

UDK 615 (497.11)

ISSN 0004-1963 (Štampano izd.)

ISSN 2217-8767 (Online)

ARHIV ZA FARMACIJU

Godina 63

Broj 4

Beograd, 2013.

ČASOPIS SAVEZA
FARMACEUTSKIH
UDRUŽENJA SRBIJE

4/2013

ARHIV ZA FARMACIJU

2013, Vol 63, N^o 4

SADRŽAJ – CONTENTS

Pregledni radovi/Review articles

- Bojan Čalija, Jela Milić, Danina Krajišnik, Andelka Račić 347

Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biomedicinskim preparatima

Characteristics and application of chitosan in pharmaceutical/biomedical preparations

Originalni naučni radovi – Original scientific papers

- Slađana B. Tanasković, Jelena Antić-Stanković, Mirjana Antonijević-Nikolić 365

Antiproliferativna aktivnost mešovito-ligandnih Cu (II) kompleksa sa pendantnim oktaazamakrociklom *in vitro*

Antiproliferative activity of mixed-ligand Cu(II) complexes with pendant octaazamacrocycle *in vitro*

Stručni radovi - Professional papers

- Ivana Mirković, Gordana Vučeta, Snežana Savić 375

Kozmetovigilanca - uspostavljanje sistema praćenja neželjenih efekata kozmetičkih preparata

Cosmetovigilance – establishing the system for monitoring of adverse effects to cosmetic products

Prilozi – Contributions

- Izveštaj sa 61. simpozijuma Saveza farmaceutskih udruženja Srbije, Zlatibor, 10-13. oktobar 2013. 387
- Izveštaj sa 41. Međunarodnog kongresa istorije farmacije, Pariz, 10-14. septembar 2013. godine 396
- In memoriam Mr ph Mirjana Barišić 398

Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biomedicinskim preparatima

Bojan Čalija^{1*}, Jela Milić¹, Danina Krajišnik¹, Anđelka Račić²

¹Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11 221 Beograd

²Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet, Odsjek – Farmacija, Save Mrkalja 14, 78 000 Banja Luka

*Autor za korespondenciju: e-mail: bojanc@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Hitozani su linearni, binarni heteropolisaharidi dobijeni parcijalnom deacetilacijom hitina. Kao katjonski polisaharidi prirodnog porekla imaju veliki potencijal za primenu u oblasti farmacije i biomedicine. Tome dodatno doprinosi njihova strukturalna raznovrsnost u pogledu molekulske mase i stepena deacetilacije, ali i mogućnost hemijske derivatizacije.

Specifična polikatjonska priroda ovih biopolimera odgovorna je za njihova brojna biološka svojstva poput mukoadhezivnosti, hemostatičnog, antimikrobnog i hipoholesterolemičnog delovanja.

Zahvaljujući gelirajućim sposobnostima, mogućnosti umrežavanja i građenja reverzibilnih polielektrolitnih kompleksa sa polianjonima, hitozani se koriste za izradu koloidnih nosača lekovitih supstanci poput dendrimera, liposoma, micela, mikro- i nanočestica.

Hitozani i njihovi derivati ulaze u sastav komercijalno dostupnih preparata/sredstava za zarastanje rana zahvaljujući stimulaciji proliferacije ćelija i obnavljanja tkiva, hemostatskom i blagom lokalnom analgetičkom delovanju.

Upotreba hitozana kao dodatka ishrani odobrena je u mnogim zemljama, a potvrđen je njihov uticaj na održavanje normalnog nivoa serumskog LDL holesterola.

Derivati hitozana, poput N-karboksimetilhitozana koriste se u kozmetičkim proizvodima jer poseduju sposobnosti geliranja i formiranja filma, stvaraju prijatan osećaj na koži, omekšavaju, vlaže i štite kožu od spoljašnjih uticaja.

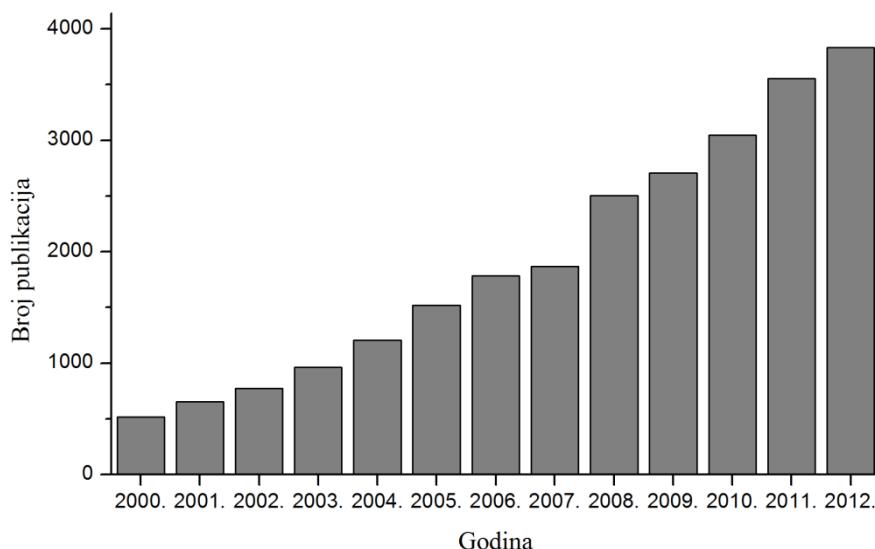
Posebnu pažnju hitozani privlače u oblasti tkivnog inženjerstva zahvaljujući mogućnosti obrazovanja biokompatibilnih poroznih trodimenzionalnih mreža čiju je poroznost i brzinu degradacije u *in vivo* uslovima moguće kontrolisati.

Širu primenu hitozana trenutno ograničava nerešen regulatorni status, jer strukturalna raznovrsnost hitozana ima za posledicu razlike u biodistribuciji, biodegradaciji i toksikološkim profilima, što značajno otežava dobitjanje GRAS statusa.

Ključne reči: hitozan, hitin, polikatjon, farmaceutski/biomedicinski preparati

Uvod

Hitozan je prvi put opisan 1859. godine, kao jedinjenje dobijeno parcijalnom deacetilacijom hitina – gradivnog polisaharida prirodnog porekla (1). Istraživanje potencijalne primene hitozana doživljava naglu ekspanziju tokom protekle tri decenije sa stalnom tendencijom porasta (Slika 1). U oblasti farmacije/biomedicine posebno se ispituje mogućnost primene hitozana za izradu koloidnih nosača lekovitih supstanci sa modifikovanim oslobađanjem, preparata/sredstava za zarastanje rana i tkivnu regeneraciju. Tome su naročito doprineli biokompatibilnost, biodegradabilnost i specifična polikatjonska priroda hitozana. Osim toga, strukturna raznovrsnost ovog polimera, posebno u pogledu molekulske mase i stepena deacetilacije, kao i hemijska derivatizacija, pružaju mogućnost da se osobine hitozana, odnosno njegovih derivata, prilagode potencijalnoj primeni. Rastućem interesovanju za hitozan doprinosi njegovo poreklo iz obnovljivih izvora (hitin), što ga čini relativno jeftinim i lako dostupnim ekscipijensom.

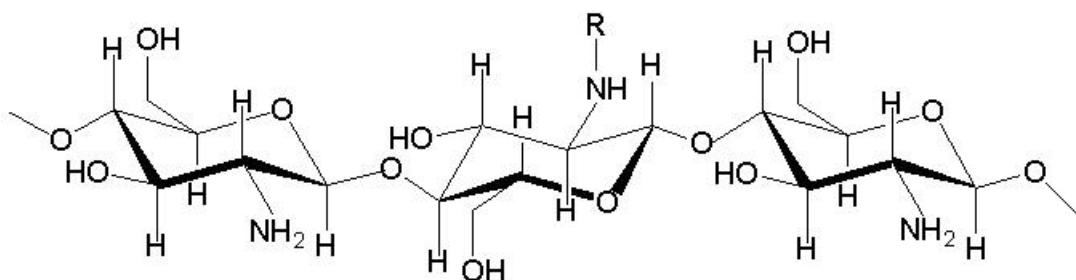


Slika 1 Broj publikacija koje se odnose na hitozan (naslov rada, sažetak, ključne reči).
Podaci preuzeti sa Scopus-a 29.4.2013.

Figure 1 Number of articles related to chitosan (article title, abstract, keywords). Data obtained from Scopus on 29.4.2013.

1. Hemijska struktura hitozana

Hitozan je linearни, binarni heteropolisaharid građen iz 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoze i 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze povezanih $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnim vezama (Slika 2). Stepen deacetilacije, odnosno udeo slobodnih amino grupa, komercijalno dostupnih hitozana je uobičajeno veći od 60 % (2,3). Na osnovu molekulske mase dele se na hitozane male (< 150 kDa), srednje i velike molekulske mase (700 – 1000 kDa) (4). U poslednjih nekoliko godina raste interesovanje istraživača za hitozane kratkog lanca, koji se nazivaju oligohitozani (oligosaharidni hitozani). Molekulska masa ovih oligomera hitozana je manja od 50 kDa, a dobijaju se postupkom hidrolize lanaca visokomolekularnih hitozana (5).



Slika 2 Hemijska struktura hitozana
Figure 2 Chemical structure of chitosan

2. Karakteristike hitozana

2.1 Fizičkohemijske karakteristike hitozana

Na sobnoj temperaturi hitozani su semikristalni polimeri koji pokazuju polimorfizam (6). Kao većina polisaharida koji imaju izraženu sposobnost obrazovanja vodoničnih veza, zagrevanjem se razgrađuju pre nego što počnu da se tope (7).

Rastvorljivost hitozana u vodi zavisi od njihove molekulske mase i stepena deacetilacije, pa su oligohitozani molekulske mase 2 – 3 kDa lako rastvorni u vodi čak i pri neutralnoj pH vrednosti (8), dok su hitozani većih molekulske mase kao katjonski polisaharidi, čija se pK_a vrednost obično kreće u granicama od 6,2 do 7,0, praktično nerastvorni u vodi, fiziološkim uslovima (pH 7,4) i višim pH vrednostima (4,9). Sa dodatkom kiselina povećava se rastvorljivost hitozana usled protonovanja slobodnih $-\text{NH}_2$ grupa na položaju C-2 glukozaminskih jedinica. Stepen deacetilacije u direktnoj je vezi sa brojem slobodnih $-\text{NH}_2$ grupa, pa indirektno utiče na rastvorljivost hitozana.

Tako su hitozani sa stepenom deacetilacije oko 40 % rastvorljivi u vodenim medijumima pH vrednosti do 9,0, dok se hitozani stepena deacetilacije oko 85 % rastvaraju u medijumima pH vrednosti do 6,5 (9). Jonska jačina medijuma, odnosno prisustvo elektrolita, takođe ima veliki uticaj na rastvorljivost hitozana. U odsustvu elektrolita, lanci hitozana su maksimalno izduženi usled repulzije pozitivno nanelektrisanih grupa monomernih jedinica, dok se u prisustvu elektrolita repulzija smanjuje, dolazi do uvijanja lanaca hitozana i efekta isoljavanja, odnosno taloženja hitozana (9, 10).

Niska rastvorljivost hitozana pri pH vrednostima iznad pKa, osnovni je faktor koji ograničava njihovu primenu, naročito kada se koriste u cilju poboljšanja resorpcije/apsorpcije lekovitih supstanci preko sluzokoža (mukoznih membrana).

Viskozitet rastvora hitozana je još jedna osobina koju je neophodno razmotriti prilikom njihove biomedicinske primene. Na viskozitet rastvora hitozana, pored koncentracije, utiču i molekulska masa hitozana, jonska jačina, pH vrednost i temperatura. Sa porastom molekulske mase hitozana raste viskozitet njihovih rastvora, te je pored dobre rastvorljivosti u vodi, nizak viskozitet još jedna prednost oligohitozana u odnosu na hitozane velike molekulske mase (8). Viskozitet rastvora hitozana raste i sa porastom stepena deacetilacije. Sa povećanjem stepena deacetilacije raste i broj slobodnih $-NH_2$ grupa, što dovodi do konformacionih promena, odnosno istezanja lanaca polimera usled repulzije protonovanih $-NH_2$ grupa, a time i porasta viskoziteta (9). Suprotno, povećanje temperature i pH vrednosti imaju za posledicu smanjenje viskoziteta rastvora hitozana (4,10).

Zahvaljujući slobodnim $-NH_2$ grupama u strukturi hitozana, ovi polimeri poseduju sposobnost građenja kompleksa sa jonima metala. Sposobnost kompleksiranja jona metala zavisi od fizičkog stanja hitozana, stepena deacetilacije, distribucije slobodnih $-NH_2$ grupa, pH vrednosti okolnog medijuma, vrste i sadržaja katjona (4). Uzimajući u obzir da su u mehanizam kompleksiranja uključene $-NH_2$ grupe, sposobnost kompleksiranja jona metala raste sa porastom stepena deacetilacije, odnosno sa porastom slobodnih $-NH_2$ grupa. Oligohitozani građeni od najmanje 6 monomernih jedinica takođe poseduju ovo svojstvo. Afinitet hitozana za dvo- i troivalentne jone metala iz njihovih hloridnih soli opada prema sledećem redosledu: $Cu^{2+} >> Hg^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} \sim Ca^{2+} > Nd^{3+} > Cr^{3+} \sim Pr^{3+}$ (6).

Kao polikatjoni, hitozani mogu da stupaju u elektrostatičku interakciju sa suprotno nanelektrisanim jonica, poput anjonskih surfaktanata (npr. natrijum-dodecilsulfat) i polianjonima tipa karboksimetilceluloze, pektina, heparina, ksantana, karagena, hijaluronana, dekstran-sulfata, hondroitin-sulfata i natrijum-alginata (4,6,11,12) gradeći tzv. polielektrolitne komplekse (13).

2.2 Biološke karakteristike hitozana

Mukoadhezivnost kao sposobnost vezivanja za biološke membrane prekrivene mukusom je najznačajnije biološko svojstvo hitozana. U sastav mukusa ulazi glikoprotein mucin, čije negativno nanelektrisanje potiče od ostataka sijalinske kiseline. Kada se hitozani nađu u kiseloj sredini (npr. želudac), dolazi do protonovanja slobodnih $-NH_2$ grupa, što im omogućava da stupaju u elektrostatičku interakciju sa negativno nanelektrisanim sluzokožama. Sa porastom stepena deacetilacije raste i broj slobodnih $-NH_2$ grupa koje mogu biti protonovane, a time i mukoadhezivnost (14,15). I molekulska masa hitozana ima uticaj na mukoadhezivnost, pa je tako kod hitozana veće molekulske mase (oko 1400 kDa) ovo svojstvo izraženije u odnosu na hitozane male molekulske mase (500 do 800 kDa) (1,16). Ovo se može objasniti uticajem molekulske mase na viskozitet, jer hitozani veće molekulske mase obrazuju viskoznije rastvore koji bolje adheriraju na sluzokožu i imaju duže vreme zadržavanja. Pored nanelektrisanja i molekulske mase, na mukoadhezivnost hitozana značajno utiče i mogućnost građenja vodoničnih veza (17), fleksibilnost polimernih lanaca (14), kao i odgovarajuća površinska energija koja favorizuje adheziju hitozana za površinu mukoznih membrana (18).

Hipoholesterolemično delovanje. Hipoholesterolemično delovanje hitozana je jedan od osnovnih razloga za njihovu komercijalizaciju na globalnom tržištu. Međutim, kada se govori o hipoholesterolemičnom delovanju hitozana, potrebno je praviti razliku između efekata koji su zabeleženi u studijama sprovedenim na humanim dobrovoljcima i životinjama. Naime, aktivnost hitozana kod različitih životinjskih vrsta i čoveka se bitno razlikuje, a time i sposobnost hitozana da nakon *per os* primene ostvari ovo delovanje (3). Prva studija kojom je potvrđen hipoholesterolemični efekat hitozana kod odraslih muškaraca, sprovedena je 1993. godine. Rezultati su pokazali da nakon dve nedelje unošenja keksa sa hitozanom (3 g/dnevno tokom prve nedelje, 6 g/dnevno tokom druge nedelje) dolazi do smanjenja ukupnog serumskog holesterola sa 189 mg/dl na 177 mg/dl, uz istovremeno povećanje serumskog HDL holesterola sa 51 mg/dl na 56 mg/dl, u odnosu na kontrolni period tokom koga su ispitanici unosili keks bez hitozana (19).

Predloženo je nekoliko mehanizama kojima se objašnjava hipoholesterolemično delovanje hitozana. Najznačajniji mehanizam je zasnovan na interakciji hitozana sa žučnim kiselinama i spontanom formiranju nerastvornih soli koje se hidrofobnim interakcijama vezuju za holesterol i lipide čime se otežava njihovo varenje. Interakcija hitozana sa anjonskim surfaktantima (lipazama, žučnim kiselinama) odvija se preko slobodnih $-NH_2$ grupa, primarnih i sekundarnih $-OH$ grupa na položajima C-3 i C-6, redom (20). Osim toga, nakon vezivanja za hitozan žučne kiseline gube sposobnost da kao površinski aktivne materije obrazuju emulzije neophodne za varenje lipida (21). Utvrđeno je da u *in vitro* uslovima hitozan predstavlja nespecifičan supstrat za brojne lipaze, pa se pretpostavlja da kao alternativni supstrat za lipaze smanjuje razgradnju

lipida posredovanu ovim enzimima (3). Jedan od mogućih mehanizama koji objašnjava hipoholesterolemično delovanje hitozana je njihova adsorpcija na površinu emulgovanih masti i obrazovanje zaštitnog omotača koji otežava pristup lipazama (22).

Hemostatičko delovanje. Iako je hemostatično delovanje hitozana potvrđeno brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama, još uvek ne postoji dovoljno preciznih podataka o mehanizmu njihovog delovanja. Veći broj sprovednih istraživanja ukazuje da hitozani i hitin ovo delovanje ostvaruju posredno, preko trombocita, pojačavajući sintezu faktora njihovog rasta (3). Međutim, hemostatsko delovanje hitozana je izraženije od hitina, koji ima veći uticaj na agregaciju trombocita nego hitozani. Ovo upućuje na zaključak da stimulacija rasta trombocita, a time i njihove agregacije, nije jedini mehanizam delovanja hitozana na zaustavljanje krvarenja, nego najverovatnije hitozani imaju uticaj i na agregaciju eritrocita (23). Interakcija hitozana kao polikatjona sa eritrocitima je posledica elektrostatičkog privlačenja protonovanih $-NH_2$ grupa hitozana i negativno nanelektrisanih membrana eritrocita (24).

Antimikrobno delovanje. Hitozani poseduju širok spektar antimikrobnog delovanja koje uključuje gram-pozitivne, gram-negativne bakterije i gljivice. Generalno, bakterije su nešto manje osetljive na dejstvo hitozana u odnosu na gljivice. Antifungalno dejstvo hitozana je zasnovano na supresiji sporulacije i germinacije spora (25). U literaturi su opisani brojni mehanizmi na kojima se zasniva antibakterijsko delovanje hitozana, a koji zavise od građe mikroorganizama (26). Jedan od najbolje istraženih mehanizama zasnovan je na interakciji hitozana sa negativno nanelektrisanim grupama strukturalnih molekula lociranih na površini ćelija mikroorganizama (lipopolisaharidi i proteini) (26). Na taj način dolazi do formiranja omotača koji otežava ulazak supstanci iz okruženja u ćeliju (20). Sa porastom broja slobodnih $-NH_2$ grupa i ukupnog pozitivnog nanelektrisanja hitozana, raste njegovo antimikrobno delovanje, što je u skladu sa predloženim mehanizmom delovanja (26,27). Drugi predloženi mehanizam odnosi se na inhibiciju sinteze RNK i proteina nakon permeacije u jedro ćelije, a ograničen je na hitozane male molekulske mase (oligohitozani). Antibakterijsko delovanje hitozana može se pripisati i heliranju jona metala koji su neophodni za normalan ćelijski rast (28).

Olakšavanje resorcije supstanci kroz ćelijske membrane i humani intestinalni epitel je još jedno biološko svojstvo hitozana zasnovano na njegovoj polikatjonskoj prirodi. Ono je najverovatnije posledica interakcije hitozana sa ćelijskom membranom i strukturne reorganizacije proteina koji učestvuju u formiranju tesnih međućelijskih veza (17,29). Pokazano je da sa porastom molekulske mase i stepena deacetilacije hitozana raste njihova sposobnost da poboljšaju permeabilnost epitela (30).

Lokalno analgetičko delovanje. Lokalno analgetičko delovanje hitozana vezuje se za njihovu baznu prirodu i sposobnost vezivanja protona koji se oslobođaju u području zahvaćenim inflamatornim procesom (23). Time se može objasniti jače analgetičko delovanje hitozana u odnosu na hitin, njihov prekursor sa manje izraženim baznim osobinama, odnosno slabijom sposobnosti za vezivanje protona nakupljenih u

inflamacijom zahvaćenom području (20,23). Određene studije ukazuju na lokalni analgetički, umirujući i hlađeći efekat hitozana nakon primene na kožu zahvaćenu ulceracijama, opekotinama i mehaničkim oštećenjima (31,32).

Antitumorsko delovanje. Iako antitumorsko delovanje hitozana nije dovoljno istraženo, pojedini istraživači ukazuju da je ono posledica imunostimulišćeg delovanja (20,33). Posebno je ispitivano antitumorsko delovanje oligohitozana *in vitro*, koje je posledica stimulacije makrofaga i produkcije limfokina aktivacijom limfocita (34-36). Iako većina studija ukazuje na postojanje uticaja molekulske mase na antitumorsko delovanje oligohitozana *in vivo*, podaci o načinu na koji se menja antitumorsko delovanje sa promenom molekulske mase su kontradiktorni (37).

Antioksidativno delovanje. Antioksidativno delovanje hitozana se pripisuje sposobnosti „hvatanja” slobodnih radikala (hidroksil, superoksid i alkil radikala) i heliranja jona metala (jon gvožđa), eliminišući njihovu prooksidativnu aktivnost (38,39).

Veza između najznačajnijih bioloških svojstava hitozana i njegovih strukturnih karakteristika predstavljena je u Tabeli I.

Tabela I Veza između bioloških svojstava hitozana i njihovih karakteristika (20)

Table I Relationship between chitosans biological properties and their characteristics (20)

Biološko svojstvo	Karakteristike hitozana koje imaju uticaj na njegova biološka svojstva			
	Mr	Stepen deacetilacije	Distribucija – NH ₂ grupa	Viskozitet
Biodegradabilnost	+	–	+	+
Biokompatibilnost	+	–	–	–
Mukoadhezivnost	+	+	–	–
Hemostatično delovanje	+	+	–	–
Lokalno analgetičko delovanje	–	+	–	–
Pojačavanje resorpcije	+	+	–	–
Antimikrobnog delovanje	+	+	–	–
Hipoholesterolemično delovanje	+	+	–	+
Antioksidativno delovanje	+	+	–	–

2.3 Biodegradabilnost hitozana i regulatorni aspekt

Hitozan je biokompatibilan i biodegradabilan polimer u čijoj biodegradaciji učestvuju enzimi poput lizozima, di-N-acetilhitobiazne, N-acetyl- β -D-glukozaminidaze i hitiotrizidaze koji su prisutni u mukoznim i drugim fiziološkim tečnostima (40). Hitozani i njihovi degradacioni proizvodi mogu da izazovu aktivaciju humanih makrofaga i proliferaciju limfocita, ali bez prateće zapaljenjske reakcije (40), pri čemu brzina degradacije hitozana *in vivo* raste sa porastom stepena deacetilacije (41).

Toksikološkim studijama je potvrđeno da toksičnost hitozana zavisi od puta primene, pa se nakon subkutane primene prvi znaci citotoksičnosti kod zečeva i pasa javljaju nakon primene doza u opsegu 5 – 50 mg/kg/dnevno (42,43), dok se nakon *per os* primene prvi klinički znaci trovanja kod miševa i pacova javljaju tek nakon unošenja 5 – 15 g/kg/dnevno (44). *Per os* unošenje dnevne doze hitozana od 6,75 g kod zdravih dobrovoljaca nije dovelo do vidljivih znakova intoksikacije (45). Nakon primene na koži hitozan ne ispoljava iritantno delovanje, čak ni ukoliko je koža oštećena, niti izaziva alergijske reakcije (1).

Upotreba hitozana kao dodatka ishrani odobrena je u mnogim evropskim, američkim i azijskim zemljama (SAD, Finska, Italija, J. Koreja, Japan i dr.) (9,20). Najčešće je reč o dodacima ishrani sa hitozanom čija se primena preporučuje u cilju smanjenja telesne mase (Chitosan Plus, Chitosan LipoSan Ultra 250, Vitacost Chitosan i dr.), iako o tom efektu hitozana postoje oprečna naučna mišljenja. EFSA¹ je usvojila zdravstvenu izjavu kojom se potvrđuje uticaj hitozana na održavanje normalnog nivoa LDL holesterola, a koji se postiže prilikom unosa 3 g hitozana dnevno. Međutim, ovo regulatorno telo nije potvrdilo zdravstvenu izjavu kojom se hitozan dovodi u vezu sa smanjenjem telesne mase (46). FDA² je odobrila primenu dodataka ishrani i medicinskih sredstva na bazi hitozana namenjenih za ubrzano zarastanje rana (Tabela II) (40,47-49), a od 2002. godine so hitozana, hitozan-hidrohlorid u zemljama Evropske unije ima farmakopejski status (50). Dodeljivanje GRAS³ statusa hitozanu dodatno otežava njegova struktorna raznolikost (stepen deacetilacije i molekulska masa) koja može uticati na njegovu biodistribuciju, *in vivo* i *in vitro* toksičnost (51). Zbog ovoga su sve češći zahtevi da studije toksičnosti prate detaljni podaci o strukturi hitozana na koji se odnose.

3. Derivati hitozana

Hemijska derivatizacija hitozana primenjuje se sa ciljem prilagođavanja osobina (rastvorljivost, hidrofilnost, reaktivnost i dr.) ovog polimera potencijalnoj primeni.

¹ European Food Safety Authority (Evropska uprava za bezbednost hrane)

² US Food and Drug Administration (Američka agencija za hranu i lekove)

³ Generally Recognized As Safe (generalno prihvatljeni kao bezbedni)

Derivatizacija se najčešće vrši specifičnim reakcijama u kojima učestvuje $-NH_2$ grupa na položaju C-2 ili nespecifičnim reakcijama $-OH$ grupa na položajima C-2 i C-3. Od hemijskih reakcija u kojima učestvuje $-NH_2$ grupa, najzastupljenije su reakcije kvaternerizacije ove grupe i reakcije sa $-HCO$ grupama, dok se $-OH$ grupe najčešće modifikuju reakcijama eterifikacije i esterifikacije (6).

Karboksimetilhitozani. U reakciji karboksilacije hitozana, zavisno od uslova, mogu učestvovati pojedinačno $-NH_2$ grupe, $-OH$ grupe, odnosno i $-NH_2$ i $-OH$ grupe istovremeno, pa se karboksimetilhitozani dele na N-karboksimetilhitozane, O-karboksimetilhitozane i N,O-karboksimetilhitozane (52). N-karboksimetilhitozan spada u najznačajnije derivate hitozana. To je amfoterni polimer pH-zavisne rastvorljivosti, koji nastaje u reakciji hitozana sa glioksilnom kiselinom u prisustvu redukujućeg agensa (6,53).

N-karboksimetilhitozan ima gelirajuću sposobnost i sposobnost formiranja filma, stvara prijatan osećaj na koži, omekšava, vlaži i štiti kožu od spoljašnjih uticaja, na čemu se najčešće zasniva njegova primena u kozmetičkim proizvodima (Aquatrix IITM, Maximum Moisture Complex[®] i dr.) (3). Zahvaljujući antibakterijskom dejstvu i mogućnosti korekcije pH vrednosti (slaba baza), ovaj derivat hitozana ima određeni doprinos u prevenciji karijesa, pa se koristi i u proizvodima za oralnu higijenu (Aloe Fresh[®] Whitening, Aloe Fresh[®] Sensitive, Aloement[®] Mouthwash i dr.).

Kvarterni hitozani. Najznačajniji predstavnik ove grupe derivata hitozana je N, N, N-trimetilhitozan (trimetilhitozan amonijum). Dobija se kvarternerizacijom hitozana sa metiljodidom pod kontrolisanim uslovima u prisustvu natrijum-hidroksida (54). Osnovna prednost ovih derivata u odnosu na hitozan je njihova rastvorljivost u vodi. Poseduju dobra antistatička svojstva, koriste se kao antiflokulantni, a zahvaljujući izraženoj katjonskoj prirodi intenzivno se ispituje mogućnost primene kvarternarnih hitozana u genskoj terapiji (3,6,55).

Sulfonovani hitozani. Slično karboksilaciji i sulfataciji hitozana se može odvijati preko $-NH_2$ grupe, $-OH$ grupe, odnosno i $-NH_2$ i $-OH$ grupe istovremeno, na osnovu čega se sulfonovani hitozani mogu klasifikovati na: N-sulfonovane hitozane, O-sulfonovane hitozane i N, O-sulfonovane hitozane (6,56). Ispitana je i potvrđena sposobnost ovih derivata hitozana da adsorbuju jone metala, kao i njihovo antimikrobnno i antikoagulantno delovanje (56).

Alkilovani hitozani. Specifičnost ovih derivata hitozana ogleda se u njihovoj amfifilnoj prirodi. Alkilovani hitozani rastvorni u kiseloj sredini ($pH < 6$) pokazuju površinsku aktivnost, obrazuju viskozne rastvore, a pod odgovarajućim uslovima (koncentracija, pH vrednost, prisustvo soli) formiraju gelove. Njihova prednost ogleda se u mogućnosti kombinovanja sa nejonskim i katjonskim surfaktantima (6).

Kopolimeri hitozana. Kopolimeri hitozana dobijaju se najčešće postupkom „graftovanja” odnosno bočnog vezivanja molekula za osnovni lanac polimera. „Graftovanje” hitozana se postiže u prisustvu slobodnih radikala, γ -zračenja,

cerijumovih jona i enzima (3,57). Osobine ovih kopolimera zavise od strukturnih karakteristika prekurzora (hitozana), broja, strukture i rasporeda bočnih lanaca. Predmet su brojnih istraživanja u oblasti farmacije/biomedicine (zarastanje rana, tkivno inženjerstvo, napredni nosači lekova, antimikrobna sredstva i dr.) (57).

4. Farmaceutska/biomedicinska primena hitozana

4.1 Nosači lekovite supstance na bazi hitozana

Izborom hitozana odgovarajućih karakteristika za izradu nosača lekovite supstance sa modifikovanim oslobađanjem moguće je poboljšati njihovu terapijsku efikasnost i komplijansu. Tokom protekle dve decenije intenzivno se istražuje mogućnost primene hitozana za izradu koloidnih nosača lekovitih supstanci (micele, liposomi, dendrimeri, mikro- i nanočestice) (2,40). Osim za modifikovano oslobađanje, koloidni nosači na bazi hitozana koriste se za postizanje zaštite inkapsulirane lekovite supstance od nepovoljnog delovanja okruženja u *in vivo* uslovima i povećanja biološke raspoloživosti zahvaljujući mukoadhezivnosti hitozana i poboljšanju transmukozne resorpcije (40).

Izrada koloidnih nosača na bazi hitozana najčešće je zasnovana na:

- polikatjonskoj prirodi hitozana i mogućnosti da stupaju u elektrostatičke interakcije sa anjonima male (tripolifosfat, pirofosfat, tetrapolifosfat, oktapolifosfat, heksametafosfat) i velike molekulske mase gradeći polielektrolitne komplekse (alginat, karagen, ksantan, karboksimetilceluloza, hijalurnoska kiselina, kopolimeri etilakrilata i metakrilne kiseline, proteini i molekuli DNK) i
- na formiranju kovalentnih veza sa sredstvima za umrežavanje (glutaraldehid i genipin) (6,40,58-60).

Među najviše ispitivanim koloidnim nosačima na bazi hitozana su alginat-hitozan, hitozan-tripolifosfat, hitozan-genipin i hitozan-glutaraldehid mikro- i nanočestice. Ovi nosači su namenjeni za različite puteve primene uključujući peroralni, transdermalni, oftalmološki, parenteralni, vaginalni, bukalni i nazalni (2,20,61). Opsežna istraživanja sprovedena su sa ciljem da se ispitaju mogućnost i prednosti inkapsulacije citotoksičnih lekova (doksorubicin, 5-fluorouracil, paklitaksel i dr), antiga (vakcina protiv influence, pertusisa, difterije i dr.), gena, proteina (govedi serumski albumin) i peptida (insulin, buserelin, kalcitonin i dr.) u koloidne nosače na bazi hitozana (40).

4.2 Preparati/sredstva za zarastanje rana na bazi hitozana

Zarastanje rana je složen proces koji obuhvata simultani odgovor različitih vrsta ćelija i faktora rasta, sa ciljem da se postigne brza regeneracija strukture i funkcije oštećene kože. Idealno sredstvo za zarastanje rana treba da pomogne u zaustavljanju

krvarenja, zaštiti oštećenu kožu od mikroorganizama i iritanasa iz okruženja, obezbedi razmenu gasova, stimuliše faktore rasta, adsorbuje eksudate istovremeno sprečavajući da dođe do preteranog isušivanja (62). Potrebno je da poseduje i zadovoljavajuću fleksibilnost, postojanost i sposobnost adheriranja za kožu (63).

Hitozani poseduju brojna biološka svojstva zbog kojih ulaze u sastav komercijalno dostupnih medicinskih sredstava za zarastanje rana, od kojih su neka registrovana i u Srbiji (Tabela II): stimulišu proliferaciju ćelija i obnavljanje tkiva, pokazuju hemostatsko delovanje te pomažu u zaustavljanju krvarenja i blokiraju nervne završetke ublažavajući osećaj bola. Postepeno se razgrađuju stvarajući N-acetil- β -D-glukozamin koji stimuliše proliferaciju fibroblasta, sintezu hijaluronske kiseline na mestu oštećenja i pomaže u nakupljanju kolagena (64).

Tabela II Pregled komercijalno dostupnih medicinskih sredstava za zarastanje rana na bazi hitozana i njegovih derivata

Table II An overview of commercialy available wound dressing devices based on chitosan and its derivatives

Zaštićeno ime medicinskog sredstva	Prozvodač	Aktivni sastojak
Chitidine®	IMS	Hitozan/jod
ChitoFlex® Hemostatic dressing ¹	HemCon Medical Technologies	Hitozan-acetat
ChitoPack®C	Eisai Co.	Hitozan-acetat
ChitoSeal® ¹	Abbott Vascular Devices	Hitozan
Clo-Sur® PAD ^{1,2}	Scion Cardio-Vascular	Hitozan
HemCon® Bandage ^{1,2}	HemCon Medical Technologies	Hitozan-acetat
TraumaDEX®	Medafor	
Traumastat® ¹	Ore-Medix	Hitozan/porozni silicijum-dioksid
Vulnsorb®	Tesla	Hitozan/kolagen

¹ Odobreni od FDA

² Nalaze se na spisku medicinskih sredstava registrovanih u R. Srbiji
(izvor: Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije)

Zahvaljujući ovakvom delovanju hitozan ubrzava zarastanje rane i sprečava pojavu ožiljka (65). U sredstvima za zarastanje rana hitozani i njihovi derivati se najčešće nalaze u obliku fibroznih i sunderastih (spužvastih) materijala, hidrogelova, membrana i filmova. Fibrozni materijali na bazi hitozana su postojani, biokompatibilni, netoksični, dobro apsorbuju tečnosti i pokazuju antimikrobno delovanje. Membrane na bazi hitozana i kolagena poseduju dobru antimikrobnu aktivnost, ubrzavaju zarastanje rana podstičući migraciju i proliferaciju ćelija. Hidrogelovi hitozana deluju okluzivno

stimulišući kontrakciju na ozleđenom mestu, ali su istovremeno propustljivi za vlagu, sprečavajući preterano nakupljanje eksudata. Membrane na bazi hitozana najčešće sadrže i dodatni polimer poput alginata, hijaluronske kiseline, polietilenglikol diakrilata, polivinilalkohola i dr. (64).

4.3 Primena hitozana u tkivnom inženjerstvu

Osnovna strategija tkivnog inženjerstva zasnovana je na obnavljanju oštećenog ili patološki izmenjenog tkiva transplantacijom ćelija inkorporiranih u potporne mreže sa biološki aktivnim sredstvima koja podstiču rast transplantiranih ćelija (66,67). Veliki potencijal hitozana za primenu u oblasti tkivnog inženjerstva zasnovan je na njihovoj biodegradabilnosti, biokompatibilnosti, antibakterijskom delovanju, a posebno na gelirajućim sposobnostima, poroznosti i lakoći oblikovanja gelova (67,68). Porozni matriksi na bazi hitozana dobijaju se najčešće jednostavnim postupkom liofilizacije rastvora hitozan-acetata izlivenih u kalupe odgovarajuće veličine i oblika (69). Poroznost nastalih gelova od značaja je ne samo za inkorporiranje ćelija, nego i za lakoću i način na koji se odvija ćelijska migracija (66). Histološkim istraživanjima je potvrđen minimalni inflamatorični potencijal mreža na bazi hitozana, kao i nizak imunološki potencijal (3). Utvrđeno je da se mehanička stabilnost ovih matriksa, lakoća sa kojom ćelije adheriraju na njih i brzina ćelijskog rasta povećavaju sa porastom stepena deacetilacije (70). Poboljšanje mehaničkih svojstava i biološke aktivnosti moguće je postići i hemijskom derivatizacijom hitozana, a naročito izmenama na primarnoj $-NH_2$ grupi (71). Uzimajući u obzir gotovo neograničenu mogućnost hemijske derivatizacije hitozana, potencijal ovih mreža za primenu u tkivnom inženjerstvu je izuzetan. Posebno se istražuje mogućnost primene hitozana i njegovih derivata za obnavljanje koštanog i nervnog tkiva, tkiva jetre i hrskavice (3,49,67,71).

5. Zaključak

Specifična polikatjonska priroda, biodegradabilnost i biokompatibilnost hitozana su osnovna svojstva na kojima se zasniva njihov veliki potencijal za primenu u oblasti biomedicine i farmacije. Posebnu pažnju privlači mukoadhezivnost, hemostatično i antimikrobno delovanje hitozana, što je od značaja za njihovu primenu za ubrzano zarastanje rana i obnavljanje tkiva. Velikom interesovanju za hitozane doprinosi strukturalna raznovrsnost u pogledu stepena deacetilacije i molekulske mase, ali i mogućnost hemijske derivatizacije i dobijanje iz hitina, drugog gradivnog polisaharida po zastupljenosti u prirodi.

Zahvaljujući gelirajućoj sposobnosti, mogućnosti umrežavanja i građenja reverzibilnih polielektrolitnih kompleksa, intenzivno se ispituje mogućnost primene hitozana za izradu koloidnih nosača sa modifikovanim oslobođanjem lekovite supstance. Posebnu pažnju hitozani privlače u oblasti tkivnog inženjerstva zahvaljujući

mogućnosti obrazovanja biokompatibilnih trodimenzionalnih mreža, čiji je porozitet i brzinu degradacije u *in vivo* uslovima moguće kontrolisati.

Širu primenu hitozana trenutno ograničava nerešen regulatorni status, jer njihova strukturna raznovrsnost ima za posledicu razlike u biodistribuciji, biodegradaciji i toksikološkim profilima, što značajno otežava dobijanje GRAS statusa. U toku su brojne toksikološke studije, kojima se detaljno proučavaju mehanizmi delovanja i ispituje bezbednost hitozana u cilju ispunjavanja regulatornih zahteva.

6. Literatura

1. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technol To.* 1998;1(6):246-53.
2. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release.* 2004;100(1):5-28.
3. Kumar MNVR, Muzzarelli R, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 2004;104(12):6017-84.
4. Wong TW. Chitosan and Its Use in Design of Insulin Delivery System. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2009;3(1):8-25.
5. Casettari L, Villasaliu D, Castagnino E, Stolnik S, Howdle S, Illum L. PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Progr Coll Pol Sci.* 2012;37(5):659-85.
6. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31(7):603-32.
7. Srinivasa PC, Tharanathan RN. Chitin/chitosan - safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Rev Int.* 2007;23(1):53-72.
8. Jeon YJ, Kim SK. Production of chitooligosaccharides using ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr Polym.* 2000;41(2):133-41.
9. Illum L. Chitosan and its use as pharmaceutical excipient. *Pharm Res.* 1998;15(9):1326-31.
10. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53(8):1047-67
11. Kubota N, Kikuchi Y. Macromolecular complexes of chitosan. In: Dumitriu S, editor. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility.* Marcel Dekker, New York; 1998. p. 595-628.
12. Vasiliu S, Popa M, Rinaudo M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *Eur Polym J.* 2005;41(5):923-32.

13. Thongngam M, McClements DJ. Characterization of interactions between chitosan and an anionic surfactant. *J Agric Food Chem.* 2004;52(4):987-91.
14. He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm* 1998;166(1):75-88.
15. Wang YZ, Zheng JH, Bao DC, Lin JZ, Sun ZJ, Liu XD, Ma XJ. Mucoadhesive property of chitosan. *J Clin Rehab Tissue Eng Res.* 2007;11(26):5140-3.
16. Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm.* 1992;78(1):43-8.
17. Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, deBoer AG, Vírum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res.* 1997;14(7):923-9.
18. Luessen HL, Lehr CM, Rentel CO, Noach ABJ, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs. *J Control Rel.* 1994;29(3):329-38.
19. Maezaki Y, Tsuji K, Nakagawa Y, Kawai Y, Akimoto M, Tsugita T., et al. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993;57(9), 1439-44.
20. Aranaz I, Mengíbar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol.* 2009;3(2):203-30.
21. Kim CH, Chun HJ. A synthesis of O-diethylaminoethyl chitosan and its binding ability of cholate and deoxycholate anion in vitro. *Polym Bull.* 1999;42(1):25-32.
22. Ogawa S, Decker EA, McClements DJ. Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *J Agr Food Chem.* 2003;51(9):2806-12.
23. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr Polym.* 2003;53(3):337-42.
24. Rao S, Sharma CP. Use of chitosan as biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34(1):21-8.
25. Hernandez-Lauzardo AN, Bautista-Banos S, Velazquez-del Valle MG, Mendez- Montealvo MG, Sanchez-Rivera MM, Bello-Perez LA. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydr Polym.* 2008;73(4):541-547.
26. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 2010;144(1):51-63.
27. Xie YJ, Liu XF, Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydr Polym.* 2007;69(1):142-47.
28. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules.* 2003;4(6):1457-65.

29. Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm Res* 2004;21(1):43-9.
30. Schipper NGM, Vírum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (caco-2) cells. *Pharm. Res.* 1996;13(11):1686-92.
31. Okamoto Y, Kawakami K, Miyatake K, Morimoto M, Shigemasa Y, Minami S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydr Polym.* 2002;49(3):249-52.
32. Ohshima Y, Nishino K, Yonekura Y, Kishimoto S, Wakabayashi S. Clinical application of chitin non-woven fabric as wound dressing. *Eur J Plastic Surg.* 1987;10(2):66-9.
33. Kim SK, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr Polym.* 2005;62(4):357-68.
34. Suzuki K, Tokoro A, Okawa Y. Effect of N-acetylchitooligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol Immunol.* 1986;30(8):777-87.
35. Seo WG, Pae HO, Kim NY, Oh GS, Park IS, Kim YH et al. Synergistic cooperation between water-soluble chitosan oligomers and interferon- γ for induction of nitric oxide synthesis and tumoricidal activity in murine peritoneal macrophages. *Cancer Lett.* 2000;159(2):189-95.
36. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52(2):105-15.
37. Qin C, Du Y, Xiao L, Li Z, Gao X. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int J Biol Macromol.* 2002;31(1):111-7.
38. Park PJ, Je JY, Kim SK. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydr Polym.* 2004;55(1): 17-22.
39. Yen MT, Yang JH, Mau JL. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydr Polym,* 2008;74(4):840-4.
40. Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *J Control Release.* 2012;161(2):496-504.
41. Kofuji K, Qian CJ, Nishimura M, Sugiyama I, Murata Y, Kawashima S. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *Eur Polym J.* 2005;41(11):2784-91.
42. Carreño-Gómez B, Duncan R. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *Int J Pharm.* 1997;148(2):231-40.
43. Minami S, Oh-Oka M, Okamoto Y, Miyatake K, Matsuhashi A, Shigemasa Y, Fukumoto Y. Chitosan-inducing hemorrhagic pneumonia in dogs. *Carbohydr Polym.* 1996;29(3):241-6.
44. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;56(3):290-9.
45. Tapola NS, Lyyra ML, Kolehmainen RM, Sarkkinen ES, Schauss AG. Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of chitosan tablets. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(1):22-30.

46. EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499), maintenance of normal blood LDL - cholesterol concentrations (ID 4663) , reduction of intestinal transit time (ID 466 4) and reduction of inflammation (ID 1985) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 1. EFSA Journal 2011;9(6):2214.
47. Wedmore I, McManus JG, Pusateri AE, Holcomb JB. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *J Trauma*.2006;60(3):655-8.
48. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*. 2008;97(8):2892-923.
49. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2011;36(8):981-1014.
50. European Pharmacopeia fourth Edition, Strasbourg: Council of Europe, 2002.
51. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliver Rev*. 2010;62(1):3-11.
52. Mourya VK, Inamdar NN, Tiwari A. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Adv Mat Lett*. 2010;1(1):11-33.
53. Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. In: Heinze T, editor. *Polysaccharides I* Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 151-209.
54. Domard A, Rinaudo M, Terrassin C. A new method for the quaternization of chitosan. *Int J Biol Macromol*. 1986;8(2):105-7.
55. Suzuki K, Oda D, Shinobu T, Saimoto H, Shigemasa Y. New selectively N-substituted quaternary ammonium chitosan derivatives. *Polym J*. 2000;32(4):334-8.
56. Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol*. 2007;40(3):175-81.
57. Sonia TA, Sharma CP. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective. In: Jayakumar R, Prabaharan M, Muzzarelli RAA, editors. *Chitosan for Biomaterials I*. Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 23-53.
58. Muzzarelli RAA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr Polym*. 2009;77(1):1-9.
59. Čalija B, Milić J, Cekić N, Krajišnik D, Daniels R, Savić S. Chitosan oligosaccharide as prospective crosslinking agent for naproxen-loaded Ca-alginate microparticles with improved pH-sensitivity. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39(1):77-88.
60. Čalija B, Cekić N, Savić S, Daniels R, Marković B, Milić J. pH-sensitive microparticles for oral drug delivery based on alginate/oligochitosan/Eudragit® L100-55 "sandwich" polyelectrolyte complex. *Colloid Surface B*. 2013;110:395-402.
61. Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012; 81(3):463-9.

62. Kokabi M, Sirousazar M, Hassan ZM. PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *Eur Polym J.* 2007;43(3):773-81.
63. Choi YS, Lee SB, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH. Studies on gelatin-based sponges. Part III: A comparative study of cross-linked gelatin/alginate, gelatin/hyaluronate and chitosan/hyaluronate sponges and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat. *J Mater Sci-Mater M.* 2001;12(1):67-73.
64. Jayakumar R, Prabaharan M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29(3):322-37.
65. Paul W, Sharma CP. Chitin and alginates wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs* 2004;18(1):18-23.
66. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* 2003;24(13):2339-49.
67. Di Martino A, Sittiger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials.* 2005;26(30):5983-90.
68. Ho MH, Wang DM, Hsien HJ, Liu HC, Hsien TY, Lai JH, Hou LT. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26:3197-206.
69. Madihally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 1999;20(12):1133-42.
70. Amaral IF, Lamghari M, Sousa SR, Sampaio P, Barbosa MA. Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation. *J Biomed Mater Res.* 2005;75(2):387-97.
71. Suh, JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials.* 2000;21(24): 2589-98.

Characteristics and application of chitosan in pharmaceutical/biomedical preparations

Bojan Čalija^{1*}, Jela Milić¹, Danina Krajišnik¹, Andelka Račić²

¹University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11 221 Belgrade

²University of Banja Luka – Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Save Mrkalja 14, 78 000 Banja Luka

*Corresponding author: e-mail: bojanc@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Chitosans are binary linear heteropolysaccharides derived from chitin by its partial deacetylation.

Due to unique cationic nature these biopolymers have enormous potential in pharmacy and biomedicine. This potential is improved by their chemical versatility (molecular mass and degree of deacetylation) and possibility of chemical derivatisation.

Numerous biological activities of chitosans such as mucoadhesivity, hemostatic, hypocholesterolemic and antimicrobial activity are based on their specific polycationic nature.

Gel-forming, cross-linking and polyelectrolyte complex forming ability make chitosans suitable for design of colloidal drug delivery systems, such as dendrimers, liposomes, micelles, micro- and nanoparticles.

Chitosans as well as their derivates are used in commercially available wound dressings due to their hemostatic activity and ability to stimulate cell proliferation, tissue regeneration process and mild local analgesic effect.

The use of chitosans as dietary supplements has been approved in many countries since their effect on maintenance of normal blood LDL cholesterol concentrations has been confirmed.

Chitosan derivatives, such as N-carboxymethyl chitosan are commonly used in cosmetics, due to their gel and film forming ability, pleasant, hydrating, softening, and protecting effect on skin.

There is a special interest for use of chitosans in tissue engineering due to their ability to form biocompatible porous tridimensional gel networks, whose porosity and *in vivo* degradation can be controlled.

Lack of registered chitosan based products is a consequence of its unsolved regulatory status. Namely, its chemical versatility may affect biodistribution, biodegradation and toxicological profiles, thus making regulatory approval of chitosans as GRAS materials quite difficult.

Keywords: chitosan, chitin, polycation, pharmaceutical/biomedical preparations

Antiproliferativna aktivnost mešovito-ligandnih Cu (II) kompleksa sa pendantnim oktaazamakrociklom *in vitro*

**Sladana B. Tanasković¹, Jelena Antić-Stanković¹,
Mirjana Antonijević-Nikolić²**

¹ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450,
11221 Beograd, Srbija

² Visoka tehnološka škola strukovnih studija, 15000 Šabac, Srbija

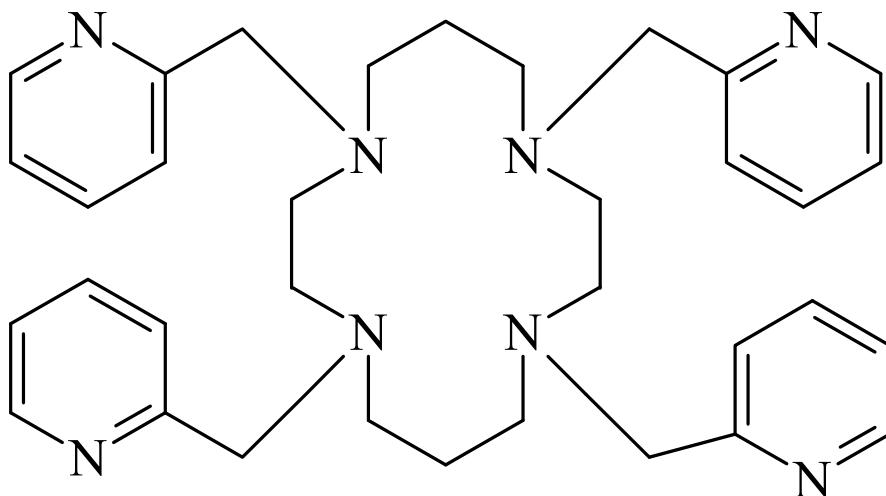
Kratak sadržaj

Četiri katjonska mešovito-ligandna kompleksa Cu(II) sa N,N',N'',N''' -tetrakis(2-piridilmetil)-1,4,8,11-tetraaza-ciklotetradekanom i alifatičnim dikarboksilatima: čilibarnom, glutarnom, adipinskom i sebacinskom kiselinom su ispitivani na humanim malignim ćelijskim linijama: cervikalnog adenokarcinoma (HeLa), melanoma (Fem-X), estrogen pozitivnog karcinoma dojke (MCF-7) i akutne monocitne leukemije (THP1). Uporedo su testirani i sami ligandi, proste soli i rastvarači. Metabolička aktivnost ćelija je određena MTS testom. Svi ispitivani kompleksi su pokazali citotoksični efekat prema testiranim ćelijskim linijama, dok su slobodni ligandi, Cu(II) so i rastvarač (koji su korišćeni kao kontrolni) pod istim uslovima, bili neaktivni. Sa povećanjem broja $-\text{CH}_2-$ grupa homologog niza alifatičnih dikarboksilato liganada dolazi i do povećane citotoksičnosti kompleksa. Najveći citotoksični efekat su pokazali makrociklični Cu(II) kompleksi sa glutarato, adipato i sebacinato ligandima prema MCF-7, a najslabiji prema HeLa ćelijama. Najveći antiproliferativni efekat pokazuje kompleks sa sebacinato ligandom prema svim testiranim linijama tumorskih ćelija u primenjenim koncentracijama od 100 i 200 μM , a najviše prema HeLa ćelijama.

Ključne reči: citotoksičnost, Cu(II)-kompleksi, pendantni oktaazamakrocikli.

Uvod

Makrociklični ligandi, derivati ciklama, koordinacijom sa metalnim jonima grade stabilne komplekse različitih struktura, katalitičkih, redoks i dr. osobina. Neki od njih se koriste kao modeli za aktivne centre metaloenzima, potencijalno su bioaktivni, mogu biti lekovi, katalizatori ili su novi materijali sa posebnim električnim i magnetnim osobinama. U ovoj oblasti zanimljiv je tpmc [1], multidonorni oktaazamakrociklični ligand, potpuno N-substituisan ciklam pendantnim 2-piridilmetil grupama, N,N',N'',N''' -tetrakis(2-piridilmetil)-1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan (Shema 1), koji sa prelaznim metalima gradi mono-, di- odnosno tetranuklearne komplekse. Metalni centri vezani za tpmc, *egzo* ili *endo*, mogu biti ili premošćeni dodatnim ligandom ili su oni vezani u *trans* položaju (po jedan za svaki metalni jon). Pošto poseduje veliku pokretljivost molekula, tpmc se kao i drugi azamakrocikli prilagođava veličini metalnog jona i vezuje najrazličitije vrste dodatnih liganada. Tako su sintetisani mnogi kompleksi prelaznih metala raznovrsnih koordinacionih brojeva i geometrija. Kako su joni Co(II) i Cu(II) bioelementi, njihovi kompleksi, takođe, imaju veliki značaj.



Shema 1 *N,N',N'',N'''-tetrakis(2-piridilmetil)-1,4,8,11-tetraaza-ciklotetradekan (tpmc)*

Scheme 1 *N,N',N'',N'''-tetrakis (2-pyridylmethyl) -1,4,8,11 – tetraazacyclotetradecane (tpmc)*

Makrociklični ligandi su predmet brojnih istraživanja o mogućnosti njihove primene u dijagnostici i lečenju raznih bolesti. Konjugati specifičnih antitela sa makrocikličnim kompleksima koji imaju radioaktivni metalni ion ($^{64}\text{Cu(II)}$ ($t_{1/2}=12,8\text{ h}$), $^{67}\text{Cu(II)}$ ($t_{1/2}=61,5\text{ h}$), $^{111}\text{In(t}_{1/2}=2,83\text{ dana)}$, $^{90}\text{Y(t}_{1/2}=64\text{ h})$ i dr.) [2-5] potencijalno se

mogu upotrebiti za detekciju tumora i u rendgenoimuno terapiji. Konjugat sa tumornom ćelijom uglavnom gradi kovalentne veze pri čemu makrociklični kompleks mora da bude termodinamički stabilan i kinetički inertan *in vivo* u toku nekoliko dana.

Ciklam i njegovi derivati su proučavani kao anti-tumor [6], anti-HIV i antiviralni [7] agensi i pokazali su izvesnu aktivnost u sva tri slučaja. Jedan od značajnih faktora prilikom dizajniranja pojedinih vrsta lekova je njihova lipofilnost tj. mogućnost prolaska leka kroz ćelijsku membranu. J.W. Silbert i saradnici ispitivali su dejstvo ciklama i njegovih derivata na rast tumorske ćelijske linije L1210, *in vitro*, i moguće je da je specifičnost pri prepoznavanju kompleksa sa ciklarama od strane membrane koreceptora proteina određena (definisana) konfiguracijom makrocikla [6].

Kompleksi Co(II) i Mo(VI) sa makrociklima su ispitivani *in vitro* na ćelijama hronične mijelogene leukemije (K562) i tumorskoj liniji humanih promijelocita (U937) [8]. Utvrđeno je da pokazuju visoku toksičnost prema K562 i relativno nisku citotoksičnost prema U937 ćelijama.

Ciklami, takođe, inhibira vezivanje virusa za leukocite, vezujući se za koreceptorski protein CXCR4 na spoljnoj membrani leukocita [9]. Antivirusna aktivnost je proporcionalna jačini formirane veze. Kompleksiranjem sa jonom Zn(II) jačina vezivanja za koreceptor raste, a takođe i anti-HIV aktivnost. Koordinovanje jona Pd(II) ima međutim, za posledicu inaktiviranje leka. Afinitet ciklama prema kompleksirajućem jonom Zn(II) je prilično velika i u fiziološkim uslovima, gotovo celokupna količina leka postoji u obliku kompleksa sa Zn(II). Mada su kompleksi ciklama sa nekim drugim jonica metala termodinamički favorizovani u poređenju sa kompleksom sa Zn(II), građenje kompleksa sa jonom Zn(II) je pri fiziološkim uslovima kinetički favorizovano. Sem toga, relativno neuobičajena konfiguracija makrocikla u kompleksu sa Zn(II) je stabilizovana vezivanjem sa karboksilatnim bočnim nizovima koreceptora CXCR4. Naime, karboksilatni atomi O glutamata i aspartata iz bočnog niza CXCR4 mogu se koordinovati direktno za jon Zn(II) iz kompleksa sa ciklaram, a takođe mogu i da grade vodonične veze sa –N-H grupama ciklama.

Cilj ovog rada je ispitivanje antiproliferativne aktivnosti tpmc liganda (derivata ciklama) i kompleksa Cu(II) sa tpmc-om i nekim dikarboksilatima kao dodatnim ligandima kao i samih liganada, prostih soli i primenjenih rastvarača, u *in vitro* uslovima.

Eksperimentalni deo

Kompleksi $[\text{Cu}_4(\text{succ})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Cu}_4(\text{glut})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2), $[\text{Cu}_4(\text{adip})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3) i $[\text{Cu}_4(\text{seb})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4) su pripremljeni i prečišćeni kao što je opisano u literaturi [10,11]. Korišćeni rastvarači i reagensi su bili čistoće p.a.

Priprema osnovnog rastvora i kulture ćelija

Rastvori testiranih supstanci 1-4 i kontrolnih supstanci pripremljeni su u DMSO koncentracije 10 mM, filtrirani kroz Millipor filter (0,22 µm) i razblaženi u hranljivom medijumu do određenih radnih koncentracija (10, 50, 100 i 200 µM). Za sve korišćene ćelije, hranljivi medijum je RPMI 1640 bez fenol crvenog, uz dodatak L-glutamina (3 mM), streptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 IU/mL), seruma govedđeg fetusa (10%; FBS; 56 °C inaktiviran topotom) i HEPES (25 mM), i doteran pH na 7,2 bikarbonatnim puferom.

Linija humanih malignih ćelija cervikalnog adenokarcinoma (HeLa; American Type Culture Collection, USA), melanoma (Fem-X; American Type Culture Collection, USA), estrogen pozitivnog karcinoma dojke (MCF-7; American Type Culture Collection, USA) su gajene kao monolejer u hranljivom medijumu, dok je ćelijska linija humane akutne mono-citne leukemije (THP1; American Type Culture Collection, USA) održavana kao suspenzija u istom hranljivom medijumu. Sve ove ćelije su gajene na 37 °C u 5% CO₂. Metabolička aktivnost ćelija određena je MTS testom (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, USA) [12]. Ćelije (10⁵ ćelija/mL) su inkubirane sa testiranim supstancama, u mikrotitracionim pločama sa 96 bazena 48 h, u finalnoj zapremini od 100 µL. Koncentracije ispitivanih kompleksa bile su u rasponu od 10 do 200 µM. Kontrolne ćelije su u istom vremenskom periodu, inkubirane u hranljivom medijumu. Nakon ovog perioda, u svaki uzorak dodato je 10 µL MTS reagensa ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenill)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolium]). Nakon 3 h inkubacije (37 °C), merena je absorbanca na 492 nm, čitačem Tecan Safire 2 (Tecan, Mannedorf/Zürich, Switzerland). Statistička obrada rezultata je urađena ANOVA testom.

Rezultati i diskusija

Različiti tipovi antikancerogenih agenasa, uključujući, naravno, i farmaceutska jedinjenja, ispitivani su na *in vitro* efikasnost [13-16]. U ovom radu je pokazano da testirani, oktaazamakrociklični Cu(II) kompleksi sa alifatičnim dikarboksilatima [Cu₄(succ)(tpmc)₂](ClO₄)₆·2H₂O, [Cu₄(glut)(tpmc)₂](ClO₄)₆·2H₂O, [Cu₄(adip)(tpmc)₂](ClO₄)₆·7H₂O, [Cu₄(seb)(tpmc)₂](ClO₄)₆·6H₂O) pokazuju citotoksična svojstva, prema testiranim ćelijskim linijama: MCF-7, HeLa, Fem-X i THP1, *in vitro*. Citotoksični efekat testiranih kompleksa prikazan je u Tabeli I.

Tabela I Vrednosti optičke gustine na 492 nm za ćelijske kulture inkubirane 48 h, sa testiranom supstancom ili bez nje

Table I Values of optical density at 492 nm for cell culture incubated 48 h, with or without tested substances

A. MCF-7 ćelijska linija

conc. (μM)	kompleksi			
	1	2	3	4
0	0,803 \pm 0,042	0,803 \pm 0,042	0,803 \pm 0,042	0,803 \pm 0,042
10	0,874 \pm 0,030	0,791 \pm 0,040	0,753 \pm 0,022	0,881 \pm 0,032
50	0,851 \pm 0,022	0,751 \pm 0,031	0,802 \pm 0,023	0,912 \pm 0,022
100	0,822 \pm 0,014	0,653 \pm 0,012*	0,713 \pm 0,032	0,213 \pm 0,044***
200	0,693 \pm 0,034*	0,291 \pm 0,030***	0,213 \pm 0,022***	0,182 \pm 0,041***

B. HeLa ćelijska linija

conc. (μM)	kompleksi			
	1	2	3	4
0	0,823 \pm 0,022	0,823 \pm 0,022	0,823 \pm 0,022	0,823 \pm 0,022
10	0,801 \pm 0,050	0,802 \pm 0,031	0,623 \pm 0,012	0,390 \pm 0,031**
50	0,794 \pm 0,033	0,793 \pm 0,041	0,481 \pm 0,010*	0,383 \pm 0,021**
100	0,782 \pm 0,052	0,751 \pm 0,023	0,430 \pm 0,041*	0,194 \pm 0,022***
200	0,651 \pm 0,032*	0,623 \pm 0,041*	0,473 \pm 0,032*	0,222 \pm 0,021***

C. Fem-X ćelijska linija

conc. (μM)	kompleksi			
	1	2	3	4
0	0,842 \pm 0,051	0,842 \pm 0,051	0,842 \pm 0,051	0,842 \pm 0,051
10	0,833 \pm 0,032	0,751 \pm 0,042	0,793 \pm 0,021	0,783 \pm 0,032
50	0,794 \pm 0,023	0,723 \pm 0,010	0,603 \pm 0,022*	0,552 \pm 0,020*
100	0,821 \pm 0,010	0,652 \pm 0,011*	0,412 \pm 0,032**	0,372 \pm 0,041**
200	0,773 \pm 0,032	0,551 \pm 0,011*	0,503 \pm 0,021*	0,300 \pm 0,031***

D. THP-1 ćelijska linija

conc. (μM)	kompleksi			
	1	2	3	4
0	0,843 \pm 0,031	0,843 \pm 0,031	0,843 \pm 0,031	0,843 \pm 0,031
10	0,832 \pm 0,031	0,701 \pm 0,041	0,723 \pm 0,031	0,753 \pm 0,040
50	0,751 \pm 0,050	0,692 \pm 0,041	0,602 \pm 0,051*	0,554 \pm 0,022*
100	0,734 \pm 0,032	0,543 \pm 0,021*	0,393 \pm 0,032**	0,374 \pm 0,041**
200	0,713 \pm 0,032*	0,454 \pm 0,021**	0,251 \pm 0,030***	0,192 \pm 0,041***

Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (ćelije inkubirane u hranljivom medijumu bez supstanci): * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,0001$

Significantly different values from control (vehicle-treated cells) are denoted:

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,0001$

Svi testirani kompleksi ispoljili su antiproliferativnu aktivnost prema ispitivanim ćelijskim linijama, izuzev kompleksa 1, koji nije imao efekat na proliferaciju Fem-X ćelija. Antiproliferativni efekat je bio statistički značajan u odnosu na kontrolne ćelije, kada su testirani kompleksi korišćeni u koncentracijskom rasponu od 10 do 200 μM (Tabela I). Najznačajniji efekat pokazao je kompleks 4. Svi testirani nekoordinisani ligandi, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i rastvarači nisu pokazali antiproliferativni efekat, što ukazuje na to da je ispoljena aktivnost tj. sprečavanje rasta i razmnožavanja testiranih ćelija, posledica delovanja samih kompleksa. Dobijeni rezultati ukazuju da je citotoksični efekat u korelaciji sa koncentracijom testiranog kompleksa. IC50 vrednosti ispitivanih kompleksa su u rasponu od 11,53 do 175,00 μM protiv svih testiranih ćelijskih linija (Tabela II). Najveću aktivnost pokazuje kompleks sa sebacinato ligandom prema HeLa ćelijama. Očigledno je da se citotoksična aktivnost povećava od kompleksa 1, sa sukcinato ligandom, do kompleksa 4, sa sebacinato ligandom, što je posledica povećanja broja -CH₂- grupa homologog niza dikarbonskih kiselina. Povećavanjem broja metilenskih grupa povećava se i hidrofobni karakter kompleksa. To je u skladu sa činjenicom da su ćelijske membrane liposolubilne, tako da kompleks sa višim stepenom hidrofobnih osobina lakše prodire u ćeliju a time je i citotoksični efekat izraženiji. Na antiproliferativnu aktivnost kompleksa značajno utiče i helatni efekat koji čini kompleks termodinamički stabilnijim u odnosu na komplekse sa vezanim monodentatnim ligandima i smanjuje mogućnost disocijacije kompleksa u primjenom rastvaraču. Time je i specifičnost pri prepoznavanju kompleksa helatne strukture od strane membrane određena konfiguracijom makrocikla [6]. Pored ovog efekta, na biološku aktivnost kompleksa značajan uticaj ima i nanelektrisanje kompleksnog jona, priroda kontra jona, broj centralnih metalnih jona po molekulu, centralni metalni jon, rastvorljivost, tip i dužina veze između metala i liganada itd [17].

Tabela II Vrednosti IC50 (μM) ispitivanih kompleksa nakon 48 h inkubacije sa MCF 7, HeLa, FemX i THP 1 određen na osnovu rezultata MTS testa

Table II IC50 (μM) for the 48 h of action of investigated compounds on the MCF 7, HeLa, FemX and THP1 cells determined by MTS test

Kompleks	MCF 7	HeLa <i>IC50 ± SD*(μM)</i>	FemX	THP1
1	>200	>200	>200	>200
2	162,50±1,83	>200	>200	>200
3	157,00±2,68	175,00±5,04	96,05±3,71	91,67±2,51
4	84,64±4,19	11,53±1,15	90,18±3,21	84,72±2,79

* Koncentracija ispitivanih kompleksa koja u kulturama MCF 7, HeLa, FemX i THP1 celija smanjuje preživljavanje za 50%

*Concentrations of examined compounds that induced a 50% decrease in MCF 7, HeLa, FemX and THP1 cell survival

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja citotoksičnog efekta mešovito-ligandnih kompleksa Cu(II) sa pendantnim oktaazamakrociklom i dikarbonskim kiselinama (ćilibarna, glutarna, adipinska i sebacinska) prema MCF7, HeLa, Fem-X i THP1, možemo zaključiti da testirani kompleksi pokazuju antikancerogeni efekat. S obzirom da molekularni mehanizmi po kojima ispitivani azamakrociklični dikarboksilato Cu (II) kompleksi ispoljavaju svoje antiproliferativno dejstvo, nisu poznati, u daljim istraživanjima pažnju treba usmeriti na efekat ove grupe jedinjenja na ćelijski ciklus malignih ćelija kao i na programiranu ćelijsku smrt. Takođe, treba utvrditi selektivnost ovih kompleksa u odnosu na zdrave ćelije.

Zahvalnica

Zahvaljujemo se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Projekat br. 175011) na finansijskoj podršci.

Literatura

1. Narayanan J, Sosa-Torres ME, Toscano RA, Article.1,4,8,11-tetrakis(2-pyridyl-methyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane. *J Chem Crystallogr.* 2001;3:129-133.
2. Morphi JR, Parker D, Alexander R, Bains A, Carne AF, Eaton MAW. Antibody labelling with functionalised cyclam macrocycles. *J Chem Soc Chem Commun.* 1988;3:156-8.
3. Morphi JR, Parker D, Kataky R, Harrison A, Eaton MAW. Towards tumour targeting with copper-radiolabelled macrocycle–antibody conjugates. *J Chem Soc Chem Commun.* 1989;10:792-4.
4. Craig AS, Helps IM, Jankowski KJ, Parker D, Beeley NRA, Boyce BA, et al. Towards tumour imaging with indium-111 labelled macrocycle–antibody conjugates. *J Chem Soc Chem Commun.* 1989; 12:794-6.
5. Cox JPL, Jankowski KJ, Kataky R, Parker D, Beeley NRA, Boyce BA et al. Synthesis of a kinetically stable yttrium-90 labelled macrocycle–antibody conjugate. *J Chem Soc Chem Commun.* 1989;12:797-8.
6. Sibert JW, Cory AH, Cory JG. Lipophilic derivatives of cyclam as new inhibitors of tumor cell growth. *J Chem Soc Chem Commun.* 2002;2:154-5.
7. Paisey SJ, Sadler PJ. Anti-viral cyclam macrocycles: rapid zinc uptake at physiological pH. *J Chem Soc Chem Commun.* 2004;3:306-7.
8. Katsarosa N, Katsarou M, Sovilj S, Babić-Samardžija K, Mitić M. Biological Activity of Some Cobalt(II) and Molybdenum(VI) Complexes: in vitro Cytotoxicity. *Bioinorg Chem Appl.* 2004; 2(3-4):193-207.
9. Liang X, Parkinson JA, Weishaupl M, Gould RO, Paisey SJ, Park HS, et al. Structure and dynamics of metallomacrocycles: recognition of zinc xylyl-bicyclam by an HIV coreceptor. *J Am Chem Soc.* 2002;124(31):9105-12.
10. Vučković G, Antonijević-Nikolić M, Lis T, Mroziński J, Korabik M, Radanović DD. X-ray analyses, spectroscopic and magnetic properties of $[Cu_4(\text{succinato})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $[Cu_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})\text{tpmc}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 0.5\text{CH}_3\text{OH} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ complexes. *J Mol Struct.* 2008;872:135-44.
11. Antonijević-Nikolić M, Tanasković SB, Vučković G. Microbiological characterization of the related Co(II)/Cu(II) complexes with octaazamacrocyclic and carboxylates. 7th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry. Septembar 2004 Beograd: 799-801, Proceedings Vol II (in extenso).
12. Barltrop J.A. et al. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purplewater-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg Med Chem Lett.* 1991;1: 611-4.

13. Dendrinou-Samara C, Psomas G, Raptopolou CP, Kessissoglou DP. Copper(II) complexes with phenoxyalkanoic acids and nitrogen donor heterocyclic ligands: structure and bioactivity. *J Inorg Biochem.* 2001;83:7-16.
14. Rubner G, Bensdorf K, Wellner A, Bergemann S, Gust R. Synthesis, Characterisation and Biological Evaluation of Copper and Silver Complexes based on Acetylsalicylic Acid . *Arch Pharm Chem Life Sci.* 2011;344:684-8.
15. Buczkowska M, Bodtke A, Lindequist U, Gdaniec M, Bednarski PJ. Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Cu (II), Co (II), Pt (II) and Zn (II) Complexes with N,O-Chelating Heterocyclic Carboxylates. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 2011;233:605-16.
16. Chandra S, Anupma, Deepali J, Soni RK, Soam S. Synthesis and Spectral Studies of Ni(II) and Cu(II) Complexes with a New Azamacrocyclic Ligand. *Int J Curr Chem.* 2011;2:235-42.
17. Cowan JA. Inorganic Biochemistry. 2nd ed. New York: Wiley-VCH; 1997. 364 p .

Antiproliferative activity of mixed-ligand Cu(II) complexes with pendant octaazamacrocycles *in vitro*

**Sladana B. Tanasković¹, Jelena Antić-Stanković¹,
Mirjana Antonijević-Nikolić²**

¹ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450,
11221 Belgrade, Serbia

² Higher Technological School of Professional Studies 15000 Šabac, Serbia

Summary

Four cationic mixed-ligand complexes of Cu (II) with *N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetrakis (2-pyridylmethyl) -1,4,8,11 -tetraazacyclotetradecane (tpmc) and aliphatic dicarboxylic acids: succinic, glutaric, adipic and sebacic were investigated *in vitro* on the human cervix adenocarcinoma (HeLa), human malignant melanoma (Fem-x), oestrogen-receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells and the human acute monocyte leukemia *cell* line (THP1), while free ligands, Cu(II) salt and solvent (used as a controls) were inactive on the same conditions. The metabolic activity of the cells was determined by tetrazolium MTS test. All complexes showed cytotoxicity toward the used cell lines, while free ligands, Cu(II) salt and solvent (used as a controls) were inactive on the same conditions. Increasing the number of -CH₂- groups in homologous serie of aliphatic dicarboxylate ligands leads to the increasing cytotoxic activity of the complex. The highest cytotoxic effect of azamacrocycle Cu(II) complexes with glutarate, adipate, sebacinate ligand showed on the cell line MCF-7 and the worst on HeLa cells. A significant effect of sebacinate Cu(II)complex to all tested tumor cell lines applied in concentrations of 100 and 200 µM and up to HeLa cells.

Keywords: cytotoxic, Cu (II)-complexes, pendant oktaazamacrocycle.

Kozmetovigilanca - uspostavljanje sistema praćenja neželjenih efekata kozmetičkih preparata

Ivana Mirković^{1*}, Gordana Vuleta², Snežana Savić²

¹ Novartis Pharma Services Inc., Bul. Zorana Đinđića 71/ VI/18,
11070 Beograd, Republika Srbija

² Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Republika Srbija

* Autor za korespondenciju: inamirkovic@yahoo.com

Kratak sadržaj

Potreba i svest ljudi za unapređenjem fizičkog izgleda je iz godine u godinu, prema raznim vrstama istraživanja i sprovođenja postmarketinških ispitivanja, u stalnom porastu. Shodno tome i proizvodnja, upotreba i potrošnja kako sredstava za ličnu higijenu, tako i samih kozmetičkih proizvoda postaje sve popularnija kod ogromnog broja potrošača. Uredba (EU) 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima, usvojena 30. novembra 2009. godine, propisala je neophodne uslove za stavljanje kozmetičkog proizvoda na tržište koji između ostalog obuhvataju i neophodne dokaze o bezbednosti kozmetičkog proizvoda (svih njegovih sastojaka) za potrošače, pri primeni pod normalnim i predvidivim uslovima korišćenja. Uprkos neosporno visokom procentu bezbednosti i podnošljivosti kozmetičkih proizvoda, neželjeni efekti su ipak prisutni i najčešće su blage ili srednje blage jačine i uglavnom se manifestuju na koži. Kozmetovigilanca predstavlja skup definisanih aktivnosti koje imaju za cilj otkrivanje, procenu, razumevanje, evidenciju i preveniranje neželjenih događaja koji se potencijalno mogu javiti kao posledica primene kozmetičkih proizvoda. Uredba (EU) 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima, koja je zvanično i u potpunosti stupila na snagu 11. jula 2013, zahteva od svih proizvodča imenovanje odgovorne osobe koja će kontinuirano pratiti i evidentirati sprovođenje kozmetovigilance za njihove proizvode koji se nalaze na tržištu. U ovom radu će biti predstavljeni podaci preuzeti iz sprovedenih studija koje su imale za cilj procenu pojave neželjenih dejstava pri primeni kozmetičkih proizvoda, spoznajenje različitih modela njihovog otkrivanja, praćenja i preveniranja, kao i uspostavljanje standardnog sistema kozmetovigilance.

Ključne reči: Uredba (EU) 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima;
neželjeni efekti kozmetičkih proizvoda; kozmetovigilanca

Uvod

Kozmetička direktiva 76/768/EEC doneta 27. jula 1976. godine od strane Saveta Evropske zajednice (EEZ), danas Evropske unije (EU/EC), predstavljala je zakonski propis koji se odnosio na kozmetičke proizvode unutar zemalja tadašnjih članica EEZ (1).

Prema Kozmetičkoj direktivi (76/768/EEC) kozmetički proizvod se definiše kao bilo koja supstanca ili preparat koji dolazi u kontakt sa različitim spoljašnjim delovima ljudskog tela (koža, kosa, nokti, usne i spoljni genitalni organi) ili sa zubima i sluzokožom usne duplje sa ciljem da ih čiste, parfimišu, menjaju njihov izgled i/ili koriguju miris tela i/ili štite, odnosno održavaju ga u dobrom stanju. Od 1976. godine direktiva se stalno menjala i pratila trendove koje nameću tržište i kozmetička industrija, ali i sami potrošači koji žele efikasne i bezbedne proizvode (2).

Krajem novembra 2009. godine Kozmetička direktiva je preimenovana u Uredbu o kozmetičkim proizvodima EU (eng. *Regulation (EC) N° 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products*) (2).

Kozmetička uredba 1223/2009 predstavlja odgovarajući pravni instrument koji nameće jasna i detaljna pravila državama članicama i osigurava da se zakonski propisi primenjuju u isto vreme u celoj Evropskoj uniji (EU/EC). Ova Uredba sveobuhvatno usklađuje propise Evropske unije u cilju postizanja kontrole unutrašnjeg tržišta kozmetičkih proizvoda, istovremeno obezbeđujući visok nivo zaštite ljudskog zdravlja.

Uredba 1223/2009 odnosi se samo na kozmetičke proizvode, a ne na lekove, medicinska sredstva i biološke proizvode (2). Procena da li je proizvod u kategoriji kozmetičkog proizvoda sprovodi se tako što se u obzir uzimaju sve karakteristike tog proizvoda, a konačan stav je utemeljen na studiji svakog slučaja ponaosob (eng. *case-by-case assessment*).

U tački 9 Uredbe 1223/2009 navodi se da kozmetički proizvodi moraju biti bezbedni u normalnim ili razumno predvidivim uslovima korišćenja, a posebno, takozvani odnos rizik - korist ne sme biti korišćen kao opravdanje u slučaju postojanja rizika po ljudsko zdravlje.

Uprkos neosporno visokom procentu bezbednosti i podnošljivosti kozmetičkih proizvoda, neželjeni efekti su ipak prisutni i najčešće su blage ili srednje blage jačine, uglavnom se manifestujući na koži. Kozmetovigilanca predstavlja skup definisanih aktivnosti koje imaju za cilj otkrivanje, procenu, razumevanje, evidenciju i preveniranje neželjenih događaja koji se potencijalno mogu javiti kao posledica primene kozmetičkih proizvoda (3).

U okviru člana 2 Kozmetičke uredbe 1223/2009, nalaze se definicije kozmetičkih proizvoda, supstance, krajnjeg korisnika, nanomaterijala, konzervansa, boja, UV filtera, povlačenja kozmetičkih proizvoda, kao i opisi koji se odnose na (4):

- „neželjeni efekat“ - označava nepovoljne reakcije po zdravlje ljudi koje se mogu pripisati normalnoj ili realno predvidivoj upotrebi kozmetičkog proizvoda
- „ozbiljan neželjeni efekat“ koji kao rezultat ima trajnu ili privremenu funkcionalnu onesposobljenost, invaliditet, hospitalizaciju ili neposredan rizik od vitalnog značaja ili smrt.

Prema svemu navedenom nikako se ne sme zanemariti činjenica da iako se kozmetički proizvodi generalno dobro podnose, oni ipak mogu dospeti i unutar ljudskog organizma i dovesti do nekog tipa neželjene reakcije.

Propisi o kozmetičkim proizvodima i kozmetovigilanci

Propisi o kozmetičkim proizvodima prevashodno se odnose na bezbednu primenu proizvoda od strane ogromnog broja zdravih korisnika. Zahtevi zakonodavnih tela prema proizvođačima kozmetičkih preparata su jasno definisani i prema njima proizvođači su u obavezi da navedu sve komponente koje ulaze u sastav kozmetičkog proizvoda na etiketi unutrašnjeg pakovanja i/ ili na spoljašnjoj ambalaži.

Prva velika izmena propisa o kozmetičkim proizvodima u EU, doneta je 1993. godine, a stupila je na snagu 1997. godine, i poznata je kao 6. Amandman na Kozmetičku direktivu (2). Stupanjem na snagu 6. Amandmana na Kozmetičku direktivu pooštreni su zahtevi u pogledu potrebe da se sa rutinskih testova na životinjama pređe na alternativne *in vitro* metode ispitivanja toksičnosti, odnosno bezbednosti pojedinačnih komponenti kozmetičkog proizvoda u celini (5).

Proizvođači su zakonski obavezani i da nakon distribuiranja proizvoda na tržište sprovedu kontinuirano praćenje i izvrše identifikaciju potencijalno izazvanih neželjenih reakcija. Nakon stupanja na snagu 7. Amandmana evropske kozmetičke Direktive (76/768/EEC), u februaru 2003. godine, navedeno je i to da postojeći podaci o neželjenim efektima, koji su se javili pri primeni nekog kozmetičkog proizvoda i mogu uticati na zdravlje ljudi, moraju biti lako dostupni, kako nadležnim organima tako i celokupnoj javnosti. Iako proizvođači maksimalno prate bezbednosni profil sopstvenih proizvoda, ne sme se zanemariti činjenica da uvek može postojati potencijalni sukob interesa, što je još jedan od razloga neophodnosti uvođenja jedinstvenog sistema praćenja neželjenih dejstava kozmetičkih proizvoda (2).

Od januara 2007. godine na snazi je i dokument koji je objavila Evropska komisija, koncipiran kao „*Beskompromisna bezbednost*“ u kom se navodi da se rizik po bezbednost potrošača kozmetičkih preparata ne sme nikako narušiti bez obzira na koristi primene samog proizvoda. Ovaj dokument predstavlja krucijalnu razliku između regulative kozmetičkih proizvoda u odnosu na regulativu medicinskih proizvoda (lekova), gde je jedan od zahteva obavezno sprovođenje rizik - korist analiza za svaki proizvod (6).

Radna grupa u okviru Saveta Evrope postavila je sebi za cilj izradu nacrta rezolucije, odnosno organizacije evropskog sistema kozmetovigilance, namenjenog zaštiti javnog zdravlja potrošača. Savet Evrope, odbor ministara (957 članova) je 2006. godine usvojio Rezoluciju o praćenju vigilance neželjenih efekata kozmetičkih proizvoda („kozmetovigilanca“) u Evropi (7).

Ova rezolucija je imala za cilj praćenje pojave neželjenih efekata izazvanih primenom kozmetičkih preparata, procene rizika po zdravlje ljudi i uspostavljanje korektivnih procedura. Rezolucija je rezultat pilot studije koja je sprovedena u toku 2004. i 2005. godine na teritoriji Austrije, Danske, Norveške i Francuske, a odnosila se na ocenjivanje odnosa potrošača i stručnih lica prema prijavljivanju i praćenju neželjenih dejstava reakcije izazvanih primenom kozmetičkih preparata. Prema rezultatima studije, samo manji broj korisnika (25 %-36%) koji su imali vrlo izraženo teže neželjeno dejstvo je za pomoć konsultovalo lekara, a 15% ovih zabeleženih slučajeva je bilo vrlo ozbiljno. Ispitanici iz ove studije su kao najčešće prijavljivano neželjeno dejstvo navodili alergijski kontaktni dermatitis (76,5%-83,9%). Na osnovu dobijenih rezultata takođe je primećeno da su proizvodi za negu kože, farbe za kosu i preparati za negu kose najčešći uzročnici izazvanih neželjenih dejstava (6).

Uporedo sa ovom rezolucijom, Evropska asocijacija za trgovinu kozmetičkim proizvodima, sredstvima za higijenu i parfemima - COLIPA (sada Cosmetics Europe) je u avgustu 2005. godine izdala „*Praktične vodiče za prijave neželjenih dejstava*“ kao uniformno oruđe u pogledu prikupljanja, obrade i razvitka prijave neželjenih događaja. Deo ovog dokumenta je bio posvećen diskusiji o razmatranju procene uzroka neželjenog efekta (uzročne veze između neželjenog efekta i načina upotrebe kozmetičkog proizvoda). Procena uzroka i nastanka neželjenog dejstva i njegove veze sa načinom primene preparata predstavljala je jedan od ključnih praktičnih zahteva s obzirom da je određen broj neželjenih reakcija izazvan upravo neadekvatnom primenom proizvoda (8).

Rezultati studija o neželjenim efektima kozmetičkih proizvoda

U anketi koja je sprovedena 2006. godine na teritoriji Italije, u kojoj je ispitan 3478 potrošača, njih 848 je prijavilo da je imalo iskustva sa nekim neželjenim efektom pri primeni kozmetičkog preparata. Pri istraživanju je potvrđeno da je veliki broj potrošača potcenio ove efekte ako su blage i srednje blage jačine, obustavljajući primenu preparata i ne tražeći stručnu pomoć. Kao drugi problem, koji je takođe imao značajnu ulogu u tačnosti evidentiranih podataka, identifikovana je neprecizna definicija kriterijuma i različito vrednovanje i procena ozbiljnosti ovih efekata (7, 9).

Uporedo sa anketom u julu 2006. godine na teritoriji Italije (regija Kampanja) sprovedena je pilot studija u cilju testiranja ponuđenih sistema praćenja neželjenih efekata kozmetičkih proizvoda. Pripremljen je odgovarajući formular za popunjavanje podataka koji je prosleđen odabranim dermatolozima i farmaceutima iz ove regije kao

odgovarajućoj profesionalnoj kategoriji. Studija je trajala oko godinu dana, a dobijeni rezultati su nakon detaljne obrade prezentovani i publikovani u junu 2007. godine. Tokom ovog perioda sakupljeno je ukupno 40 relevantnih prijava. Studiju je sprovedio 21 dermatolog, od kojih je 8 imalo prijavu nekog tipa neželjene reakcije (jedan lekar je imao 11 slučajeva, dok su 2 lekara imala po 6 popunjениh prijava), a 3 farmaceuta je usmeno primilo 8 prijava. Prijavljene neželjene reakcije bile su blage i umereno blage jačine i uglavnom su se manifestovale na koži (6).

Sprovedena studija ukazala je i na potencijalne propuste kao i na pravac u kom treba preduzeti odgovarajuće mere u cilju unapređenja kozmetovigilance. Kao najčešći propust pokazalo se neadekvatno popunjavanje predloženih formulara koji su podrazumevali minimum potrebnih podataka i kriterijuma neophodnih za razumevanje i procenu nastalog neželjenog događaja. Upravo iz tog razloga prvi važan korak pri uspostavljanju sistema praćenja neželjenih događaja bio je unapređenje samog formulara, što je podrazumevalo adekvatno definisanje pitanja u pogledu procene uzroka (minimum neophodnih kriterijuma). Podjednako važno bilo je i podizanje svesti potrošača o prisutnosti pojave neželjenih reakcija pri upotrebi kozmetičkih proizvoda, kao i formiranje navike da se ovi događaji redovno prijavljuju (10).

Najveće realne poteškoće određivanja incidence neželjenih efekata kozmetičkih proizvoda i sredstava za čišćenje (kućna hemija) predstavljale su, i još uvek predstavljaju, samodijagnostika i samolečenje potrošača bez prijave neželjenog događaja proizvođaču ili stučnom licu. Još 1999. godine Francuska agencija za bezbednost medicinskih proizvoda (AFSSAP- French Agency for the Safety of Healthcare Products) preuzela je zadatak kreiranja i implementacije kozmetovigilance na teritoriji Francuske, sistema praćenja koji je za cilj imao razvoj standardnih procedura za prijavu neželjenih efekata izazvanih primenom kozmetičkih preparata (11-13).

Kako bi se poboljšali kontakti sa potrošačima, u Francuskoj su u sklopu kompanija proizvođača kozmetičkih proizvoda obrazovani potrošački centri koji se mogu kontaktirati svakodnevno, direktno ili posredstvom porodičnog lekara.

Kompanija Unilever je na osnovu pomenutih procedura 2003. godine uspostavila sopstveni standardni sistem prikupljanja i praćenja neželjenih efekata, podržan od postojećeg odseka potrošača koji je već imao izgrađenu saradnju sa dermatolozima. Ovaj sistem je obuhvatao već prikupljene prijavljene slučajeve neželjenih reakcija (uglavnom na koži) pri primeni njihovih proizvoda, kao i slučajeve dobijene sprovedenom analizom baziranim na algoritmima farmakovigilance koju su sproveli dermatolozi (13).

Prikazani slučajevi su prikupljani u skladu sa standardnim procedurama, spontanim prijavljivanjem od strane potrošača koji su putem telefona, pošte ili imejla kontaktirali potrošački odsek kompanije Unilever (3). Popunjavanje standardnih upitnika putem telefonskih razgovora sprovela su specijalno obučena lica potrošačkog

centra. Standardni upitnici su formirani tako da obezbede neophodne podatke koji su podrazumevali ne samo hronološke podatke (prvu primenu, vreme do pojave neželjene reakcije...) već i pitanja u vezi sa detaljima koji bi opisali što kompletniju kliničku sliku (deo tela gde se reakcija javila, izgled same reakcije...). Izgled standardnog upitnika koji su koristili u kompaniji Unilever za prikupljanje podataka o potencijalnim neželjenim reakcijama na korišćene kozmetičke proizvode prikazan je na Slici 1. Minimum neophodnih podataka koje je ispitanik trebalo da popuni su: naziv proizvoda, serijski broj proizvoda i lični podaci osobe koja prijavljuje neželjenu reakciju (ime, prezime, adresa, broj telefona i imejl adresa).

Kako bi imali što jasniju sliku neželjenog događaja potrebno je bilo odgovoriti što preciznije na sledećih devet pitanja (originalni standardni upitnik na engleskom jeziku dat je u okviru Slike 1):

1. Datum početka primene problematičnog suspektnog proizvoda?

2. Datum kada se javila neželjena reakcija na koži?

3. Deo tela na kome se reakcija pojavila?

- Glava Da Ne
- Lice Da Ne
- Vrat Da Ne
- Leđa Da Ne
- Stomak Da Ne
- Pazušna regija (desna, leva) Da Ne
- Ruke (desna, leva) Da Ne
- Noge (desna, leva) Da Ne
- Šake (desna, leva) Da Ne
- Stopala (desno, levo) Da Ne

4. Doživljaj reakcije?

- Pečati ili crvenilo Da Ne
- Svrab Da Ne
- Peckanje Da Ne

5. Da li je ranije postojala senzacija ovoga tipa? Da Ne

- ako je odgovor potvrđan, da li je reakcija uzrokovana primenom istog proizvoda Da Ne

6. Da li je prekinuto sa primenom proizvoda? Da Ne

7. Koliko dugo je proizvod korišćen?

8. Da li je konsultovan lekar?

- ako je odgovor potvrđan, ispitanik je zamoljen za odobrenje da lekar bude kontaktiran (telefon ili adresa lekara)

9. Da li je neželjena reakcija otklonjena? Da Ne

- Ako je odgovor potvrđan
 - ✓ Koliko vremena je bilo potrebno da se neželjena reakcija povuče?
 - ✓ Da li je korišćena neka terapija? Da Ne (navesti šta je korišćeno)
- Ako je odgovor negativan
 - ✓ Ispitanik bi bio zamoljen za dozvolu da nakon dve nedelje bude ponovo kontaktiran zbog dodatnih informacija

Product name:						
Production code:						
Surname:						
Dossier no.:						
First name:						
Address:						
Tel.:						
Email address:						
Please fill in the following questionnaire to enable us to examine the situation you have experienced:						
N.B.: you must tick a box for each item of the questionnaire.						
1- On what date did you start using the product? Day: Month: Year:						
2- On what date did the first skin reaction occur? Day: Month: Year:						
3- What part of the body is affected?						
* Scalp	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	* Arms	R <input type="checkbox"/>	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
* Face	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	L <input type="checkbox"/>	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
* Neck	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	* Legs	R <input type="checkbox"/>	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
* Back	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	L <input type="checkbox"/>	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
* Abdomen	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	* Hands	R <input type="checkbox"/>	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
* Armpits R	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	L <input type="checkbox"/>	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
L	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	* Feet	R <input type="checkbox"/>	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
			L <input type="checkbox"/>	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
4- Are you experiencing:						
* patches or redness	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>				
* itching	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>				
* a burning sensation	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>				
5- Have you experienced this type of sensation before? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
* If so, with the same product? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
6- Have you stopped using the product? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
7- How long did you use it for?						
8- Have you seen a doctor? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
* If so, do you give permission for your doctor to provide our consultant physician with information on this incident? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
* Please state your doctor's contact details (address + tel.) :						
9- Has the reaction resolved? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
* If so, -How long did it take? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
-Did you require treatment? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
-If so, please specify: Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
* If not: we will contact you again in a fortnight's time, with your permission, to determine the outcome of the reaction.						
Thank you for answering our questions.						

Slika 1 Standardni upitnik korišćen tokom prijave neželjenih reakcija na kozmetičke proizvode

Figure 1 Questionnaire used to report the adverse effects to cosmetics products

Svim anketiranim potrošačima je savetovan prekid upotrebe proizvoda koji je izazvao neželjenu reakciju, a u slučajevima ozbiljnijih neželjenih reakcija sugerisana je i obavezna konsultacija sa lekarom. Potrošači su zatim, nakon dve nedelje od inicijalne prijave neželjene reakcije, bili ponovo kontaktirani od strane potrošačkog centra kako bi se obezbedile dodatne informacije u vezi sa neželjenim događajem. U slučajevima gde je konsultovan lekar, potrošač je zamoljen za dozvolu kontaktiranja ordinirajućeg lekara u cilju što kompletnije i jasnije celokupne kliničke slike (3). Upitnik koji je korišćen nakon dve nedelje od inicijalne prijave, u slučajevima kada je ispitanik pri prvom anketiranju naveo da neželjena reakcija nije nestala i koji je koncipiran kao poslednje pitanje na inicijalnom upitniku, prikazan je na Slici 2.

As agreed, we are contacting you again to follow up your report regarding an allergic reaction, and would be grateful if you would kindly answer the following questions:

Has the reaction resolved? Yes No

IF SO
• How long did it take? _____

• After treatment? Yes No

If so, please specify: _____

Thank you for answering our questions.

If the consumer cannot be reached by phone: send a standard letter with Question 9.
The completed questionnaire shall be given to the consultant physician.
(Questionnaire + contact form + consumer response letter).

Slika 2 Formular korišćen dve nedelje posle prijave neželjene reakcije na kozmetički proizvod

Figure 2 Questionnaire used two weeks after the reported adverse effects to cosmetics products

Iako se sa prikupljanjem i analizom podataka počelo 2004. godine, publikovani su podaci iz 2005., 2006. i 2007. godine i oni su obuhvatali ukupno 102 689 slučajeva prijave potrošača, odnosno kontaktiranja potrošačkog centra. Ova procedura prijave se odnosila na sve proizvode Unilever kompanije (proizvodi za negu kože, sredstva za ličnu higijenu, sredstva za negu kose, paste za zube, dezodoransi, sredstva za pranje i čišćenje). Nakon sveobuhvatne i detaljne analize prikupljenih podataka ustanovljeno je da je kod 842 potrošača došlo do pojave neke vrste neželjene reakcije na koži, što predstavlja svega 0,82%. Ako se poređenje izvrši sa brojem prodatih proizvoda ove kompanije u tom periodu, pojava neželjene reakcije na koži se javlja kod 0,144 % slučajeva u odnosu na milion prodatih proizvoda (3).

Usvojeni postmarketinški sistemi kozmetovigilance razlikuju se od zemlje do zemlje, posebno u pogledu zahteva upitnika za beleženje neželjenih reakcija (obavezno

ili opcionalno), profesionalne kategorije ovlašćene za prikupljanje i izveštavanje o slučajevima (npr. dermatolozi, farmaceuti, stomatolozi), a različita su i regulatorna tela koja su zadužena za sistem vigilance (npr. Agencija za bezbednost hrane, Agencija za zaštitu životne sredine, Agencija za zaštitu potrošača i javnog zdravlja...) (3, 14).

U nekim zemljama se primenjuju i privatne inicijative sa zvaničnom kozmetovigilancem ili bez nje. Francuska je u avgustu 2004. zvanično ratifikovala kozmetovigilancu dostupnu stručnoj javnosti (zdravstvenim radnicima). Ovaj sistem je objedinio različite resurse potrebne za praćenje i sprečavanje pojave neželjenih reakcija povezanih sa trenutno dostupnim kozmetičkim proizvodima na tržištu. Obrazac za obaveštenje o kozmetovigilancu, koji se koristi za prijavu neželjenih reakcija na kozmetičke preparate, dostupan je i može se popuniti na sajtu francuske agencije za bezbednost AFSSAPS (*eng. French Agency for the Safety of Healthcare Products*) (<http://www.afssaps.sante.fr>) (15-17).

Proizvođači u Francuskoj su dužni da se aktivno uključe u kreiranje takozvane Nacionalne kozmetovigilance, tako što su u obavezi (u skladu sa uslovima i zahtevima iz člana L5131-6, „French Public Health Code“) da naprave bazu podataka o neželjenim događajima na kozmetičke proizvode, koju će redovno dopunjavati i koja će biti dostupna i raspoloživa na sajtu AFSSAPS (6,15).

Iako je mnogo toga urađeno u poslednjih nekoliko godina kako bi se poboljšalo i unapredilo praćenje bezbednosnog profila kozmetičkih proizvoda, efikasan i nezavisan zvaničan sistem procene bezbednosti ovih proizvoda još uvek nije uspostavljen. Navodi se da nedostaje jedinstvena zvanična mreža koja bi obuhvatila celokupnu teritoriju EU.

Stupanjem na snagu svih delova Uredbe (EU 1223/2009) o kozmetičkim proizvodima, 11. jula 2013. godine, proizvođači će biti u obavezi da imaju odgovorno lice koje će kontinuirano pratiti i beležiti, vršiti postmarketinški nadzor neželjenih efekta, potencijalno nastalih upotrebom kozmetičkih proizvoda, odnosno imaće obavezu da sprovode kozmetovigilancu.

Zaključak

Kozmetovigilanca predstavlja skup definisanih aktivnosti koje imaju za cilj otkrivanje, procenu, razumevanje, evidenciju i preveniranje neželjenih reakcija koje se potencijalno mogu javiti kao posledica primene kozmetičkih proizvoda.

Sprovođenje ovog sistema je neophodno kako bi se izbegla i smanjila neželjena dejstva kozmetičkih proizvoda koja se najčešće mogu javiti u vidu senzibilizacije, iritacije, alergijske reakcije, a sve u cilju sprečavanja nastanka potencijalnih rizika po zdravlje potrošača.

U sprovođenju kozmetovigilance neophodno je da se kontinuirano unapređuje upitnik kojim se prijavljuju neželjena dejstava, jer predstavlja osnov za praćenje bezbednosti proizvoda, ukazuje na eventualne potrebe ponovne procene bezbednosti i

čini osnovu za sprovodenje daljih važnih koraka kao što su sistem upozorenja u EU i povlačenje proizvoda sa tržišta.

Uredba EU 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima, koja je postavila odredbe o sistemu kozmetovigilance, u potpunosti je stupila na snagu od 11. jula 2013. godine, što bi trebalo da osigura još veću bezbednost i kvalitet, kako novih tako i već postojećih kozmetičkih preparata na tržištu.

Literatura

1. Cosmetics Directive 76/768/EEC art. 1 [online]. Available from URL: <http://eur-lex.europa.eu> [Accessed 2007 Oct 12]
2. Official Journal of the European Union (2009.) Regulation (EC) N^o 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products; Directive 93/35/EEC amending Directive 76/768/EEC [online]. Available from URL: <http://eur-lex.europa.eu> [Accessed 2007 Oct 15]
3. Understanding the Adverse Effects of Cosmetics, A Pilot Project in Cosmetovigilance, Lidia Sautebin (Department of Experimental Pharmacology, University of Naples Federico II, Naples, Italy)
4. Jocić D, Primorac M, Vučeta G, Milić J. Bezbednost kozmetičkih proizvoda – regulatorni aspekti. Arh farm 2011; 61 (5): 478-500
5. Dweck AC. European Cosmetic Directive Consolidated. Personal care 2010; 3 (1): 13-18
6. Cosmetovigilance, The 'Beautiful' Risk, Ugo Moretti and Giampaolo Velo (Clinical Pharmacology Unit, University of Verona, Verona, Italy)
7. Menne T, Wahlberg JE, European Environmental and Contact Dermatitis Research Group. Risk assessment failures of chemicals commonly used in consumer products. Contact Dermatitis 2002; 46 (4): 189-90
8. Comité de Liaison des Associations Europeennes de l'Industrie de la Parfumerie, des Produits Cosmétiques et de Toilette. Guidelines On the Management of Undesirable Event Reports 2005: Available at: <http://www.colipa.eu/publications.html?Itemid=71&catid=2&task=viewprod&id=62>
9. Schnuch A, Uter W, Geier J, et al. Epidemiology of contact allergy: an estimation of morbidity employing the clinical epidemiology and drug-utilization research (CE-DUR) approach. Contact Dermatitis 2002; 47 (1): 32-9
10. Council of Europe, Committee of Ministers, 979th meeting of the Ministers' Deputies: Resolution ResAP(2006) IE on a vigilance system for undesirable effects of cosmetic products ("cosmetovigilance") in Europe in order to protect public health [online]. Available from URL: <http://www.coe.int/> [Accessed 2007 Oct 17]

11. Tissier MH, Lepagnol F. Cosmetovigilance: a French pharmacovigilance system for cosmetics developed by the French health products safety agency. A proposal for the future. Therapie 2002; 57: 273–82. [In French]
12. Di Giovanni C, Arcoraci V, Gambardella L et al. Cosmetovigilance survey: are cosmetics considered safe by consumers? Pharmacol Res 2006; 53: 16–21
13. Sautebin L. Understanding the adverse effects of cosmetics: a pilot project in cosmetovigilance. Drug Saf 2008; 31:433–6
14. Sportellio L, Cammarota S, de Portu S et al. Notification of undesirable effects of cosmetics and toiletries. Pharmacol Res 2009; 59: 101–6
15. Agence Francaise de Securite' Sanitaire des Produits de Sante'. Re'solution ResAP (2006)1 relative a` un syste'me de veille concernant les effets inde'sirables des produits cosme'tiques ("cosme'tovigilance") en Europe destine' a` prote'ger la sante' publique. [In French] Available at: <http://www.afssaps.fr/content/download/2299/21424/version/2/file/resolution-effets-indesirables-produitscosmetiques.pdf>
16. French Government. Law no. 2004-806, article L5131-9 from the public health code; Journal Officiel 11 August 2004
17. French Government. Law no. 2004-806, article L5131-6 from the public health code. Journal Officiel 11 August 2004

Cosmetovigilance – establishing the system for monitoring of adverse effects to cosmetic products

Ivana Mirković^{1*}, Gordana Vuleta², Snežana Savić²

¹ Novartis Pharma services Inc., Bul. Zorana Djindjica 71/VI/18,
11070 Belgrade, Serbia

² University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of pharmaceutical technology and cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Summary

Both production and consumption of personal hygiene products and cosmetics have been increasing in popularity with an ever growing number of consumers, which is where cosmetovigilance is becoming more relevant through a set of its own activities, aiming at the detection, assessment, identification, and prevention of adverse effects potentially occurring as a result of the application of cosmetic products. The Regulation (EC) 1223/2009 on cosmetic products stipulates not only the conditions necessary for placing a cosmetic product on the market, but also includes the necessary documentation of the safety of cosmetic products to consumers in order to avoid potential adverse effects. This Regulation sets the basic terms of the cosmetovigilance system, which shall enter into force on the 11th of July 2013, which will further ensure the safety and quality level of both new and existing cosmetics on the market. Furthermore, for the continued implementation of cosmetovigilance, it is essential to promote the application of an adverse effects questionnaire that is in accordance with regulation as being a prerequisite for the implementation of future major steps, such as: warning system within the EU and withdraw from the market.

Keywords: Regulation (EC) 1223/2009 on cosmetics;
adverse effects of cosmetics products; cosmetovigilance

Prilozi – Contributions

IZVEŠTAJ SA 61. SIMPOZIJUMA SAVEZA FARMACEUTSKIH UDRUŽENJA SRBIJE

Organizator: Savez farmaceutskih udruženja Srbije

Vreme i mesto: Zlatibor, 10-13.oktobar 2013.

11.10.2013.

KURS 1.

Uloga farmaceuta u savremenom zdravstvenom sistemu

Rešenje broj:153-02-2848/2013-01 od 16.08.2013.

Oznaka kursa: B-344/13

Broj bodova za predavače: 11

Broj bodova za slušaoce: 6

Kurs je akreditovan za farmaceute, farmaceute specijaliste farmaceutske zdravstvene zaštite i farmaceute specijaliste farmaceutske tehnologije i kozmetologije

Ciljevi kursa:

1. Promene u obrazovanju farmaceuta kao odgovor na novu ulogu u zdravstvenom sistemu
2. Koncept farmaceutske zdravstvene zaštite - pacijent u fokusu
3. Redefinisanje značaja izrade magistralnih i galenskih lekova u individualizaciji terapije
4. Uvođenje novih usluga kao deo savremenog poslovanja apoteke
5. Pojam kompetencija u farmaciji i način procene

PROGRAM KURSA 1.

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
9.00-9.30	Farmacija: pogled u budućnost	predavanje	Zorica Vujić
9.30-10.00	Koncept farmaceutske zdravstvene zaštite kao osnov kompetentnosti farmaceuta	predavanje	Branislava Miljković
10.00-10.30	Izrada magistralnih i galenskih lekova - doprinos bolesnicima u zdravstvenom sistemu Srbije	predavanje	Gordana Vuleta, Ljiljana Đekić, Bojan Čalija
10.30-11.00	Pauza		
11.00-11.30	Farmaceutske usluge u apoteci - izazov za savremeno poslovanje	predavanje	Sanja Jović
11.30-12.00	Razvojem kompetencija do unapređenja farmaceutske usluge	predavanje	Svetlana Stojkov
12.00-13.00	Diskusija		
13.00-14.00	Pauza za ručak		
14.00-16.00	Istraživanje farmaceutske zdravstvene zaštite – primeri iz prakse	radionica	Tatjana Milošević, Roland Antonić
16.00-16.30	test	Evaluacija kursa	

Satelitski simpozijum

17.00-17.30 MSF pharm: Lutein - pririodna zaštita oka, dr Vesna Jakšić

12.10.2013.

KURS 2.

Unapređenje farmaceutske usluge osobama obolelim od dijabetesa

Kurs je akreditovan odlukom br.153-02-1827/2013-01 od 13.05.2013.

Oznaka kursa: B-194/13

Broj bodova za učesnike: 6

Broj bodova za predavače: 12

Kurs je akreditovan za farmaceute

Ciljevi kursa

1. Dijagnoza i terapija dijabetesa - šta farmaceuti moraju da znaju
2. Upoznavanje učesnika sa farmakokinetikom, karakteristikama i prednostima primene savremenih insulinskih preparata MI i GLP1
3. Nova saznanja i preporuke u oblasti samokontrole glikemije u tipu 2 dijabetesa
4. Upoznavanje učesnika sa lečenjem metaboličkog sindroma i povezanost sa pojavom dijabetesa
5. Unapređenje usluge farmaceuta u menadžmentu dijabetesa u apoteci, pravilnom upotrebom medicinskih sredstava u samokontroli dijabetesa

PROGRAM KURSA 2.

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
9.30-10.00	Otvaranje i Ulazni test		
10.00-10.30	Unapređenje usluge osobama obolelim od dijabetesa	predavanje	Sanja Jović
10.30-11.00	Pravilna upotreba medicinskih sredstava u terapiji i praćenju dijabetesa	predavanje	Biljana Manojlović
11.00-11.15	Pauza		
11.15-12.15	Unapređenje usluge izdavanja medicinskog sredstva u apoteci - bezbednost pacijenta	radionica	Nada Šarik-Stojsavljević, Sanja Jović, Biljana Manojlović
12.15-13.00	Pauza za ručak		
13.00-13.20	Dijagnoza dijabetesa	predavanje	Aleksandra Jotić
13.20-13.40	Striktna kontrola glikemije	predavanje	Katarina Lalić
13.40-14.00	Terapija dijabetesa: Nove preporuke	predavanje	Nebojša Lalić
14.00-14.10	Diskusija		
14.10-14.25	Pauza		
14.25-14.45	Savremeni agensi u lečenju dijabetesa: MI i GLP1	predavanje	Branislava Miljković
14.45-15.05	Novi lekovi u lečenju gojaznosti	predavanje	Dragan Micić
15.05-15.15	Duskusija		
15.15-16.15	Dijagnoza i terapija dijabetesa	radionica	Katarina Lalić, Aleksandra Jotić
16.15-16.45	Izlazni test i evaluacija		

16.45 – 17.00 Ključni momenti - 90 godina kompanije Novo Nordisk

Izložba:
Hotel Mona

Prezentacije predavanja su objavljene na CD-u.

Simpozijumu je prisustvovalo 236 registrovanih učesnika.

Tokom održavanja simpozijuma učesnici su posetili izlagače i razgovarali sa stručnim saradnicima o novim lekovima, medicinskim sredstvima i dijetetskim proizvodima.

Posebnu zahvalnost dugujemo članovima sekcije Mladi farmaceuti *Marini Mirković i Zorani Miladinović*, za veliku pomoć u distribuciji štampanog materijala, registraciji učesnika, izdavanju uverenja.

Zahvaljujemo se svim kolegama koji su svojim prisustvom podržali ovaj skup i svim onima koji su popunili Anketu i na taj način nam omogućili da procenimo uspešnost skupa i da se upoznamo sa interesovanjima, primedbama i predlozima, kako bismo ubuduće organizovali još uspešnije simpozijume.

ANALIZA ANKETE SPOROVEDENE NA 61. SIMPOZIJUMU

UKUPNO REGISTROVANIH UČESNIKA 236

1. Opšta ocena Kursa 1

1. Odličan	68
2. Vrlo dobar	19
3. Dobar	4
4. Zadovoljava	2
5. Ne zadovoljava	0
Ukupno:	93
Nije odgovorilo	11

2. Da li ste zadovoljni ?

1. Organizacija

1. Veoma zadovoljan	87
2. Zadovoljan	6
3. Nisam zadovoljan	0
Ukupno:	93
Nije odgovorilo	11

2. Sala

1. Veoma zadovoljan	78
2. Zadovoljan	11
3. Nisam zadovoljan	0
Ukupno:	89
Nije odgovorilo	15

3. Oprema

1. Veoma zadovoljan	76
2. Zadovoljan	7
3. Nisam zadovoljan	0
Ukupno:	83
Nije odgovorilo	21

4. Šta vam se najviše dopalo?

1. Tema i predavanja	23
2. Predavači	3
3. Radionica	15
4. Organizacija	8
5. Druženje	5
Ukupno:	54
Nije odgovorilo	50

5. Šta vam se nije dopalo?

1. Sala	0
2. Probijanje termina	0
2. Mesto održavanja	0
Ukupno:	0
Nije odgovorilo	104

Ocene predavača KURS 1

Registrovanih učesnika: **236**

Opšta ocena Kursa 1: **4,64**

OCENE PREDAVAČA - KURS 1								
	PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	RANG
1	ZORICA VUJIĆ	81	12	2	0	0	4,41	4
2	BRANISLAVA MILJKOVIĆ	75	17	2	0	0	4,32	6
3	GORDANA VULETA	77	19	0	0	0	4,43	3
4	SANJA JOVIĆ	75	18	1	1	0	4,35	5
5	SVETLANA STOJKOV	68	20	3	0	0	4,13	7
6	TATJANA MILOŠEVIĆ- Radionica	84	11	3	0	0	4,55	2
7	ROLAND ANTONIĆ - Radionica	85	11	2	0	0	4,57	1

KURS 2

1. Opšta ocena KURSA 2

1. Odličan	67
2. Vrlo dobar	20
3. Dobar	4
4. Zadovoljava	2
5. Ne zadovoljava	0
Ukupno:	93
Nije odgovorilo	11

2. Da li ste zadovoljni ?

1. Organizacija

1. Veoma zadovoljan	85
2. Zadovoljan	8
3. Nisam zadovoljan	0
Ukupno:	93
Nije odgovorilo	11

2. Sala

1. Veoma zadovoljan	86
2. Zadovoljan	13
3. Nisam zadovoljan	0
Ukupno:	89
Nije odgovorilo	15

3. Oprema

1. Veoma zadovoljan	75
2. Zadovoljan	8
3. Nisam zadovoljan	0
Ukupno:	83
Nije odgovorilo	21

4. Šta vam se najviše dopalo?

1. Tema i predavanja	20
2. Predavači	13
3. Radionica	8
4. Organizacija	8
5. Druženje	5
Ukupno:	54
Nije odgovorilo	50

5. Šta vam se nije dopalo?

1. Sala	0
2. Probijanje termina	0
2. Mesto održavanja	0
Ukupno:	0
Nije odgovorilo	104

Predavači nisu ocenjivani

Registrovanih učesnika: **279**
Opšta ocena Kursa 2: **4,61**

Beograd, 12.11.2013.
Stručni i Organizacioni odbor 61. simpozijuma SFUS

IZVEŠTAJ SA 41. MEĐUNARODNOG KONGRESA ISTORIJE FARMACIJE

Pariz, 10-14. septembar 2013. godine

Ove godine, Međunarodni kongres istorije farmacije, 41. po redu, održan je od 10. do 14. septembra 2013. godine u Parizu. Organizaciju su preuzeли Međunarodno društvo istorije farmacije (ISHP) i Francusko društvo istorije farmacije. Kongresne aktivnosti odvijale su se u centru Pariza, na Univerzitetu Pjer i Mari Kiri. Glavne teme kongresa, *Istorijska farmacija i Parmentier – život i delo*, proistekle su iz želje da se obeleže godišnjica osnivanja Francuskog društva istorije farmacije (1913) i smrti Antoana Parmentijea, vojnog farmaceuta (1813). Učešće u radu uzeo je veliki broj kolega iz 25 zemalja. Održano je 5 plenarnih predavanja, 78 usmenih izlaganja, a poster sekcija brojala je 44 poster prezentacije. Svi radovi predstavljeni su na jednom od tri zvanična jezika – francuskom, nemačkom ili engleskom. I ovaj Kongres obeležila je raznovrsnost tema, od vojne farmacije, preko veza Francuske i ostalih zemalja kroz istoriju, istorijata istorije farmacije ili različitih apotekarskih ustanova, upotrebe vina i hrane u svrhe lečenja ili predstavljanja poznatih proizvođača lekova ili kozmetike (*Roche ili Guerlain*, na primer). Na ovaj način, sve aktivnosti su još jednom doprinele da učesnici u prijatnoj kongresnoj atmosferi razmene i obogate svoja znanja i uspostave ili prodube svoje veze sa drugim istoričarima farmacije.

Kongresu su prisustvovala i dva učesnika iz Srbije – Milica Mirić sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Jasmina Arsić iz Zdravstvene ustanove Apoteka Vranje. Koleginice su predstavile dve zapažene poster prezentacije koje su rezultat istraživanja istorije apotekarstva i proizvodnje lekova u Vranju: *130^e anniversaire de pharmacie à Vranje (Serbie)* i *Pionniers de la fabrication industrielle des médicaments en Serbie*. Povodom proslave 145. godišnjice apotekarstva u Kruševcu prezentovana je poster prezentacija *One hundred and forty five years of pharmacy in Kruševac*.

Pred otvaranje Kongresa, u zgradji Francuske farmaceutske komore (*Ordre de pharmaciens*) održan je sastanak proširenog sastava Izvršnog odbora ISHP. Ovom sastanku je kao nacionalni delegat prisustvovala Milica Mirić. Na sastanku su, pored izveštaja o dosadašnjem radu, obavljeni i izbori za nov sastav uprave Društva. Tom prilikom, naša koleginica doc. dr Dušanka Krajnović sa Katedre za socijalnu farmaciju i farmaceutsko zakonodavstvo Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu jednoglasno je izabrana za novog generalnog sekretara.

Na ceremoniji zatvaranja Kongresa najavljen je naredni, 42. Međunarodni kongres istorije farmacije, koji će biti održan od 8. do 11. septembra 2015. godine u Istanbulu. Takođe su najavljene i teme Kongresa – *Predstavljanje farmacije kroz vekove* (Presenting Pharmacy through Centuries), *Dvorska farmacija* (Court Pharmacy) i *Farmacija i umetnost* (Pharmacy and Art).

Mr Milica Mirić, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dipl. ph. spec. Jasmina Arsić, ZU Apoteka Vranje

IN MEMORIAM

Mr ph Mirjana Barišić (1931-2013)

Mirjana Barišić (devojačko Rausavljević) rođena je 31.1.1931. u Zemunu. U rodnom gradu završila je osnovnu školu i gimnaziju. Školske 1950/51. godine upisala je Farmaceutski fakultet u Beogradu, gde je i diplomirala 11.7. 1955. godine.

Po završetku studija obavlja staž, polaže stručni ispit i ostaje da radi u apoteci „Fruška gora”. Tada postaje član Srpskog farmaceutskog društva (danas Savez farmaceutskih udruženja Srbije). Kada je otvorena dežurna apoteka „Zemun”, 1959. godine, nastavlja rad u dežurnoj službi.

Za upravnicu apoteke „Zemun”, izabrana je 1965. godine. Kao novinu uvela je redovne, stručne sastanke farmaceuta i farmaceutskih tehničara iz aktuelnih oblasti farmacije i medicine.

Direktor OOUR-a „Olga Dedijer” Apotekarske ustanove „Beograd” (danasa Apoteka „Beograd”) postala je 1980. godine. Realizovala je početak rada osam novih apoteka i OOUR-a: „Prof. Siniša Đaja”, „Prof. Miloš Mladenović”, „Blok 28”, „Blok 61-62”, „Novi Beograd”, „Svetozar Marković”, „Sutjeska” i apotekarske stanice „Zmaj”. Zahvaljujući svojim stručnim i organizacionim sposobnostima uspešno je rukovodila radom 23 apoteka na teritoriji opština Zemun i Novi Beograd. Stvorila je uslove za uvođenje novih, specijalističkih disciplina iz farmaceutske tehnologije i



farmakoinformatike (danас farmakoterapija). U socijalističkom ekonomskom sistemu, sa radničkim savetom OOUR-a, kao najvišim telom u kreiranju poslovne politike, ažurno je sprovodila donete odluke. Kao direktor OOUR-a odlazi u penziju 1991. godine.

Posedovala je autoritet koji je dozvoljavao i razvijao dobru ideju, drugačije mišljenje, ali i stav kritičkog mišljenja, bez neprofesionalnog ponašanja.

Umrla je u svom rodnom Zemunu 26.07.2013. godine.

Ostaje zapis o ličnosti koja je svojim profesionalnim autoritetom učestvovala u unapređenju i razvoju farmaceutske delatnosti u Apotekarskoj ustanovi „Beograd”, u vremenu koje obeležava početak savremenih trendova apotekarske delatnosti.

Mirjana Barišić ostaće u sećanju njenih kolega, farmaceuta, farmaceutskih tehničara i saradnika.

Prim. mr ph Tatjana Kolarska