr. U razvijenim zemljama gde je tržište suplemenata razvijeno, postoji velika konkurenca među proizvođačima, koji su primorani da unapređuju kontinuirano kvalitet svojih proizvoda.

Važno je ispitivanje prisustva mikotoksina citrinina (45), koji je nefrotoksičan, mutagen i genotoksičan, a prema nekim istraživanjima može se naći u trećini dijetetskih suplemenata koji sadrže ekstrakt crvenog pirinča (37,46).

Od izuzetne je važnosti pravilno deklarisanje dijetetskih suplemenata. Evropska komisija je zatražila i dobila stručno mišljenje Evropskog autoriteta za bezbednost hrane (EFSA) o naučnoj zasnovanosti zdravstvenih izjava u vezi sa monakolinom K iz crvenog fermentisanog pirinča i održavanja normalnog nivoa LDL holesterola u krvi. U dokumentu iz 2011. godine (39) EFSA zaključuje da postoji dokazana međuzavisnost između upotrebe monakolina K iz fermentisanog crvenog pirinča i održavanja normalnih koncentracija LDL-holesterola u krvi, što se može navesti na deklaraciji. Za pomenuti efekat je potrebno 10mg monakolina K dnevno za odrasle.

Neželjena dejstva i interakcije ekstrakta crvenog pirinča

Iako je prirodni preparat i proizvodi se u kontrolisanim uslovima, ekstrakt crvenog pirinča može dati retke neželjene efekte kao što su akutni hepatitis (39,40), miopatija (41,42) i anafilaktična reakcija (43).

Posebnu pažnju treba obratiti na pacijente koji su iskusili nuspojave na statine, zbog toga što neki od njih mogu razviti ozbiljna neželjena dejstva i na najmanju dozu statina. Lovastatin, koji se u dijetetskim suplementima nalazi u nižoj dozi u odnosu na registrovane lekove, poseduje određeni rizik za pojavu neželjenih efekata kod takvih pacijenata. Činioci koji utiču na češće javljanje neželjenih pojava lovastatina su uzrast, funkcija jetre i bubrega, multisistemske bolesti, pothranjenost, neregulisan hipotireoidizam, istovremena primena lekova koji ulaze u interakcije sa statinima i farmakogenetska predispozicija (19). Sigurnost pacijenta može obezbediti samo lekar koji procenjuje odnos koristi i rizika uzimanja preparata koji sadrže lovastatin, bilo da se radi o lekovima ili o dijetetskim suplementima. Lekar može, nakon detaljne obrade pacijenta sa visokim kardiovaskularnim rizikom, preporučiti kontrolu lipemije najnižom dostupnom dozom lovastatina koja je sadržana u dijetetskim suplementima, a može i preporučiti dijetetske mere i druge dostupne lekove.

Statini se koriste u dužem periodu, veoma često sa mnogim drugim lekovima istovremeno, te je važno razmotriti mogućnost nastanka nuspojava zbog interakcija. Među najznačajnijim lekovima koji zbog interakcije povećavaju rizik od miopatije/rabdomiolize ubrajaju se inhibitori HIV proteaze, antifungicidi (itrakonazol, ketokonazol), makrolidi (eritromicin, klaritromicin), nefazodon, ciklosporin, derivati

fibrične kiseline, amjodaron, blokatori kalcijumovih kanala (verapamil), niacin. Producenje protrombinskog vremena se može javiti kada se lovastatin kombinuje sa kumarinom.

Uzimanje soka od grejpfruta povećava koncentraciju lovastatina u organizmu, pa o tome treba obavestiti pacijente.

Dakle, iako se radi o dijetetskom suplementu, ekstrakt crvenog pirinča pacijenti treba da uzimaju samo prema preporukama lekara ili farmaceuta. U SAD od 2000. godine pomenuti preparati su u nadležnosti US Food and Drug Administration (FDA), iako su do tada prodavani kao dijetetski suplementi (44). U Srbiji se ekstrakt crvenog pirinča može naći u komercijalnoj prodaji kao dijetetski suplementi, koji ne podležu detaljnoj proveri kvaliteta, te je važno definisati određene smernice za proizvodnju, prema standardima dobre proizvođačke prakse.

Zaključak

Dosadašnji dokazi upućuju na pozitivne kratkoročne efekte preparata koji sadrže ekstrakt crvenog pirinča na modifikaciju lipida u organizmu. Potrebne su dugotrajne studije kako bi preparati mogli biti preporučeni kao alternativa za lečenje primarnih hiperlipidemija. Unapređenje znanja zdravstvenih radnika o ekstraktu crvenog pirinča značajno će doprineti njegovoj pravilnoj upotrebi u kliničkoj praksi.

Zahvalnica

Istraživanja prezentovana u ovom radu su finansirana od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije u okviru projekata III-43014.

Literatura

1. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO Technical Report Series, 916, WHO, Geneva, 2003.
2. Nikolić M. Uticaj dijete na biosintezu holesterola. Timočki medicinski glasnik, 1993; 18(1-4): 47-51.
3. Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? BMJ 1994; 308:367-72.
4. Rumawas ME, Meigs JB, Dwyer JT, McKeown NM, Jacques PF. Mediterranean-style dietary pattern, reduced risk of metabolic syndrome traits, and incidence in the Framingham off-spring cohort Am J Clin Nutr 2009;90:1608-14.
5. Monascus purpureus (red yeast rice) (monograph). Altern Med Rev 2004;9(2):208-10.
6. Li XM, Shen XH, Duan ZW, Guo SR. A new monacolin analogue from Xuezhikang capsule. Yao Xue Xue Bao. 2011;46(5):564-7.

7. Heber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, Elashoff RM, Liang V, Go W. Cholesterol-lowering effects of a proprietary chinese red-yeast rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:231–6.
8. Wang J, Lu Z, Chi J. Current therapeutic research, clinical and experimental. *Curr Ther Res.* 1997;58:964–78.
9. Liu J, Zhang J, Grimsgaard S, Alraek T, Fønnebø V. Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*) for primary hyperlipidemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Chin Med.* 2006;1:4.
10. Bogsrud MP, Ose L, Langslet G, Ottestad I, Strøm EC, Hagve TA, Retterstøl K. HypoCol (red yeast rice) lowers plasma cholesterol - a randomized placebo controlled study. *Scand Cardiovasc J.* 2010;44(4):197-200.
11. Reinhart KM, Woods JA. Strategies to preserve the use of statins in patients with previous muscular adverse effects. *Am J Health Syst Pharm.* 2012;69(4):291-300.
12. Sikka P, Kapoor S, Bindra VK, Sharma M, Vishwakarma P, Saxena KK. Statin intolerance: now a solved problem. *Postgrad Med.* 2011;57(4):321-8.
13. Venero CV, Venero JV, Wortham DC, Thompson PD. Lipid-lowering efficacy of red yeast rice in a population intolerant to statins. *Am J Cardiol.* 2010;105(5):664-6.
14. Becker DJ, Gordon RY, Halbert SC, French B, Morris PB, Rader DJ. Red yeast rice for dyslipidemia in statin-intolerant patients: A randomized trial. *Ann Intern Med* 2009;150:830-9.
15. Becker DJ, Gordon RY, Morris PB, Yorko J, Gordon YJ, Li M, et al. Simvastatin vs therapeutic lifestyle changes and supplements: Randomized primary prevention trial. *Mayo Clin Proc* 2008;83:758-64
16. Marazzi G, Cacciotti L, Pelliccia F, Iaia L, Volterrani M, Caminiti G, et al. Long-term effects of nutraceuticals (berberine, red yeast rice, policosanol) in elderly hypercholesterolemic patients. *Adv Ther.* 2011; 28(12):1105-13.
17. Caputi AP, Benvenuti C. Armoweb Study Group improving the diet efficacy in hypercholesterolemic subjects with red yeast rice plus policosanol. *L'Internista/Medicina Clinica.* It. 2008;16:53–60.
18. Trimarco B, Benvenuti C, Rozza F, Cimmino CS, Giudice R, Crispo S. Clinical evidence of efficacy of red yeast rice and berberine in a large controlled study versus diet. *Med J Nutrition Metab.* 2011;4(2):133-9.
19. Mirošević Skvrce N, Andrić A, Macolić Šarinić V. Rizici primene dodataka prehrani koji sadrže crvenu rižu u bolesnika koji su iskusili nuspojave na lijekove iz skupine satina. *Farmaceutski glasnik* 2012; 68(2).108-13.
20. Lu Z, Kou W, Du B, Wu Y, Zhao S, Brusco OA, et al. Effect of Xuezikang, an extract from red yeast chinese rice, on coronary events in a Chinese population with previous myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2008;101:1689–93.
21. Wang WH, Zhang H, Yu YL, Ge Z, Xue C, Zhang P. [Intervention of xuezikang on patients of acute coronary syndrome with different levels of blood lipids]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2004;24(12):1073-6.
22. Zhao SP, Liu L, Cheng YC, Shishehbor MH, Liu MH, Peng DQ, Li YL. Xuezikang, an extract of cholestin, protects endothelial function through antiinflammatory and lipid-lowering mechanisms in patients with coronary heart disease. *Circulation.* 2004;110(8):915-20.
23. Patrick L, Uzick M. Cardiovascular disease: C-reactive protein and the inflammatory disease paradigm: HMG-CoA reductase inhibitors, alpha-tocopherol, red yeast rice, and olive oil polyphenols. A review of the literature. *Altern Med Rev.* 2001;6(3):248-71.
24. Li JJ, Hu SS, Fang CH, Hui RT, Miao LF, Yang YJ, Gao RL. Effects of xuezikang, an extract of cholestin, on lipid profile and C-reactive protein: a short-term time course study in patients with stable angina. *Clin Chim Acta.* 2005 ;352(1-2):217-24.

25. Zhao SP, Liu L, Cheng YC, Li YL. Effect of xuezhikang, a cholestin extract, on reflecting postprandial triglyceridemia after a high-fat meal in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2003;168(2):375-80.
26. Xie X, Wang Y, Zhang S, Zhang G, Xu Y, Bi H, Daugherty A, Wang JA. Chinese red yeast rice attenuates the development of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm and atherosclerosis. *J Nutr Biochem*. 2012;23(6):549-56.
27. Li P, Yang Y, Liu M. Xuezikang, extract of red yeast rice, inhibited tissue factor and hypercoagulable state through suppressing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and extracellular signal-regulated kinase activation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;58(3):307-18.
28. Guardamagna O, Abello F, Baracco V, Stasiowska B, Martino F. The treatment of hypercholesterolemic children: efficacy and safety of a combination of red yeast rice extract and policosanols. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011;21(6):424-9.
29. Li JJ, Lu ZL, Kou WR, Chen Z, Wu YF, Yu XH, Zhao YC; Chinese Coronary Secondary Prevention Study (CCSPS) Group. Long-term effects of Xuezikang on blood pressure in hypertensive patients with previous myocardial infarction: data from the Chinese Coronary Secondary Prevention Study (CCSPS). *Clin Exp Hypertens*. 2010;32(8):491-8.
30. Zhu L, Yau LF, Lu JG, Zhu GY, Wang JR, Han QB. et al. Cytotoxic dehydromonacolins from red yeast rice. *J Agric Food Chem*. 2012;60(4):934-9.
31. Hong MY, Henning S, Moro A, Seeram NP, Zhang Y, Heber D. Chinese red yeast rice inhibition of prostate tumor growth in SCID mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(4):608-15.
32. Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, Heber D. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2008;19(7):448-58.
33. Cho YE, Alcantara E, Kumaran S, Son KH, Sohn HY, Lee JH. et al. Red yeast rice stimulates osteoblast proliferation and increases alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells. *Nutr Res*. 2010;30(7):501-10.
34. Wong RW, Rabie B. Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*-fermented rice) promotes bone formation. *Chin Med*. 2008;3:4.
35. Lin JS. An alternative treatment of hyperlipidemia with red yeast rice: a case report. *J Med Case Reports*. 2010;4:4.
36. Gordon RY, Becker DJ. The role of red yeast rice for the physician. *Curr Atheroscler Rep*. 2011;13(1):73-80.
37. Gordon RY, Cooperman T, Obermeyer W, Becker DJ. Marked variability of monacolin levels in commercial red yeast rice products. *Arch Intern Med*. 2010;170:1722-7.
38. Eckel RH. Approach to the patient who is intolerant of statin therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2015-22.
39. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to monacolin K from red yeast rice and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID1648,1700) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011; 9(7):2304. www.efsa.europa.eu/efsajournal
40. Roselle H, Ekatan A, Tzeng J, Sapienza M, Kocher J. Symptomatic hepatitis associated with the use of herbal red yeast rice. *Ann Intern Med*. 2008;149(7):516-7.
41. Lapi F, Gallo E, Bernasconi S, Vietri M, Menniti-Ippolito F, Raschetti R. et al. Myopathies associated with red yeast rice and liquorice: spontaneous reports from the Italian Surveillance System of Natural Health Products. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66(4):572-4.
42. Mueller PS. Symptomatic myopathy due to red yeast rice. *Ann Intern Med*. 2006;145(6):474-5.
43. Wigger-Alberti W, Bauer A, Hippler UC, Elsner P. Anaphylaxis due to *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice). *Allergy*. 1999;54(12):1330-1.

44. SoRelle R. Appeals Court says Food and Drug Administration can regulate Cholestin. Circulation. 2000;102(7):E9012-3. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet. 2004;364(9438):937-52.
45. Xu B, Jia X, Gu L, Sung C. Reviewe on the qualitative and quantitative analysis of mycotoxin citrinin. Food Control 2006; 17:271-85.
46. Heber D, Lembertas A, Lu QY, Bowrman S, Go VL. An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: implications of variability in chemical profile and contents J Altern Complement Med 2001;7(2):133-9.

Red yeast in pharmaceutical practice

Maja Nikolić

University of Niš - School of medicine, Bulevar dr Zorana Đindića 81,
18000 Niš, Serbia

Summary

A long-term treatment of patients with acute coronary syndrome is necessary in order to prevent new cardiac events to come into being. It presupposes life style change, modification of risk factors, healthy diet, dietary supplements, as well as medications for second prevention. Extracts of Chinese red yeast rice, a traditional dietary seasoning of *Monascus purpureus* contains several active ingredients including lovastatin and several trials of its possible lipid-lowering effects have been conducted. This paper aimed to present recent data, taken up from the relevant sources related to the beneficial effects of red yeast rice, especially on cardiovascular disease.

Key words: red yeast rice, cardiovascular disease, dietary supplements

Stereohemijski aspekti dejstva i farmakokinetike lekova

Slavica Erić¹, Marko Kalinić¹, Vladimir Savić^{2*}

¹ Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za organsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

* Autor za korespondenciju: e-mail: vladimir.savic@pharmacy.bg.ac.rs
telefon: +381 (0)11 3951-243 fax: +381 (0)11 3972-840

Kratak sadržaj

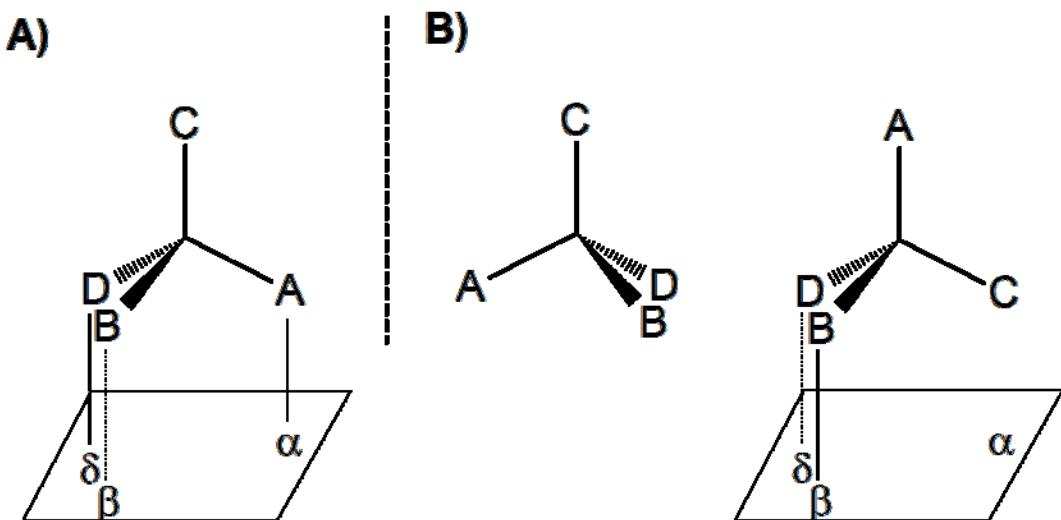
Dejstvo i sudsina leka u organizmu zavise od hiralnosti samih lekova kao i endogenih makromolekula sa kojima stupaju u interakciju. Razmatranje stereohemijskih aspekata dejstva i farmakokinetike lekova intenzivirano je početkom 80-tih godina prošlog veka i doprinelo je opsežnom dokumentovanju značajnih razlika između stereoizomernih oblika jednog leka. Enantiomeri tako mogu posedovati različitu efikasnost, mogu ispoljavati drugačije farmakološke i toksikološke efekte i sledstveno mogu imati različite bezbednosne profile. Sve veći broj dokaza o važnosti stereohemije, podsticaji regulatornih agencija, razvoj metoda asimetrične sinteze i analitike – doveli su do suštinskih promena u načinu na koji se novi hiralični lekovi razvijaju, ispituju, registruju i tržišno plasiraju. Enantiomere je danas neophodno tretirati kao zasebne entitete i zasebno ih ispitivati. Razvoj enantiomerno čistih formulacija lekova može omogućiti smanjenje ukupne količine ksenobiotika kojoj se pacijent izlaže, omogućiti precizniju procenu odnosa doze i efekta, pojednostaviti farmakokinetička ispitivanja i terapijski monitoring. Stoga je stereohemijske osobine biološki aktivnih jedinjenja neophodno razmatrati od najranijih faza procesa stvaranja novog leka da bi se blagovremeno napravio racionalan izbor jednog enantiomera za terapijsku primenu, kad god je to opravdano.

Ključne reči: enantiomeri; razvoj lekova; hiralnost

1. Uvod

Osnovne gradivne jedinice živog sveta – aminokiseline, ugljeni hidrati, proteini i nukleinske kiseline – predstavljaju hiralne molekule. U prirodi se ova jedinjenja dominantno javljaju u vidu jednog enantiomera, pri čemu se smatra da homohiralnost jeste inherentno svojstvo hemije živog sveta (1,2). Kako biološki sistemi, dakle, predstavljaju hiralna okruženja, enantiomeri jednog jedinjenja mogu ispoljavati različite biološke efekte. Tako je samo 30 godina nakon Pasterovog razdvajanja enantiomera vinske kiseline, Pruitt dokumentovao prvi primer ovog fenomena, utvrdivši da (+)-asparagin poseduje sladak, a (-)-asparagin neutralan ukus (3).

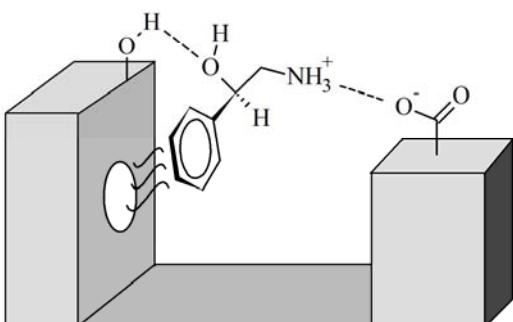
Opšte objašnjenje razlike u biološkoj aktivnosti enantiomera ponudili su Easson i Steadman 1933. godine, kroz „princip interakcije u tri tačke“ između enantiomera i njegovog receptorskog mesta. Uvezši da je molekulu u prostoru moguće najjednostavnije topološki prikazati kao tetraedarski sistem, razlika u afinitetu vezivanja enantiomera za asimetričnu površinu receptora proizilazi iz razlike u broju mogućih interakcija koje se obrazuju (Slika 1.).



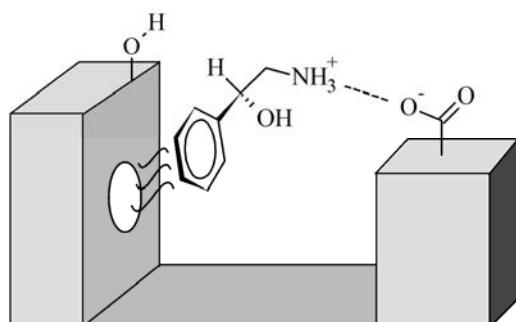
Slika 1. Ilustracija Easson-Steadman-ovog principa „interakcije u tri tačke“
Figure 1. An illustration of the Easson-Steadman's „three-point interaction“ principle

Pod pretpostavkom da je interakcija u sve tri tačke (α -A, β -B, δ -D) od značaja za vezivanje, enantiomer prikazan pod A) poseduje veći afinitet za receptor (eutomer) od suprotnog enantiomera prikazanog pod B), koji može obrazovati interakcije samo sa dve tačke na receptorskoj površini (distomer). Easson-Stedman-ov i slični, noviji modeli (4), ukazuju na činjenicu da hiralnost leka – kao jedinjenja čije je ciljno mesta dejstva najčešće hiralna makromolekula – može usloviti postojanje značajne razlike u efektima njegovih različitih enantiomernih oblika. Raspored funkcionalnih grupa u enantiomerima utiče na oblik molekule i odražava se na mogućnost pristupa leka ciljnog mestu dejstva i na njegovu interakciju sa funkcionalnim grupama u sastavu receptora ili enzima. Kao što je ilustrovano na Slici 2 (5), hipotetički receptor, koji u svom vezivnom mestu sadrži dve aminokiseline, sa visokim afinitetom može prepoznati samo eutomer.

A)



B)



Slika 2. Ilustracija interakcije između hipotetičkog receptorskog mesta i enantiomernog para. Enantiomer prikazan pod A) predstavlja eutomer i obrazuje tri interakcije sa aminokiselinskim reziduama aktivnog mesta. Pod B) je prikazan distomer koji sa receptorom interaguje sa manjim afinitetom usled prevelike udaljenosti alkoholne grupe liganda od odgovarajuće rezidue u strukturi receptora.
Prilagodeno iz reference (5).

Figure 2. Illustration of an interaction between a hypothetical receptor site and an enantiomer pair. Enantiomer shown under A) is the eutomer capable of forming three interactions with amino acid residues of the active site. Distomer, shown under B), interacts with the receptor with lesser affinity due to a large distance between the hydroxyl group of the ligand and the corresponding residue.
Adapted from (5).

Eutomer, nakon uklapanja u geometrijski precizno aktivno mesto, stupa u interakcije sa odgovarajućim aminokiselinskim reziduama, pri čemu je jačina interakcija uslovljena optimalnim rastojanjem između rezidua i funkcionalnih grupa eutomera. Distomer, usled različitog oblika molekule i rasporeda funkcionalnih grupa, neće aktivirati taj hipotetički receptor što, međutim, ne isključuje njegovu interakciju sa

drugim ciljnim mestom, sa kojim postiže bolje uklapanje i jače interakcije sa odgovarajućim reziduama aktivnog mesta. U tom slučaju, distomer postaje eutomer – sa drugaćijim farmakološkim odnosno toksikološkim efektom, što ukazuje na relativnu prirodu ovih pojmoveva koja zavisi od ciljne makromolekule koja se razmatra (princip leve i desne šake i rukavice).

Iako dobro dokumentovane i mehanistički razjašnjene, ove činjenice dugo su bile zanemarivan aspekt farmakologije i farmakokinetike terapijski korišćenih hiralnih lekova (6). Sa izuzetkom prirodnih proizvoda koji su izolovani kao čisti enantiomeri, većina hiralnih lekova je bila nekritički upotrebljavana u obliku racemata, čak i kada je bilo poznato da je za aktivnost odgovoran samo jedan stereoizomer. Slično, farmakokinetička ispitivanja lekova su većinom sprovedena uz razmatranje samo ukupnih koncentracija leka, bez razlikovanja enantiomernih oblika. Napredak u razumevanju uticaja stereohemije na dejstvo i sudbinu lekova u organizmu, razvoj metoda asimetrične sinteze, odgovarajućih analitičkih metoda, kao i komercijalni i regulatorni razlozi, doprineli su, međutim, izraženom interesovanju za razvoj i upotrebu enantiomerno čistih oblika lekova, što predstavlja trend u savremenoj farmaceutskoj industriji (7).

2. Uticaj stereohemije na dejstvo i sudbinu lekova u organizmu

2.1. Uticaj stereohemije na dejstvo lekova

U pogledu razlika u farmakološkoj aktivnosti dva enantiomerna oblika leka, moguće je izdvojiti nekoliko opštih slučajeva za koje je u literaturi dokumentovan veći broj primera (8,9):

- oba enantiomerna oblika leka mogu biti podjednako aktivna (ekvipotentna);
- enantiomeri mogu ispoljavati kvalitativno iste efekte, ali se njihova potentnost može razlikovati do mere u kojoj je samo jedan enantiomer dominantno odgovoran za farmakološke efekte;
- oba enantiomera mogu posedovati izvesnu farmakološku aktivnost, ali se priroda njihovih efekata kvalitativno može značajno razlikovati, uključujući i mogućnost da efekti ispoljavaju preko različitih ciljnih mesta dejstva;
- efekti racemata mogu biti drugačiji od efekata koje je moguće predvideti na osnovu osobina bilo kog od enantiomera, primjenjenog pojedinačno.

Primeri ekvipotentnosti enantiomera jednog leka relativno su retki i obuhvataju pojedine antiaritmike (npr. flekainid), alkilirajuće agense (ciklofosfamid), antimalarike (meflohin) kao i psihotropne lekove kao što je fluoksetin (9,10). Fluoksetin, međutim, predstavlja primer da ekvipotentnost enantiomera na nivou ciljnog mesta dejstva ne znači da će i ukupni efekti ova dva enantiomera u organizmu biti identični. Naime, iako

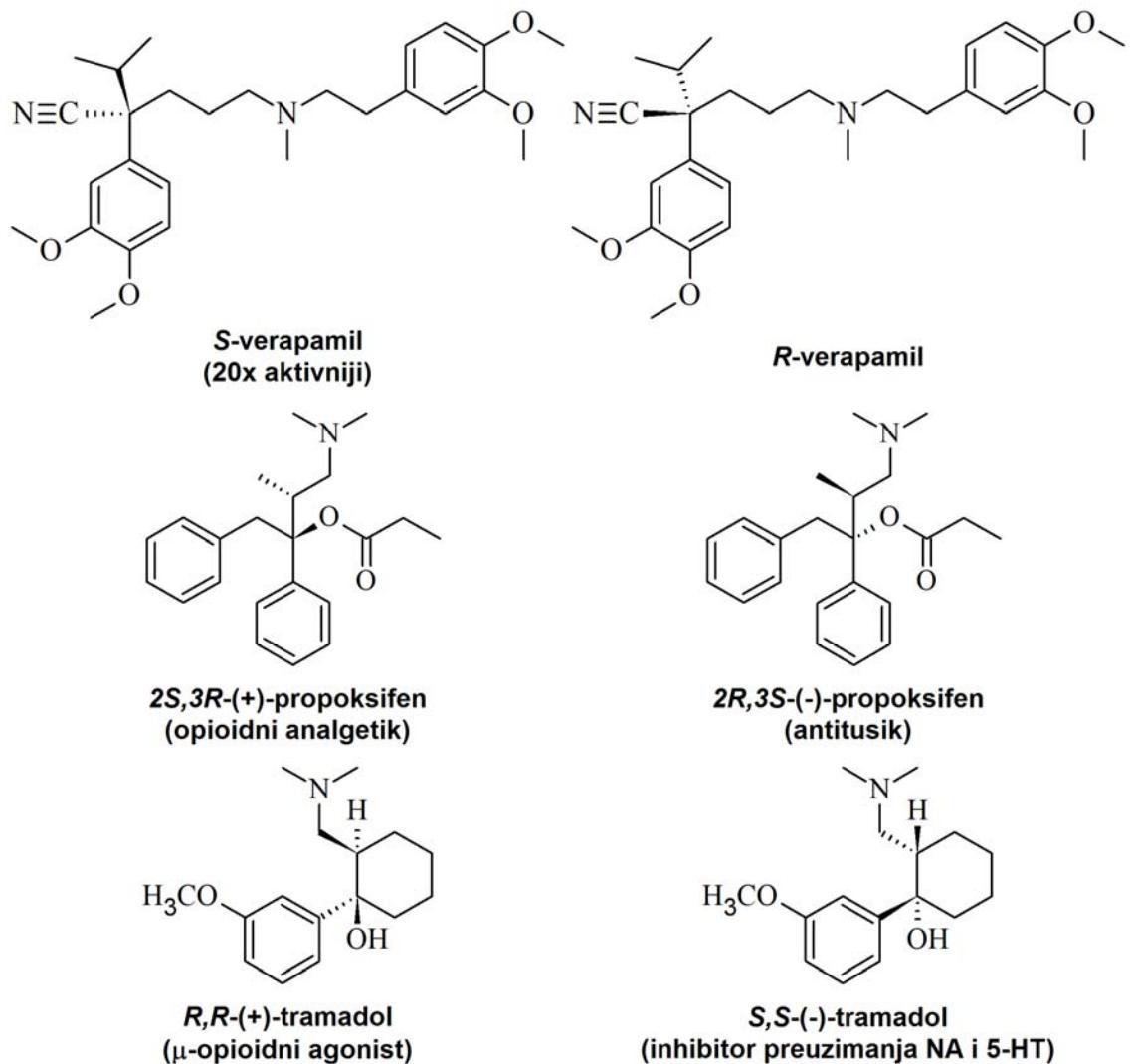
R- i *S*-fluoksetin podjednako efikasno inhibiraju preuzimanje serotoninina, enantiomerni oblici norfluoksetina, kao aktivnog metabolita fluoksetina, razlikuju se oko 20 puta po svojoj aktivnosti (11). Čak i u slučaju ekvipotentnosti enantiomera, dakle, neophodno je razmotriti celokupan farmakološki i farmakokinetički profil leka, imajući u vidu i uticaj stereohemije na farmakokinetiku, što je detaljnije opisano u odeljku 2.2.

Daleko češće, enantiomeri međusobno pokazuju kvantitativne razlike u farmakološkoj aktivnosti. U slučaju verapamila, blokatora kalcijumovih kanala, *S*-enantiomer je oko 20 puta efikasniji negativni dromotropni agens od *R*-enantiomera. Ova razlika je kod većine beta-adrenergičkih antagonistika izražena u toj meri da je za efekte na nivou β -adrenergičkih receptora odgovoran gotovo isključivo *S*-enantiomer, sa aktivnošću oko 100 puta većom od *R*-stereoizomera, koji se posmatra kao neaktivan oblik leka (9). U takvim slučajevima, primena racemata može doprineti neželjenim efektima leka. Primera radi, *R*-propranolol doprinosi histaminoliberatornim neželjenim efektima racemata propranolola iako ne doprinosi antihipertenzivnoj aktivnosti (6). Dodatno, čak i kada neaktivni enantiomer ne utiče nepovoljno na bezbednosni profil leka, primena racemata može biti zabrinjavajuća sa aspekta dospeća veće količine kontaminanata u životnu sredinu (7).

Najizraženije razlike u dejstvu enantiomera prisutne su u slučajevima kada oni ostvaruju kvalitativno različite farmakološke efekte. Tako je (+)-propoksifen jak analgetik, dok je (-)-propoksifen efikasan centralno-delujući antitusik bez analgetičkih efekata. U pojedinim slučajevima, jedan enantiomer ispoljava željene terapijske efekte, dok je drugi odgovoran za neželjena i toksična dejstva. *S,S*-etambutol predstavlja tuberkulostatik, dok njegov enantiomer, *R,R*-etambutol izaziva optički neuritis. U drugim slučajevima, međutim, razlike u dejstvu dva enantiomera mogu povoljno uticati na farmakološki profil racemata. *R,R*-(+)-tramadol je slab agonista μ -opioidnih receptora čijim metaboličkim O-demetilovanjem nastaje *R,R*-desmetiltramadol, koji takođe deluje kao opioidni agonist. S druge strane, *S,S*-(−)-tramadol deluje kao inhibitor preuzimanja noradrenalina i serotoninina, a nema afinitet za opioidne receptore. Analgetički efekat racemata izražen je zahvaljujući sinergizmu između njegove opioidne komponente, za koju je odgovoran prevashodno desnogiri enantiomer, i neopioidne, monoaminergičke komponente, čiji je nosilac prevashodno levogiri enantiomer tramadola (12–14). Strukture nekih od navedenih enantiomernih parova, sa opisanim razlikama u aktivnosti, prikazane su na Slici 3.

Racemat, dakle, može ispoljavati efekte koji su kvalitativno i/ili kvantitativno drugačiji od onih koji bi bili očekivani na osnovu efekata enantiomera pojedinačno (8). (*R/S*)-propafenon koristi se kao antiaritmik za čije je efekte odgovorna blokada natrijumovih kanala. *S*-propafenon, dodatno, deluje i kao antagonista beta-adrenergičkih receptora. Blokada ovih receptora je, međutim, izraženija prilikom primene racemata, nego prilikom primene ekvivalentne doze samog *S*-propafenona. Naime, *R*-propafenon

utiće na usporenu eliminaciju *S*-enantiomera i time potencira efekte racemata na beta-adrenergičke receptore. Ovaj primer ukazuje na to da farmakološke efekte racemata nije moguće aproksimirati na osnovu poznavanja efekata pojedinačnih enantiomera (15).



Slika 3. Primeri lekova čiji enantiomeri pokazuju različit stepen ili prirodu farmakološke aktivnosti.

Figure 3. Examples of enantiomeric drugs with differing level or nature of pharmacological activity.

2.2. Uticaj stereohemijskih osobina na farmakokinetiku lekova

2.2.1. Resorpcija

Za većinu lekova, resorpcija iz gastrointestinalnog trakta predstavlja pasivan proces koji zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika samog leka i osobina primjenjenog farmaceutskog oblika. Uticaj stereohemije na brzinu i stepen resorpcije je, stoga, slabo izražen i mali je broj dokumentovanih primera razlike u procesu resorpcije između enantiomernih oblika leka (16). Ipak, ukoliko je u proces resorpcije uključen određeni transporter, javlja se mogućnost postojanja stereoselektivnih interakcija usled čega razlika između enantiomera može biti izraženija.

P-glikoprotein, kao efluksni transporter eksprimiran na apikalnoj površini enterocita, može ograničiti resorpciju lekova koji predstavljaju njegove supstrate. Enantioselektivna inhibicija P-glikoproteina dokumentovana je u slučaju meflochina, pri čemu njegov levogiri stereoizomer može smanjiti aktivnost P-glikoproteina i time uticati na povećanu biološku raspoloživost tipičnih supstrata ovog transportera. Zabeleženi su primeri stereohemijskog efekta na regulaciju ekspresije P-glikoproteina – *R*-cetirizin povećava ekspresiju P-glikoproteina, dok je *S*-cetirizin smanjuje – što se takođe može odraziti na resorpciju drugih, istovremeno primjenjenih lekova (17).

Uopšteno, međutim, stereoselektivnost intestinalne resorpcije nije ubičajen fenomen i uticaj stereohemije najmanje je izražen u ovom delu farmakokinetičkog profila većine lekova.

2.2.2. Raspodela

Značajan faktor raspodele lekova u organizmu jeste stepen njihovog vezivanja za proteine plazme i tkiva. Stereoselektivnost vezivanja za proteine plazme je opsežno proučavan fenomen, pa je tako poznat niz primera enantioselektivnog vezivanja za humani serumski albumin, alfa₁-kiseli glikoprotein kao i serumske lipoproteine (18,19). U Tabeli I prikazani su neki od primera lekova koji enantioselektivno interaguju sa proteinima plazme. Kako je samo slobodna frakcija leka farmakološki aktivna i podleže metaboličkim transformacijama i izlučivanju, enantioselektivnost u vezivanju za proteine plazme može se odraziti na dejstvo i eliminaciju lekova. Ova činjenica naglašava značaj upotrebe analitičkih metoda koje razlikuju enantiomerne strukture u praćenju koncentracije lekova u biološkim materijalima, što je od posebnog značaja kada je reč o enantiomerima koji nisu ekvipotentni (17).

Molekularna osnova enantioselektivnosti u vezivanju za proteine plazme je različita za različite lekove, pa može obuhvatiti: vezivanje oba enantiomera za isto vezivno mesto sa različitim afinitetom, vezivanje za dva različita vezivna mesta ili postojanje brojnih, slabije definisanih vezivnih mesta na proteinu (19). U zavisnosti od molekularne osnove ovog fenomena zavisi i opseg mogućnosti interakcije enantiomera

međusobno, kao i njihove interakcije sa drugim lekovima na nivou vezivanja za proteine plazme. Molekularna osnova enantioselektivnosti može diktirati i analitički pristup određivanju enantiomera u biološkom materijalu.

Tabela I Primeri lekova za koje je utvrđena enantioselektivnost u vezivanju za proteine plazme.
Prilagođeno iz reference (16).

Table I Example of drugs with established enantioselectivity in plasma protein binding. Adapted from reference (16).

Lek	Odnos slobodnih frakcija ¹
Bupivakain	1,5 (R:S)
Hlorohin	1,7 (R:S)
Dizopiramid	2,0 (R:S)
Etodolak	2,5 (S:R)
Tiamilal	1,61-1,76 (R:S)
Verapamil	1,3-2,0 (S:R)
Varfarin	1,3 (R:S)

¹ Predstavlja srednji odnos udela nevezanih frakcija enantiomera u plazmi; navedeni podaci se odnose na parametre utvrđene kod čoveka.

Pored enantioselektivnog vezivanja za proteine plazme, raspodela enantiomera može biti i pod uticajem njihovog selektivnog vezivanja za proteine tkiva (16), kao i stereoselektivnih interakcija sa transporterima eksprimiranim na krvno-moždanoj i sličnim barijerama koje ograničavaju raspodelu leka u posebne prostore organizma (17).

2.2.3. Metabolizam

Budući da uključuju formiranje kompleksa leka sa enzimima, reakcije biotransformacije učestalo pokazuju izvestan stepen stereoselektivnosti koji je veoma značajan u farmakokinetici većine hiralnih lekova i koji uslovjava ispoljavanje značajnih razlika u sudbini dva enantiomera.

Razlika u afinitetu enantiomera za metaboličke enzime može biti odgovorna za različite brzine njihove eliminacije. U Tabeli II prikazani su primeri značajnih razlika u kinetici metaboličkih reakcija između dva enantiomerna oblika pojedinih lekova. Pored izmenjene kinetike, afinitet enantiomera za metaboličke enzime može predstavljati i osnovu za postojanje potpuno zasebnih puteva biotransformacije.

Varfarin, klinički značajan antikoagulans, poseduje hiralični centar u položaju C(9) (Slika 4.) i terapijski se koristi kao racemat. R-varfarin, farmakološki manje aktivan enantiomer, dominantno metaboliše izoenzim CYP1A2, hidroksilacijom položaja C(6) i C(8) kumarinskog jezgra. S-varfarin, međutim, dominantno metaboliše izoenzim CYP2C9, hidroksilacijom položaja C(7). Regioselektivnost metabolizma varfarina razjašnjena je na molekularnom nivou proučavanjem kristalne strukture kompleksa

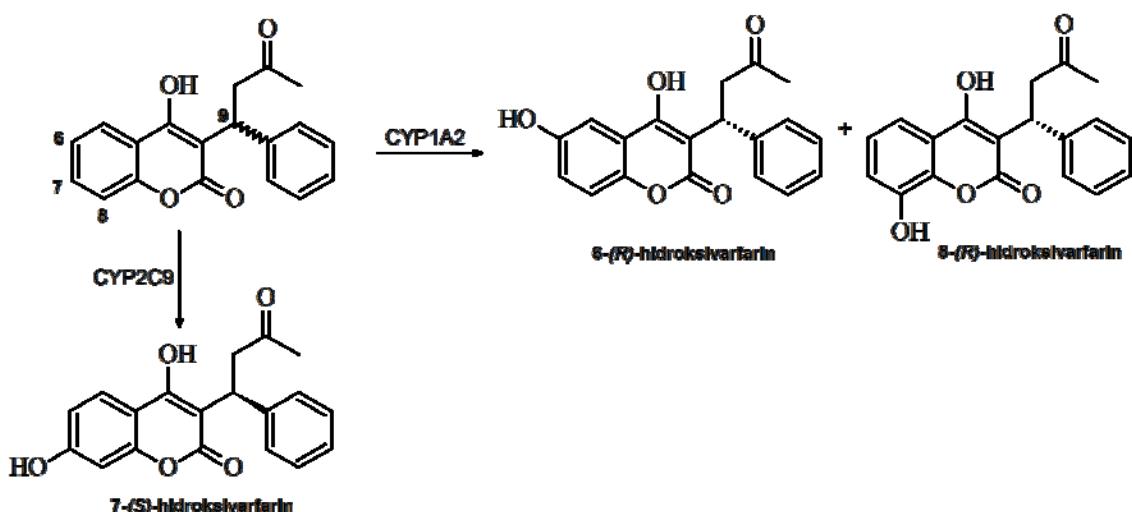
CYP2C9 i S-varfarina, kao i dokling studijama R-varfarina uz upotrebu strukture spomenutog kompleksa. Tako je utvrđeno da je priroda interakcije sa ovim enzimom posledica prevelike udaljenosti položaja C(7) R-varfarina od aktiviranog kiseonika u strukturi CYP2C9 (20).

Tabela II Primeri lekova za koje je utvrđena različita brzina metabolizma enantiomera. Prilagođeno iz reference (16).

Table II Example of drugs with established differences in metabolism rates of enantiomers. Adapted from reference (16).

Lek	Enzimi i metabolički put	Odnos Km vrednosti enantiomera ¹
Albuterol	Humana fenolsulfotransferaza (sulfonovanje)	0,10 (R:S)
Dizopiramid	Humani CYP3A4 (monodealkilovanje)	1,08 (R:S)
Felodipin	Izolovani humani mikrozomi (reakcije oksidacije)	2,00 (S:R)
Ifosfamid	Humani CYP3A4 (dechloroetilovanje)	0,56 (S:R)
Verapamil	Humani CYP2C8 (norverapamil)	0,82 (R:S)

¹ Prikazan je odnos *in vitro* eksperimentalno određenih srednjih vrednosti Mihelis-Mentenine konstante (Km) odgovarajućih reakcija



Slika 4. Šema oksidativnog metabolizma varfarina. Enantiomeri pokazuju različit afinitet za citohromalne enzime i daju različite glavne proizvode biotransformacije.

Figure 4. A schematic overview of warfarin's oxidative metabolism route. Enantiomers vary in affinity for cytochrome enzymes and yield different principal biotransformation products.

Dodatnom nivou složenosti proučavanja metabolizma hiralnih lekova doprinosi činjenica da stereohemija polaznog leka može biti izmenjena metaboličkim reakcijama, što se može odraziti na njegovo dejstvo, toksičnost i brzinu eliminacije. U takvim reakcijama može doći do nastanka ili eliminacije hiralnog centra u molekuli, ili pak inverzije konfiguracije na postojećem hiralnom atomu (21).

Reakcije redukcije nesimetričnih ketona predstavljaju najčešći vid prelaska prohiralnih supstrata u hiralne metabolite, pri čemu ovaj tip biotransformacije veoma često pokazuje enantioselektivnost, dajući alkohole S konfiguracije u udelu od 80% ili više. Ova metabolička transformacija može biti veoma značajna sa toksikološkog aspekta, jer na stereohemiju proizvoda reakcije, koji je potencijalni uzrok toksičnih efekata leka, nije moguće uticati na nivou supstrata, već je ona određena strukturom i funkcijom enzima uključenih u reakciju (21).

Prevodenje supstrata sa jednim hiralnim centrom u diastereoizomerne metabolite značajna je karakteristika većeg broja reakcija konjugacije sa endogenim hiralnim molekulama, kao što su glukuronska kiselina ili glutation. Enzimi uključeni u reakcije konjugacije mogu pokazivati enantioselektivnost, dok se diastereoizomerni proizvodi ovih reakcija mogu eliminisati različitim brzinama. Ova dva faktora zbirno mogu doprineti izraženim razlikama u izloženosti organizma enantiomerima, za šta je karprofen tipičan primer. Glukuronidacija S-enantiomera ovog leka favorizovana je enantioselektivnošću odgovarajuće transferaze, dok je istovremeno renalni klirens D-glukuronida dvostruko veći od klirensa njegovog epimera. Rezultat je višestruko brža eliminacija S-karprofena nasuprot njegovog R-enantiomera (21).

Još jedan značajan vid promene stereohemije leka u interakciji sa metaboličkim enzimima jeste „hiralna inverzija“. Metabolička inverzija konfiguracije hiralnog centra široko je proučavana u okviru grupe derivata 2-arylpropanske kiseline, koji se terapijski koriste kao nesteroidni antiinflamatorni lekovi, a prvo bitno je uočena u slučaju ibuprofena. Za *in vitro* farmakološke efekte ibuprofena odgovoran je prevashodno S-enantiomer. Razlika u dejstvu između enantiomera, međutim, značajno je manje izražena u *in vivo* uslovima, usled metaboličke inverzije hiralnosti R-ibuprofena, koji je slab inhibitor ciklooksigenaze. Mehanizam ove promene obuhvata stereoselektivno formiranje tioestra R-ibuprofena sa koenzimom A, uz dalju racemizaciju i hidrolizu nastalog proizvoda, čime se oslobađa aktivni S-ibuprofen (21,22).

2.2.4. Izlučivanje

Stereoselektivnost renalnog i bilijarnog izlučivanja lekova može biti posledica selektivnosti u interakciji enantiomera sa transporterima uključenim u procese aktivnog izlučivanja, ali može predstavljati i rezultat stereoselektivnosti nekog od prethodno opisanih farmakokinetičkih procesa (enantioselektivno vezivanje za proteine plazme ili metabolizam). Primera radi, glomerularna filtracija i pasivna tubularna reapsorpcija, kao

nestereoselektivni procesi, jesu značajne odrednice klirensa pojedinih lekova. Izlučivanje takvih lekova, iako mehanistički nestereoselektivno, ipak može imati karakteristike enantioselektivnog procesa ukoliko postoje značajne razlike u stepenu vezivanja dva enantiomera za proteine plazme, imajući u vidu da je samo nevezana frakcija leka ona koja prelazi u glomerularni filtrat (23).

Kod drugih lekova, međutim, brzina izlučivanja može biti prevashodno uslovljena aktivnošću transportera eksprimiranih na površini kanalikularnih ćelija hepatocita odnosno tubularnih ćelija bubrega, kao što su P-glikoprotein i transporteri organskih anjona i katjona. Za neke od ovih transportera postoje dokazi o stereoselektivnosti u interakciji sa lekovima i njihovim metabolitima, što je već opisano za P-glikoprotein u odeljku 2.2.1. Enantioselektivan transport verapamila, propranolola, atenolola, pseudoefedrina, hinina/hinidina, kao i enantioselektivna inhibicija dizopiramidom utvrđena je i u slučaju humanog transportera organskih katjona (hOCT1) (24), koji ima značajnu ulogu u aktivnoj sekreciji lekova u bubrežima.

Eksperimentalno potvrđivanje enantioselektivnosti procesa izlučivanja je otežano usled činjenice da se praćenjem enantiomera u urinu ili žuči ne stiče uvid u mehanizam samog procesa, već razlike u izmerenim koncentracijama mogu biti posledica već spomenutih razlika u farmakokinetičkim procesima koji prethode izlučivanju (16). Ova činjenica doprinela je tome da je identifikovan relativno mali broj lekova kod kojih stereohemija ključno utiče na izlučivanje, među kojima su cetirizin, feksofenadin, hinin/hinidin i karbenicilin, čija je tubularna sekrecija stereoselektivna; odnosno ketoprofen, koji podleže enantioselektivnom izlučivanju putem žuči (23,25,26).

2.2.5. Toksičnost

Prepoznavanje uticaja stereohemije na toksičnost lekova može biti od suštinskog značaja u proceni bezbednosnog profila pojedinačnih enantiomera, odnosno racemata. U nekim slučajevima, toksični efekti su svojstveni samo jednom od enantiomera, pri čemu on može istovremeno biti i nosilac terapijskih efekata, dok u drugim slučajevima oba enantiomera mogu posedovati slične toksikološke karakteristike (27).

Terodilin je terapijski korišćen kao racemat kod urinarne inkontinencije, ali je povučen sa tržišta zbog neželjenih efekata na produženje QT intervala i razvoj srčanih aritmija. Ispitivanja su pokazala da je za efekte na mokraćnu bešiku odgovoran prevashodno *R*-(+)-terodilin ali da je ovaj enantiomer istovremeno i nosilac aritmogenog potencijala racemske smeše. Terodilin tako predstavlja primer leka gde su i toksični i terapijski efekti svojstveni jednom od enantiomera, što onemogućava poboljšanje bezbednosnog profila leka kroz upotrebu enantiomerno čiste formulacije (8).

Talidomid predstavlja sličan primer. Iako su rezultati studija teratogenosti u određenoj meri oprečni, smatralo se da je za terapijske, sedativne efekte talidomida

odgovoran *R*-(+)-talidomid, dok su teratogeni efekti pripisivani *S*-(–)-enantiomeru. Ovo je navelo pojedine autore da zaključe kako bi talidomidska katastrofa bila izbegnuta da je terapijski korišćen samo *R*-(+)-enantiomer. Međutim, za talidomid je naknadno utvrđeno da u humanom organizmu brzo podleže hiralnoj inverziji, te da bi primena formulacije *R*-(+)-talidomida rezultovala izloženosti fetusa i drugom enantiomeru. U ovom slučaju, čak iako je toksičnost ograničena na jedan enantiomer, *in vivo* hiralna inverzija za posledicu ima slične bezbednosne profile racemske smeše i hiralno čiste formulacije (17).

Citalopram je klinički važan antidepresiv čiji je *S*-(+)-stereoizomer preko 100 puta efikasniji inhibitor preuzimanja serotonina u odnosu na suprotni enantiomer. Jedan od neželjenih efekata citaloprama jeste i produženje QT intervala za koje je odgovoran didemetilcitalopram (DDMC), kao sporedni metabolit ovog leka koji se u slučaju predoziranja može akumulirati u organizmu. Pojedine studije su pokazale da je nosilac kardiotoksičnosti prevashodno *R*-(–)-DDMC što, zajedno sa zanemarljivom aktivnošću *R*-(–)-citaloprama, ukazuje na potencijal za značajno unapređenje bezbednosnog profila leka kroz razvoj formulacije samog *S*-enantiomera (27). Escitalopram (*S*-(+)-citalopram) je danas komercijalno dostupan, a njegove prednosti nad citalopramom su i klinički potvrđene (28).

2.2.6. Značaj upotrebe analitičkih metoda koje razlikuju enantiomere u farmakokinetičkim ispitivanjima

Iz opisanih razlika u sudbini enantiomera u organizmu, jasno je da merenjem ukupnih koncentracija leka u uzorcima biološkog materijala nije moguće dobiti kompletan uvid u farmakokinetički profil leka, posebno ne sa aspekta razmatranja odnosa doze i efekta (17). Ova činjenica je danas u velikoj meri prihvaćena i farmakokinetička ispitivanja novih hiralnih lekova koncipiraju se tako da se enantiomeri tretiraju kao zasebni hemijski entiteti i tako određuju. Klinička ispitivanja se izvode korišćenjem selektivnih testova čak i kada pretklinička ispitivanja na laboratorijskim životinjama ukazuju na nestereoselektivnu farmakokinetiku leka, budući da su razlike u efektima između vrsta dobro dokumentovane u slučaju više lekova i čine ekstrapolaciju sa životinja na čoveka neopravdanom (16).

Područje u kojem postoji manje izražen konsenzus jeste upotreba stereoselektivnih metoda u farmakokinetičkim ispitivanjima biološke ekvivalencije preparata racemata (29). Regulatorne agencije za sada ne zahtevaju sprovođenje stereoselektivnih ispitivanja prilikom podnošenja zahteva za registraciju novih preparata na osnovu biološke ekvivalentnosti sa postojećim. Ipak, više autora ukazuje na značaj primene takvih ispitivanja u slučaju lekova sa izraženo enantioselektivnom farmakokinetikom, posebno u delu presistemskog metabolizma (30). S obzirom da izbor formulacije utiče na oslobođanje leka, u slučaju kada eutomer i distomer pokazuju

značajne razlike u presistemskom metabolizmu i ukupna izloženost organizma svakom od enantiomera može biti značajno izmenjena. U tom slučaju, ekvivalentnost formulacija, koja konačno podrazumeva ekvivalentnost efekata na osnovu izmerenih farmakokinetičkih parametara, ne može biti izvesna na osnovu merenja ukupnih koncentracija leka.

3. Analitičke metode za razdvajanje i određivanje enantiomera

Analiza hiralnih lekova i njihovih metabolita treba da obezbedi pouzdanu kvantifikaciju svakog od enantiomera u ispitivanim uzorcima. U zavisnosti od ispitivanja i samog leka, analiti su u uzorcima ponekad prisutni u veoma niskim koncentracijama (reda veličine pg/mL), što često predstavlja dodatan izazov u razvoju i validaciji odgovarajuće enantioselektivne metode. Uopšteno, mogu se izdvojiti dva glavna pristupa farmaceutskoj analizi hiralnih lekova (31):

- separacionom metodom (dominantno hromatografski ili elektroforetski) enantiomeri se razdvajaju a za njihovu kvantifikaciju koriste se detektori koji sami po sebi ne omogućavaju razlikovanje enantiomera;
- bez prethodne separacije, enantiomeri se selektivno identifikuju i određuju upotrebom specifičnih elektrohemijskih senzora i biosenzora, ili primenom NMR spektroskopije pod posebnim uslovima.

U slučaju prvog pristupa, razdvajanje enantiomera moguće je obezrediti (32):

- derivatizacijom analita pomoću odgovarajućeg hiralnog agensa uz formiranje diastereoizomernih derivata koje je moguće razdvojiti na osnovu različitih fizičkohemijских osobina;
- primenom hiralnih kolona sposobnih da razdvoje analizirane enantiomere;
- retko, dodatkom hiralnog aditiva mobilnoj fazi.

Derivatizacione hromatografske tehnike nekada su bile važan deo analitike hiralnih jedinjenja, ali se danas znatno manje koriste usled ekspanzije hiralnih stacionarnih faza. Od hromatografskih i elektroforetskih tehnika koje se nalaze u rutinskoj primeni najznačajnije su: visoko-efikasna tečna hromatografija (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC), gasna hromatografija (engl. *gas chromatography*, GC), kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*, CE) i kapilarna elektro-hromatografija (engl. *capillary electro-chromatography*, CEC). Ovi sistemi su najčešće spregnuti sa veoma osetljivim detektorima (maseni spektrometar ili tandem MS) što omogućava kvantifikaciju niskih koncentracija analita. Enantioselektivnost metode obezbeđuje separacioni deo sistema koji počiva na korišćenju odgovarajućih hiralnih agenasa koji enantioselektivno interaguju sa analitima i uslovjavaju njihovu različitu retenciju u stacionarnoj fazi. Hiralne stacionarne faze obuhvataju (31):

- prirodne polimere, kao što su proteini (α_1 -kiseli glikoprotein, avidin, himotropsin), oligosaharidi (ciklodekstrini, maltodekstrini) i polisaharidi;
- polusintetske polimere, većinom derivatizovane oligo- i polisaharide;
- sintetske hiralne stacionarne faze (Pirkle kolone, paliakrilamidi, poliakrilati, krunski etri).

Iako najviše korišćene, hromatografske metode analize enantiomera imaju više nedostataka (npr. mala razlika u stabilnosti između kompleksa dva enantiomera i stacionarne faze, zametna priprema uzorka itd.) i ne predstavljaju uvek najbolji analitički izbor.

Kao alternativni pristup, danas je na raspolaganju veći broj metoda koje počivaju na upotrebi elektrohemijskih senzora ili biosenzora koji registruju enantioselektivno vezivanje analita za supstancu specifične strukture ili pak enantioselektivnu katalizu od strane izabranog enzima (31). U osnovi ovih metoda je prepoznavanje tipa „ključ i brava” između posebno dizajnirane hiralne komponente senzora i jednog od enantiomera. Ta hiralna supstanca može biti posebno hemijski modifikovan polimer (imitira receptor sa takvim rasporedom funkcionalnih grupa da omogućava vezivanje samo jednog enantiomera) ili pak antitelo, odnosno, može se raditi o enzimu koji selektivno katalizuje transformaciju samo jednog od enantiomera. Prednosti ovog pristupa, iako je on još uvek slabo rasprostranjen, mogu biti brojne, a ogledaju se u jednostavnijoj, bržoj i pouzdanoj analitici hiralnih jedinjenja (31).

Konačno, veoma važno mesto u analitici hiralnih jedinjenja zauzima nuklearna magnetna rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR). Slično spektroskopskim metodama koje se koriste u sprezi sa hromatografijom, NMR sama po sebi ne omogućava razlikovanje enantiomera jer su rezonance jezgara stereogenog centra dva enantiomera izohrone. NMR spektri diastereoizomera, međutim, nisu istovetni što otvara mogućnost upotrebe hiralnih derivatizacionih agenasa za prevođenje enantiomera u smeš odgovarajućih diastereoizomera čije je signale moguće razlikovati i integracijom kvantifikovati (33).

Pomoći reagensi koji se koriste u NMR spektroskopiji enantiomera mogu se podeliti u tri velike grupe: hiralne derivatizacione agense, hiralne rastvarače i hiralne reagense hemijskog pomeranja. Derivatizacioni agensi sa analitima formiraju kovalentne veze, pri čemu je preduslov za njihovu primenu u kvantitativnoj analizi da reakciju ne karakteriše racemizacija proizvoda, kako bi ideo nastalih diastereoizomera odgovarao enantiomernoj čistoći polaznog uzorka. Hiralni rastvarači stupaju u nekovalentne interakcije sa enantiomerima pri čemu pomeranje spektara može biti posledica formiranja diastereoizomernih kompleksa ili rezultat različitog afiniteta enantiomera za odabrani hirálni rastvarač. Kao reagensi hemijskog pomeranja, u NMR spektroskopiji najviše se koriste kompleksna jedinjenja lantanida, prevashodno

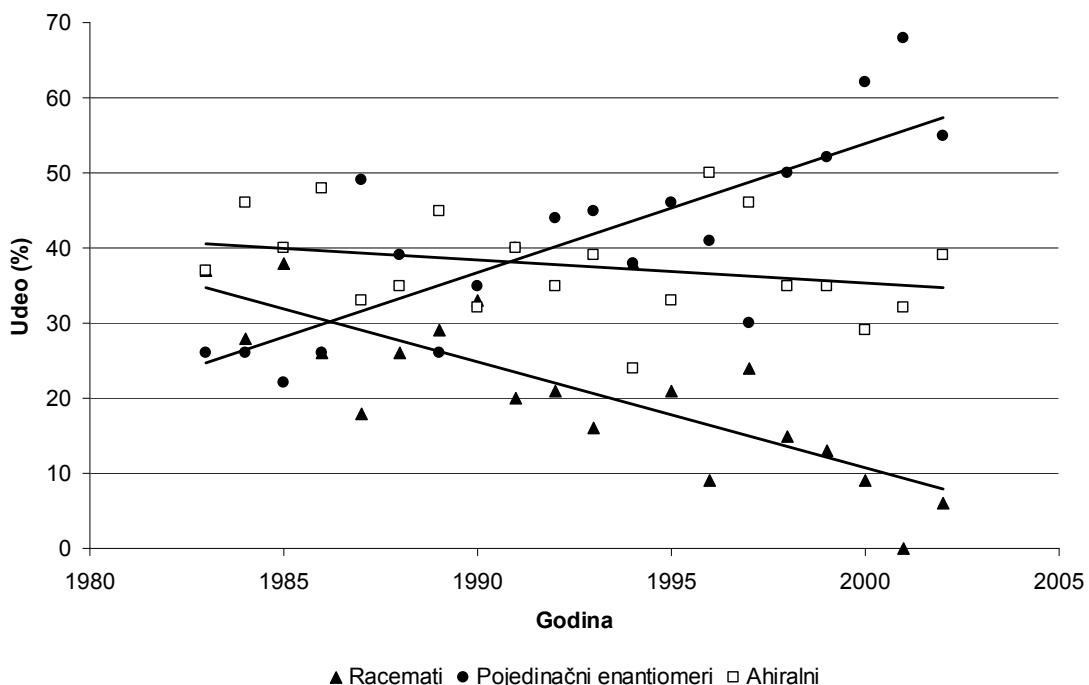
europijuma (III). Dodatak optički aktivnih jedinjenja ovog tipa uslovljava pomeranje signala i omogućava razlikovanje enantiomera, pri čemu se ova grupa pomoćnih reagenasa posebno izdvaja po svojoj širokoj primenjivosti i prilagodljivosti (34,35). Savremeni trend u NMR spektroskopiji hiralnih jedinjenja podrazumeva upotrebu hiralnih tečnih kristala kao agenasa za razlikovanje enantiomera, pri čemu se očekuje da će njihova primena imati sve veći značaj u budućnosti (35).

4. Položaj regulatornih agencija i trendovi razvoja hiralnih lekova

Do kasnih 80-tih godina 20. veka, zahtevi u pogledu dokumentovanja kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti novih hiralnih lekova nisu se suštinski razlikovali od zahteva za ahiralne lekove. Američka Uprava za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) je 1987. godine prvi put, u sklopu opših zahteva za dopunsku dokumentaciju u postupku registracije novih lekova, navela i neophodnost zasebne hemijske, toksikološke i farmakološke karakterizacije oba enantiomera hiralnih lekova, što je predstavljalo prvi korak u detaljnijoj regulaciji ove oblasti (36).

Konkretnе smernice za razvoj i registraciju novih hiralnih lekova FDA je usvojila 1992. godine (37), dok je analogna evropska regulativa stupila na snagu 1994. godine (38). Princip evropskih, FDA, kanadskih i japanskih zahteva za registraciju hiralnih lekova je sličan (39). Prema važećim smernicama, regulatorne agencije ne nameću razvoj enantiomerno čistih oblika lekova, niti eksplicitno obeshrabruju razvoj racemata, već je izbor prepušten samom podnosiocu zahteva za registraciju. Od njega se, međutim, zahteva da detaljno obrazloži izbor, razmatrajući odnos koristi i rizika, kao i da priloži dokumentaciju iz pretkliničkih i kliničkih ispitivanja o farmakološkim i farmakokinetičkim svojstvima svakog od enantiomera ponaosob, odnosno racemata. Toksikološka ispitivanja enantiomera obično nisu neophodna ukoliko racemska smeša pokazuje povoljan profil. Sve regulatorne agencije nalažu rani razvoj i validaciju enantioselektivnih analitičkih metoda za primenu na uzorcima iz *in vitro* i *in vivo* ispitivanja (36).

Razvoj metoda asimetrične sinteze, odgovarajućih analitičkih metoda, kao i šire prepoznavanje svih prednosti enantiomerno čistih oblika lekova doprinelo je ekspanziji u njihovom razvoju, posebno u oblasti kardiovaskularnih lekova i antiinfektiva (40). Ovaj trend je ilustrovan na Slici 5.



Slika 5. Dijagram udela ahiralnih lekova, enantiomerno čistih oblika i racemskih smeša hiralskih lekova u odobrenim registracijama na svetskom nivou. Podaci za period 1983-2002. (41)

Figure 5. Plot illustrating the share of achiral drugs, single enantiomer preparations and racemic chiral drugs, respectively, in newly approved registered therapeutics worldwide. Data gathered for the 1983-2002 time period. (41)

Primetno je da odnos ahiralnih i hiralskih jedinjenja u novoregistrovanim lekovima ne beleži značajnije promene u periodu od 20 godina, dok je jasno izražen značajan pad u udelu racemata nasuprot enantiomerno čistih oblika lekova. Pored napretka koji je učinio razvoj pojedinačnih enantiomera mogućim i jednostavnijim, opisana regulativa sa početka 1990-tih je verovatno takođe favorizovala interesovanje za njihovu terapijsku upotrebu (41). Iako registracija racemata ostaje kao mogućnost, pragmatičnost procesa razvoja novog leka većinom usmerava ka razvoju hiralno čistih oblika. Naime, razvoj racemata je opravдан samo onda kada hiralni centar lako podleže inverziji, kada enantiomeri imaju slične farmakološke i toksikološke profile i/ili kada je razvoj formulacije čistog enantiomera neopravdano skup. Kako, s druge strane, pojedinačni enantiomeri poseduju predvidljivije odnose doze i efekta, a često i brojne druge prednosti, dokumentovanje opravdanosti razvoja racemata retko je najpragmatičniji izbor.

5. Specifičnosti patentnog prava u oblasti hiralnih lekova

Veći broj inovativnih farmaceutskih kompanija pokazao je interesovanje da obezbedi produženje patentne zaštite svojih postojećih lekova, zaštićenih u obliku racemata, kroz strategiju označenu kao hiralni prelaz (engl. *chiral switch*). Hiralni prelaz podrazumeva podnošenje novog zahteva za patentnu zaštitu jednog od enantiomera prethodno registrovanog i patentno zaštićenog racemata (dodatni patent), čime se potencijalno smanjuje i do 30 meseci odlaže mogućnost da generičke kompanije pristupe razvoju sopstvenih preparata tog leka (42,43). Stoga ova strategija predstavlja značajnu mogućnost za produženje „životnog veka” i maksimizaciju finansijske dobiti od prethodno razvijenog racemata (44,45).

Iako postoje specifičnosti u zahtevima nadležnih organa u različitim zemljama, da bi pronalazak mogao da dobije patentnu zaštitu neophodno je da (46):

- bude *koristan*;
- bude *inovativan*, što podrazumeva da je potpuno nov, a ne sličan ili funkcionalno istovetan postojećem;
- bude *neočigledan*, što podrazumeva da se „ne može patentirati pronalazak, čak iako nije istovetan nekom prethodno opisanom, ukoliko je takav da je njegovo postojanje u trenutku otkrića očigledno osobi koja je prosečno umešna iz oblasti kojoj otkriće pripada” (§103, Zakon o patentima (1952.), SAD).

U SAD je ostao zabeležen veliki broj primera sudske sporove koji se odnose na patentiranje pojedinačnih enantiomera kada je racemska smeša već poznata, pri čemu najraniji datiraju čak iz 1948. godine. Patentna zaštita enantiomera se osporava po osnovu nedostatka inovativnosti i očiglednosti, pri čemu su dosadašnje sudske odluke različite, ali se uopšteno može zaključiti (47):

- da se za enantiomere može tvrditi inovativnost bez obzira na prethodno opisanu racemsku smešu. Američki sudovi dosledno primenjuju drugostepenu odluku Žalbenog suda za običaje i patente iz 1948. po kojoj „postojanje jedinjenja kao sastojka druge supstance ne negira inovativnost čistog jedinjenja, iako može, naravno, učiniti patentni zahtev neosnovanim u pogledu neočiglednosti”.
- da su enantiomeri *prima facie* (na prvi pogled) očigledni, što ne implicira da ih nije moguće patentirati, već prebacuje teret dokazivanja neočiglednosti na podnosioca zahteva.

Glavni izazov u patentnoj zaštiti enantiomera prethodno zaštićene racemske smeše, jeste, dakle, argumentovanje neočiglednosti. Najčešće to podrazumeva dokumentovanje „neočekivanih rezultata”, odnosno svojstva enantiomera koja predstavljaju značajno unapređenje u odnosu na racemat i to u meri koja ne bi bila očekivana osobi prosečne umešnosti u dатој oblasti. Unapređenje se može odnositi na

povoljnije farmaceutske i/ili farmakološke karakteristike, odnosno smanjenu toksičnost, ali granična vrednost tog unapređenja za koju se može tvrditi „neočekivanost” nije jasno definisana. Pojedini autori navode da unapređenje treba da bude barem dvostruko ili veće (48), ali se odluke patentnih sudova većinom donose na individualnim osnovama i zavise od sadržaja prethodne patentne dokumentacije. Dodatan argument u korist neočiglednosti mogu biti i takozvana sekundarna razmatranja ili pokazatelji neočiglednosti: neuspeh drugih u dobijanju enantiomera, izražena potreba za čistim enantiomerom, namera konkurenčije da izvrši kopiranje, skeptičnost stručne javnosti povodom pronalaska itd. U određenim slučajevima, neočiglednost je argumentovana i prethodnim nepostojanjem odgovarajućeg postupka za dobijanje čistog enantiomera opisane racemske smeše (47).

Pokušaji ostvarivanja hiralnog prelaza do sada su bili neuniformno uspešni i oslanjali su se na različite strategije.

Atorvastatin kalcijum (*Lipitor*[®], originator *Pfizer*) je inicijalno razvijen i patentno zaštićen kao racemat, pri čemu je do 2008. godine dostigao status najprodavanijeg leka u svetu. Neposredno pred istek patentne zaštite (2011. u SAD), *Pfizer* je u periodu između 2005. i 2008. podneo zahtev za patentnu zaštitu jedinog biološki aktivnog stereoizomera atorvastatina (*R,R*-konfiguracije) pred nadležnim organima u više zemalja, pri čemu je u svim zemljama traženi patent poništen na osnovu nedostatka inovativnosti i očiglednosti.

Omeprazol (*Prilosec*[®], originator *AstraZeneca*), još jedan blockbuster (engl. *blockbuster drug*, lek koji postigne godišnji promet veći od milijardu dolara), takođe je inicijalno patentno zaštićen kao racemska smeša sa istekom zaštite u 1999. godini u EU, odnosno 2001. u SAD. Pre isteka patentne zaštite nad racematom, 1999. godine, *AstraZeneca* je podnela zahtev za patent nad *S*-omeprazolom (esomeprazol) uz tvrdnje o većoj doznoj efektivnosti i manjim interindividualnim varijacijama naspram racemata. Kako patent nije osporen, *AstraZeneca* je pre isteka zaštite nad omeprazolom na tržište plasirala esomeprazol (*Nexium*[®]) i uz marketing novog proizvoda (zaštićenog u SAD do 2014. godine) osigurala da generički omeprazol ne umanji tržišni udeo kompanije u antiulkusnim lekovima. Iako su generičke kompanije u međuvremenu osigurale poništenje patenta nad esomeprazolom u Kanadi i EU, strategija hiralnog prelaza u slučaju omeprazola se često citira kao jedan od najuspešnijih primera primene ove strategije (3,7). Sličan primer, gde je hiralti prelaz uspešno ostvaren zahvaljujući dokumentovanju značajno veće efikasnosti jednog od enantiomera, jeste i levofloksacin (*S*(–)-ofloksacin), koji je pored antibioticske efikasnosti dodatno 9 puta rastvorljiviji od racemata (iako to nije inherentno svojstvo samo levogirog enantiomera) i manje toksičan. Prilikom pokušaja osporavanja patenta nad enantiomerom, sudovi u SAD, Kanadi i Velikoj Britaniji citirali su zbir ovih karakteristika kao dovoljnu argumentaciju neočiglednosti pronalaska (48).

Pojedine kompanije su uspešno obezbedile niz patenata nad enantiomerima lekova koje su inicijalno razvile druge kompanije. *Sepracor* (od 2010. *Sunovion*), kompanija koju pojedini autori označavaju kao specijalizovanu za hiralne prelaze (49), tako je patentno zaštitila levalbuterol (*R*-albuterol), eszopiklon (*S*-zopiklon), *S*-cetirizin, arformoterol (*R,R*-formoterol) i niz drugih lekova ili njihovih savremenih formulacija, kroz tvrdnje o otkriću neočekivano boljih karakteristika u poređenju sa odgovarajućim racematima (3). *Sepracor* je uspešno podneo čak i zahteve za patentnu zaštitu oba enantiomera fluoksetina, navodeći otkriće povoljnijih karakteristika *S*-fluoksetina u terapiji migrene, odnosno *R*-fluoksetina u terapiji depresije, koje nadilaze efikasnost i bezbednosni profil racemata (50). Razvoj enantiomera je, međutim, prekinut tokom kliničkih studija.

Patentno pravo u oblasti hiralnih lekova bogato je različitim presedanima i predmet je intenzivnog interesovanja, posebno u kontekstu činjenice da velikom broju racemskih blokbaster lekova u neposrednoj budućnosti ističe patentna zaštita. Iako pojedini autori smatraju da praksa hiralnih prelaza predstavlja zloupotrebu patentnog prava i ugrožava interese pacijenata (51), patentna zaštita enantiomera uopšteno ne ograničava razvoj generičkih preparata racemata (42) i sama po sebi, bez odgovarajuće investicije u marketing „novog“ proizvoda, ne predstavlja univerzalni pristup produženju ekskluzivne eksploatacije postojećih lekova. Kako pojedini autori zaključuju, pokušaji patentne zaštite enantiomera često predstavljaju prvi korak u dugim sudskim sporovima koji se zaključuju dogовором između prvobitnog vlasnika patenta i generičke kompanije (48). Konačno, ova oblast još jednom naglašava značaj poznavanja uticaja stereohemije lekova na njihovo dejstvo i sudbinu u organizmu, jer argumentovanje (ne)očiglednosti enantiomera kao pronalaska u celosti zavisi od dokumentovanja superiornosti njegovih karakteristika nad prethodno poznatim racematom.

6. Zaključak

Više od 60% lekova registrovanih u svetu u protekle 3 decenije jesu hiralna jedinjenja. Do danas je dokumentovan veliki broj primera koji jasno pokazuju da stereohemija leka može imati ključan uticaj na njegove efekte i sudbinu u organizmu, te da enantiomeri pre kao pravilo nego izuzetak – poseduju različite farmakološke, farmakokinetičke i/ili toksikološke karakteristike. Prednost upotrebe pojedinačnih enantiomera umesto racemata u formulacijama lekova obuhvata: smanjenje ukupno primenjene doze leka, pojednostavljinje farmakokinetičke leka, precizniju procenu odnosa doze i efekta, veću terapijsku širinu, smanjenu interindividualnu varijabilnost odgovora na lek i jednostavniji terapijski monitoring (8,41). Daleko ređe, racemat može imati jasne terapijske prednosti nad svakim od enantiomera pojedinačno. Zaključak o

opravdanosti upotrebe hiralno čistog leka odnosno racemata treba doneti ispitivanjem efekata i farmakokinetike pojedinačnih enantiomera i racemske smeše (8).

Razvoj asimetričnih sinteza, analitičkih metoda kao i regulatorni podsticaji doveli su do značajne promene u trendu razvoja novih hiralnih lekova, sa izraženom dominacijom enantiomerno čistih lekova u novoregistrovanim preparatima. U narednom periodu, istek patentne zaštite nad brojnim lekovima prethodno zaštićenim u obliku racemata i želja inovativnih kompanija da odlože razvoj odgovarajućih generičkih preparata doprineće porastu broja hiralnih prelaza i sve većem tržišnom udelu enantiomerno čistih lekova.

Iako nekada predmet intenzivne debate, danas se čini izvesnim da su farmaceutska industrija, regulatorne agencije, kao i kliničari, jedinstveni u posvećenosti da se uticaj stereohemije na dejstvo i sudbinu hiralnih lekova u organizmu ispituje od najranijih faza njegovog otkrića, te da razvoj leka treba da bude okrenut racionalnom izboru samo jednog od enantiomera koji će biti formulisan u tržišno dostupan preparat.

Zahvalnica

Autori zahvaljuju Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije na finansijskoj podršci projekta 172009.

Literatura

1. Barron LD. Chirality and Life. *Space Sci Rev.* 2007;135(1-4):187–201.
2. Podlech J. Origin of organic molecules and biomolecular homochirality. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(1):44–60.
3. Agrawal YK, Bhatt HG, Raval HG, Oza PM, Gogoi PJ. Chirality – A New Era of Therapeutics. *Mini Rev Med Chem.* 2007;7(5):451–60.
4. Burke D, Henderson DJ. Chirality: a blueprint for the future. *Br J Anaesth.* 2002;88(4):563–76.
5. Patrick GL. An Introduction to Medicinal Chemistry. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2009.
6. Ariens EJ. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984;26:663–8.
7. Núñez MC, García-Rubiño ME, Conejo-García A, Cruz-López O, Kimatrai M, Gallo MA, et al. Homochiral Drugs: A Demanding Tendency of the Pharmaceutical Industry. *Curr Med Chem.* 2009;16(16):2064–74.
8. Triggle DJ. Stereoselectivity of drug action. *Drug Discov Today.* 1997;2(4):138–47.
9. Kasprzyk-Hordern B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. *Chem Soc Rev.* 2010;39(11):4466–503.

10. Davies NM, Teng XW. Importance of Chirality in Drug Therapy and Pharmacy Practice: Implications for Psychiatry. *Adv Pharm.* 2003;1(3):242–52.
11. Baumann P, Zullino DF, Eap CB. Enantiomers' potential in psychopharmacology – a critical analysis with special emphasis on the antidepressant escitalopram. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002;12(5):433–44.
12. Grond S, Sablotzki A. Clinical Pharmacology of Tramadol. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(13):879–923.
13. Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL, et al. Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;267(1):331–40.
14. Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an „atypical” opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;260(1):275–85.
15. Kroemer HK, Fromm MF, Bull K, Terefe H, Blaschke G, Eichelbaum M. An enantiomer-enantiomer interaction of (S)- and (R)-propafenone modifies the effect of racemic drug therapy. *Circulation.* 1994;89(5):2396–400.
16. Brocks DR. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity in pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos.* 2006;27(8):387–406.
17. Smith SW. Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. *Tox Sci.* 2009;110(1):4–30.
18. Howard ML, Hill JJ, Galluppi GR, McLean MA. Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2010;13(2):170–87.
19. Bertucci C, Domenici E. Reversible and Covalent Binding of Drugs to Human Serum Albumin: Methodological Approaches and Physiological Relevance. *Curr Med Chem.* 2002;9(15):1463–81.
20. Campo VL, Bernardes LSC, Carvalho I. Stereoselectivity in Drug Metabolism: Molecular Mechanisms and Analytical Methods. *Curr Drug Metab.* 2009;10(2):188–205.
21. Caldwell J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. *J Chromatogr A.* 1995;694(1):39–48.
22. Knihinicki RD, Day RO, Williams KM. Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs—II Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(10):1905–11.
23. Strolin Benedetti M, Whomsley R, Poggesi I, Cawello W, Mathy F-X, Delporte M-L, et al. Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metab Rev.* 2009;41(3):344–90.
24. Moaddel R, Ravichandran S, Bighi F, Yamaguchi R, Wainer IW. Pharmacophore modelling of stereoselective binding to the human organic cation transporter (hOCT1). *Br J Pharmacol.* 2007;151(8):1305–14.
25. Notterman DA, Drayer DE, Metakis L, Reidenberg MM. Stereoselective renal tubular secretion of quinidine and quinine. *Clin Pharmacol Ther.* 1986;40(5):511–7.
26. Itoh T, Ishida M, Onuki Y, Tsuda Y, Shimada H, Yamada H. Stereoselective renal tubular secretion of carbenicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(11):2327–32.
27. Shah RR. Improving Clinical Risk/Benefit Through Stereochemistry. In: Eichelbaum M, Testa B, Somogyi A, editors. *Stereochemical Aspects of Drug Action and Disposition.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2003. p. 401–32.
28. Leonard B, Taylor D. Review: Escitalopram—translating Molecular Properties into Clinical Benefit: Reviewing the Evidence in Major Depression. *J Psychopharmacol.* 2010;24(8):1143–52.
29. Cook CS. Current Issues on Bioavailability and Bioequivalence Determination. *J Bioequiv Bioavailab.* 2011;S1(1).

30. Srinivas NR. Role of Stereoselective Assays in Bioequivalence Studies of Racemic Drugs: Have We Reached a Consensus? *J Clin Pharmacol.* 2004;44(2):115–9.
31. Izake EL. Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: An overview. *J Pharm Sci.* 2007;96(7):1659–76.
32. Marzo A, Heftmann E. Enantioselective analytical methods in pharmacokinetics with specific reference to genetic polymorphic metabolism. *J Biochem Biophys Methods.* 2002;54(1–3):57–70.
33. Parker D. NMR Determination of Enantiomeric Purity. *Chem Rev.* 1991;91(7):1441–57.
34. Kumar AP, Jin D, Lee Y-I. Recent Development on Spectroscopic Methods for Chiral Analysis of Enantiomeric Compounds. *Appl Spectrosc Rev.* 2009;44(4):267–316.
35. Wenzel TJ, Chisholm CD. Using NMR spectroscopic methods to determine enantiomeric purity and assign absolute stereochemistry. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2011 Jul;59(1):1–63.
36. Shah RR, Branch SK. Regulatory Requirements for the Development of Chirally Active Drugs. In: Eichelbaum M, Testa B, Somogyi A, editors. *Stereochemical Aspects of Drug Action and Disposition.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2003. p. 379–99.
37. U.S. Food and Drug Administration. Development of New Stereoisomeric Drugs [Internet]. 1992. Available from: <http://www.fda.gov/drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm>
38. European Communities Commission. Directorate-General for Industry, Pharmaceuticals and Cosmetics. *EudraLex, Vol. 3: Investigation of Chiral Active Substances (3CC29a).* 1993.
39. Daniels JM, Nestmann ER, Kerr A. Development of Stereoisomeric (Chiral) Drugs: A Brief Review of Scientific and Regulatory Considerations. *Drug Inf J.* 1997;31(3):639–46.
40. Federsel H. Facing chirality in the 21st century: Approaching the challenges in the pharmaceutical industry. *Chirality.* 2003;15(S1):S128–S142.
41. Caner H, Groner E, Levy L, Agranat I. Trends in the development of chiral drugs. *Drug Discov Today.* 2004;9(3):105–10.
42. Parker S, Mooney K. Is evergreening a cause for concern? A legal perspective. *J Commerc Biotech.* 2007;13(4):235–43.
43. Agranat I, Caner H, Caldwell J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(10):753–68.
44. Gupta H, Kumar S, Roy SK, Gaud RS. Patent protection strategies. *J Pharm Bioallied Sci.* 2010;2(1):2–7.
45. Whitehead B, Jackson S, Kempner R. Managing generic competition and patent strategies in the pharmaceutical industry. *J Intellect Property Law Pract.* 2008;3(4):226 –235.
46. Miller CP, Ullrich JW. A consideration of the patentability of enantiomers in the pharmaceutical industry in the United States. *Chirality.* 2008;20(6):762–70.
47. Darrow JJ. The Patentability of Enantiomers: Implications for the Pharmaceutical Industry. *Stanford Technol Law Rev.* 2007;2.
48. Agranat I, Wainschtein SR. The strategy of enantiomer patents of drugs. *Drug Discov Today.* 2010;15(5-6):163–70.
49. Stinson SC. Chiral Pharmaceuticals. *Chem Eng News.* 2001;79(40):79–97.
50. Agranat I, Caner H. Intellectual property and chirality of drugs. *Drug Discov Today.* 1999;4(7):313–21.
51. Dwivedi G, Hallihosur S, Rangan L. Evergreening: A deceptive device in patent rights. *Technol Soc.* 2010;32(4):324–30.

Stereochemical aspects of drug action and pharmacokinetics

Slavica Erić¹, Marko Kalinić¹, Vladimir Savić^{2*}

¹ University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

² University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Organic Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

* Corresponding author: e-mail: vladimir.savic@pharmacy.bg.ac.rs
telephone: +381 (0)11 3951-243
fax: +381 (0)11 3972-840

Summary

The action and fate of drugs in the organism are determined by their interactions with endogenous macromolecules which are predominantly chiral in character. Consideration of the stereochemical aspects of drug action and pharmacokinetics has been intensified since the 1980s and has led to extensive documentation of significant differences existing between stereoisomeric forms of a single drug. Enantiomers can possess different efficacies, exhibit different pharmacological and toxicological effects, and consequently be characterized by different safety profiles. The growing wealth of evidence on the importance of stereochemistry, regulatory incentives, development of asymmetric synthesis methods and analytics – all contributed to fundamental changes in the way new chiral drugs are developed, tested, registered and market-managed. Today, enantiomers need to be treated as separate chemical entities and investigated correspondingly. Development of single enantiomer drugs can facilitate the reduction of total dose of xenobiotic administered to patients; improve the accuracy of dose-response estimation; simplify pharmacokinetic studies and therapeutic monitoring. The stereochemical characteristics of biologically active compounds should, therefore, be considered from the earliest stages of drug development. Based on the established impact of stereochemistry, a single enantiomer formulation should be favored, whenever justified.

Key words: enantiomers; drug development; chirality

Prilozi – Contributions

IZVEŠTAJ SA PREDAVANJA „THE EDITORIAL WORLD AT THE LANCET MEDICAL JOURNAL”

Na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu 2. jula 2012. godine održano je predavanje pod nazivom „*The Editorial World at The Lancet Medical Journal*”. Predavanje je održala Maja Zečević (PhD, MPh), *North American Senior Editor* časopisa *The Lancet*. Ovaj naučni časopis je rangiran na drugoj poziciji među 153 časopisa iz oblasti medicine (Journal Citation Reports, Thomas Reuters 2012). Njegov impakt faktor je 38. Glavni urednik je *Richard Horton* (BSc, MB, FRCP, FMedSci). Izdanja ovog časopisa publikuju se u okviru izdavačke kuće *Elsevier*. Časopis *The Lancet Red section* sadrži originalne naučne radove sa rezultatima registrovanih kliničkih studija¹⁰ koje se sprovode u skladu sa smernicama COSORT¹¹, STARD¹², STROBE¹³, STREGA¹⁴ ili PRISMA¹⁵. U *The Lancet Blue section* objavljuju se *pisma urednika, komentari, pisma uredništvu, kratka saopštenja, novine u medicini, obaveštenja i dr.* *The Lancet Green section* je tematsko izdanje koje izlazi nekoliko puta godišnje i sadrži pregledne radove eminentnih stručnjaka, po izboru urednika. Specijalizovana mesečna izdanja časopisa *The Lancet* su: *Infectious Diseases, Neurology, Oncology* i, od ove godine, *Pulmology*. M. Zečević je istakla da se uredništvu časopisa *The Lancet* godišnje prijavi oko 10 000 rukopisa naučnih radova, oko 20% se upućuje na recenziju i samo oko 5% se prihvati za objavljinjanje.

Glavna tema predavanja bilo je neetičko ponašanje autora prilikom pripreme i objavljinjanja naučnih i stručnih radova. M. Zečević je navela da su uobičajeni vidovi plagiranja u stručnim i naučnim publikacijama - citiranje, parafraziranje ili prevođenje

¹⁰ WHO International Clinical Trial Registry Platform (<http://apps.who.int/trialsearch/>)

¹¹ <http://www.consort-statement.org/>

¹² <http://www.stard-statement.org/>

¹³ <http://www.strobe-statement.org/>

¹⁴ <http://www.medicine.uottawa.ca/public-health-genomics/web/eng/strega.html>

¹⁵ <http://www.prisma-statement.org/>

dela objavljenog rada ili rada u celini, bez navođenja odgovarajuće reference u radu. Plagijat predstavlja i prisvajanje ideja i sugestija recenzenta u fazi evaluacije rukopisa. Ovaj vid plagiranja se praktično nikada ne otkrije. Najčešće autori naučnih radova, uglavnom nesvesno, u manjoj ili većoj meri, ponavljaju deo iz svojih prethodnih publikacija (tzv. auto-plagijat). Utvrđivanje stepena sličnosti između radova može da se utvrdi korišćenjem softverskog programa *CrossCheck*. U časopisu *The Lancet* praksa je da se *CrossCheck* koristi samo kod rukopisa koji su prihvaćeni za objavljivanje. *CrossCheck* alatke se koriste za poređenje radova na engleskom jeziku. Nedostatak ovog programa je to što se on ne može upotrebiti za komparativnu analizu tabela, slika i grafikona. Zbog toga, nakon analize rukopisa *CrossCheck*-om, konačnu procenu i odluku o tome da li je načinjen plagijat donosi urednik. Falsifikovanje, pored plagiranja, je čest vid neetičkog ponašanja autora. Uglavnom se falsificuju grafikoni, slike, tabelarni prikazi rezultata i podaci o učesnicima kliničkih ispitivanja. Na primer, bilo je slučajeva gde su u celini falsifikovani podaci o pacijentima i rezultati ispitivanja (tzv. „izmišljeni” pacijenti i rezultati). Falsifikati u rukopisima radova se vrlo teško otkrivaju, jer još uvek ne postoje odgovarajuće softverske alatke. Osim toga, kada se radi o podacima o pacijentima koji učestvuju u kliničkim ispitivanjima i/ili prikupljenim rezultatima, obično je izuzetno komplikovano prikupljanje odgovarajućih dokaza o eventualnom falsifikatu. Za sada se jedino u Norveškoj primenjuje zakon o falsifikovanju u stručnim publikacijama. U ostalim zemljama ne postoje zakonski propisi koji predviđaju sankcije za neetičko ponašanje autora. U praksi, kada se sumnja i utvrdi da je došlo do plagiranja ili falsifikovanja, sprovode se sledeće korektivne mere: rukopis se ne objavljuje, obaveštavaju se autori i njihovi nadređeni i kontaktiraju se ustanove u kojima je kliničko ispitivanje sprovedeno. Ukoliko se otkrije falsifikat ili plagijat u već objavljenom radu, uredništvo donosi odluku o povlačenju rada. Problem neetičkog ponašanja u pripremi stručnih i naučnih publikacija je rasprostranjen i izdavači ulažu značajne napore sa ciljem da se on prevaziđe. Više informacija o strategijama i aktivnostima na unapredjenju etike u stručnom izdavaštvu dostupno je na internet sajtovima: <http://publicationethics.org>, <http://www.icmje.org>, <http://www.councilscienceeditors.org>.

Dr sc. Ljiljana Đekić, asistent

Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

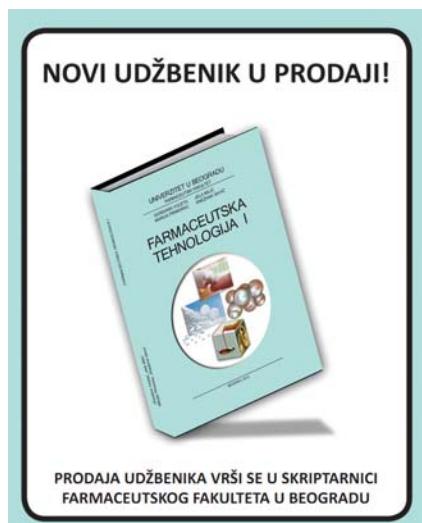
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

Tel.: +381113951359

e-mail: ljiljanadjek@gmail.com

Nove knjige – New books

FARMACEUTSKA TEHNOLOGIJA I



Autori: Gordana Vuleta,
Jela Milić,
Marija Primorac,
Snežana Savić

Izdavač: Univerzitet u Beogradu,
Farmaceutski fakultet, Beograd, 2012

Farmaceutska tehnologija I je namenjena studentima, ali i svim farmaceutima u mnogim oblastima farmaceutske delatnosti, kao i svim stručnjacima koji su zainteresovani za oblast farmaceutike. Knjiga može služiti kako za prvo usvajanje znanja početnicima iz oblasti farmaceutske tehnologije, tako i za proširivanje i inoviranje dostignutog nivoa znanja poznavaca ove materije.

U tekstu su uglavnom korišćeni srpski nazivi za lekovite i pomoćne supstance, farmaceutske oblike, postupke i pojedine fenomene, koji su navedeni u udžbeniku, mada je bilo nemoguće izbeći strane reči i ustaljene latinske nazive. Koncept sadržaja „**Farmaceutska tehnologija I**“ baziran je na savremenim principima, a stručni izrazi su preuzeti iz važeće Evropske farmakopeje.

U uvodu u „**Farmaceutsku tehnologiju I**“ predstavljen je predmet izučavanja farmaceutske tehnologije, opisani su farmaceutski oblici lekova i postupak formulacije aktivne supstance u odgovarajući lekoviti preparat/farmaceutski oblik, objašnjena farmakopeja (glavni službeni propis u farmaceutskoj delatnosti), tabelarno prikazani glavni putevi primene lekova i vrste farmaceutskih oblika prema Evropskoj farmakopeji, za koje su navedeni srpski, engleski i latinski nazivi.

Takođe, u uvodnom delu iznose se podaci o personalizovanoj medicini, individualizaciji terapije i „fleksibilnim” farmaceutskim oblicima leka.

U drugom delu „**Farmaceutske tehnologije I**” govori se o pomoćnim supstancama (ekscipijensi) u farmaceutskim oblicima lekova sa aspekta preciznosti doziranja, pogodnosti primene, uloge u oslobođanju i resorpciji lekovite supstance iz lekovitog preparata, njihov značaj za stabilnost aktivne supstance i farmaceutski preparat, uticaj na izradu/proizvodnju i kvalitet lekova. Kroz veći broj tabela u delu 2 „**Farmaceutske tehnologije I**” prikazani su najznačajniji podaci o brojnim pomoćnim supstancama koje se koriste u izradi/proizvodnji farmaceutskih preparata, a detaljno je opisana prečišćena voda (osobine, dobijanje, farmakopejski zahtevi, upotreba u farmaciji).

Površinski aktivni materije kao farmaceutski ekscipijensi su detaljno obrađeni u delu 3.

Praškovi i granule, kao farmaceutski oblici lekova opisani su u delu 4 (prednosti i nedostaci praškova, vrste i karakteristike, izrada i ispitivanje).

U delu 5 knjige obrađeni su rastvori sa aspekta procesa rastvaranja, metode za povećanje rastvorljivosti, rastvori kao farmaceutski oblici lekova za peroralnu, spoljašnju, nazalnu, primenu za uši i na sluzokožu usne duplje, takođe, diskutovana je njihova izrada i potrebna ispitivanja.

Ekstrakti i tinkture (metode ekstrakcije, vrste, izrada, standardizacija ekstrakata i primena u biljnim u tradicionalnim biljnim lekovima) opisani su u delu 6.

Suspenzije i emulzije sa fizičkohemijskog aspekta, pristup formulaciji farmaceutskih suspenzija i emulzija, farmaceutski oblici tipa suspenzija i emulzija, izrada i ispitivanja, obrađeni su u delu 7.

Polučvrsti preparati za primenu na koži (masti, kremovi, gelovi, paste, kataplaume, lekoviti i dermalni flasteri) predstavljeni su u delu 8 knjige. Opisane su najčešće korišćene pomoćne supstance u formulacijama ove vrste farmaceutskih oblika za kožu, osobine i izbor podloga kao nosača lekovite supstance, njihovo delovanje na koži (bez lekovite supstance), izrada/proizvodnja različitih polučvrstih preparata za kožu, njihova ispitivanja (kvaliteta, stabilnosti) i posebno razmatrani biofarmaceutski aspekti.

Homeopatski preparati – pojam, status, farmakopejske monografije, metode izrade i farmaceutski oblici homeopatskih lekova prikazani su u delu 9.

U delu 10 se nalaze podaci o reološkim osobinama farmaceutskih preparata, posebno o merenju viskoziteta ove vrste proizvoda i uticaju pomoćnih supstanci (karbomer, metilceluloza, karmeloza – natrijum, hipromeloza) na reološko ponašanje farmaceutskih oblika tečne i polučvrste konzistencije.

Recenzenti ove knjige su ugledni profesori Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, prof. dr Zorica Đurić i prof. dr Sote Vladimirov, koji su pomogli da udžbenik bude što jasnije napisan.

Farmaceutska tehnologija I je dostupna u skriptarnici Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, Vojvode Stepe 450 (informacije na telefon: 3951 - 379).

Prof. dr Gordana Vučeta
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju

SADRŽAJ – CONTENTS**Originalni naučni radovi – Original scientific papers**

- **Nataša Pejić, Aleksandra Janošević, Jelica Rogić, Nikola Paunović** **429**
Termodinamika micelizacije heksadeciltrimetilamonijum-bromida u binarnoj smeši propilenglikol-voda
Thermodynamics of micellization of hexadecyltrimethylammonium bromide in propylene glycol-water binary mixture
- **Mirjana Đukić, Milica Ninković, Ivana Stevanović, Marijana Ćurčić, Katarina Ilić, Dragan Đurđević, Dragana Vujanović** **443**
Oksidativni i nitrozativni stres - medijatori neurotoksičnosti dikvata
Oxidative and nitrosative stress - mediators of diquat neurotoxicity
- **Aleksandra Zeljković, Jelena Vekić, Vesna Spasojević-Kalimanovska, Zorana Jelić-Ivanović, Nataša Bogavac-Stanojević, Slavica Spasić, Dimitra Kalimanovska-Oštrić,** **461**
Uticaj hipertrigliceridemije na male, guste LDL i HDL čestice u koronarnoj arterijskoj bolesti
Influence of hypertriglyceridemia on small, dense LDL and HDL particles in coronary artery disease
- Stručni radovi - Professional papers**
- **Irena Kasagić-Vujanović, Marko Jovanović, Tijana Rakić, Biljana Jančić Stojanović, Darko Ivanović** **475**
Testiranje robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća primenom frakcionog faktorskog dizajna
Robustness testing of liquid chromatographic method for determination of itraconazole and its impurities applying fractional factorial design
- **Maja Nikolić** **489**
Crveni pirinač u farmaceutskoj praksi
Red yeast in pharmaceutical practice
- **Slavica Erić, Marko Kalinić, Vladimir Savić** **499**
Stereohemijski aspekti dejstva i farmakokinetike lekova
Stereochemical aspects of drug action and pharmacokinetics
- Prilozi – Contributions**
- **Izveštaj sa predavanja „The Editorial World at The Lancet Medical Journal”** **522**
- **Nove knjige – New books** **524**