

UDK 615 (497.11)

ISSN 0004-1963 (Štampano izd.)
ISSN 2217-8767 (Online)

ARHIV ZA FARMACIJU

Godina 65

Broj 5

Beograd, 2015.

ČASOPIS SAVEZA
FARMACEUTSKIH
UDRUŽENJA SRBIJE

5/2015

SADRŽAJ – CONTENTS

Pregledni radovi – Review articles

- **Katarina Nikolić, Slavica Filipić, Danica Agbaba** **287**
Polypharmacology of dopamine D₁-like receptor antagonists
Polifarmakologija antagonista dopaminskih D₁-receptora

- **Aleksandra Buha, Vesna Matović** **304**
Osnovni principi izučavanja toksikologije smeša
Basic principles of toxicological evaluation of mixtures

Stručni radovi – Professional papers

- **Ana Emeti, Dragana Vasiljević, Marija Primorac, Gordana Vuleta** **316**
Kozmetičke sirovine poreklom iz mora u proizvodima za negu kože
Cosmetic ingredients from the sea in skin care products

Prilozi – Contributions

- **Izveštaj o realizaciji međunarodnog projekta
„Povezivanje industrije i univerziteta
u nastavi industrijske farmacije”** **326**

Polypharmacology of dopamine D₁-like receptor antagonists

Katarina Nikolic^{*}, Slavica Filipic, Danica Agbaba

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

* Corresponding author:

Katarina Nikolic, PhD, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

tel: +381-11-3951-259, fax: +381-11-3974-349

e-mail adresa: knikolic@pharmacy.bg.ac.rs

Abstract

Drug discovery based on development of selective ligands for a specific target intended to modulate its activity and revert pathophysiological process is now recognized as too simplistic to design effective agent for complex multifactorial diseases, characterized by diverse physiological dysfunctions caused by deregulations of complex networks of proteins. Major challenge in modern drug discovery is to rationally design multitarget drugs able to specifically modulate only a group of desired targets while minimizing interactions with off-targets. Multifactorial cerebral mechanisms implicated in mental (psychiatrics) and neurodegenerative diseases and interactions of the neurotransmitter systems are two main reasons for applying polypharmacology („multi-target”) strategy in drug discovery for these complex brain diseases. In this paper we review polypharmacological profile and potential therapeutic application of dopamine D₁-like receptor antagonists.

Keywords: polypharmacology, multitarget drugs, dopamine receptors

Polypharmacology

Modern drug design of multitarget ligands able to specifically modulate complex networks of proteins and show unique polypharmacological profiles is becoming increasingly important in drug discovery for complex brain diseases [1-5].

The most significant advantages of use of multitarget drugs over the other therapeutic strategies is based on: improved efficacy as result of synergistic or additive effects caused by simultaneous and specific interactions with chosen palette of biological targets; better distribution in target tissue for simultaneous action on multiple targets; accelerated therapeutic efficacy in terms of initial onset and achievement of full effect; treatment of broader therapeutic range of symptoms; predictable pharmacokinetic profile and mitigated drug-drug interactions; lower incidence of molecule-based side effects; increased therapeutic interval of doses; better quality of treatment; improved patient compliance and tolerance; and lower incidence of developing target-based resistance as result of modulation of multiple targets [1, 6, 7].

Designed Multiple Ligands (DMLs) contain the primary pharmacophore elements for each target which could be separated by linker (conjugate DMLs), touched at one point (fused) or combined by using commonalities in the structures of underlying pharmacophores (merged) [7, 8]. Relatively rigid and small structures of highly merged DMLs result in better physicochemical, pharmacokinetic and pharmacological profile [7, 8].

Based on the predicted activities on the targets and estimated pharmacokinetic profiles of designed multipotent ligands are selected the most promising candidates for further study [8-12].

Multifactorial cerebral mechanisms and deregulation of very complex networks of proteins implicated in mental (schizophrenia) [13, 14] and neurodegenerative disorders [15], such as Parkinson's [16, 17] and Alzheimer's diseases [18]), have generated intense interest in developing efficient multipotent CNS drugs [19-21]. Interactions of the neurotransmitter systems, such as the dopamine-glutamate interaction in pathogenesis of schizophrenia and Parkinson's disease [22, 23] and the serotonin-dopamine interaction in pathogenesis of various disorders including schizophrenia, depression, Parkinson's disease and drug abuse [24, 25, 26], are very important factors in design of multitargeted ligands with optimized pharmacological effects.

Therefore, a more efficient polypharmacology strategy for treatment of complex mental/neurodegenerative diseases is based on specific interactions on set of targets with minimal side effects arising from interaction with defined antitargets [1, 27].

As a result of multitarget approach [1, 7, 28, 29] many efficient CNS drugs have been developed. Monoamine reuptake inhibitors with serotonin 5-HT_{2C} antagonistic properties were developed as novel class of antidepressants [6, 30]. Dopamine D₂/D₃

antagonists, with 5-HT_{2A} antagonistic and 5-HT_{1A} partial agonistic activities were proposed as drug candidates for therapy of schizophrenia [19, 31, 32].

While many neurotransmitter systems contribute to the complex pathology of schizophrenia, dopamine dysfunction is considered as the basis of this disorder. The dopamine hypothesis of schizophrenia is supported by the characteristics of the drugs used to treat this disorder: all antipsychotics used clinically have high affinity for dopamine receptors [33].

Parkinson disease (PD), a neurodegenerative disorder of unknown etiology, is characterized by extensive degeneration of dopaminergic neurons within the substantia nigra, resulting in tremor, rigidity, and bradykinesia. One treatment strategy is the use of Dopamine receptor agonists, which act directly on the depleted nigrostriatal dopaminergic system and have fewer undesirable side effects than L-DOPA. Dopamine receptor agonists can be used in conjunction with lower doses of L-DOPA in a combined therapy approach [33].

Pathophysiology of Alzheimer's disease (AD) includes progressive loss of cholinergic neurons, extracellular deposition of amyloid β peptide (A β)-containing plaques, metal dyshomeostasis, neuroinflammation, oxidative stress and increased monoamine oxidase (MAO) enzyme activity. Therefore, multipotent brain permeable drugs affecting few brain targets involved in the disease pathology, such as MAO and ChE enzymes, A β generation/aggregation and iron accumulations were extensively studied as essential therapeutic approach in treatment of AD [28, 34-43].”

Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) modeling and related cheminformatic methods are developed and applied in helping to guide computer-aided-drug-design (CADD) [44, 45] and in polypharmacology for design of ligands with unique polypharmacological profiles [8, 46]. Design of compounds with unique polypharmacology and optimal ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) profile involve several steps such as: formation of chemical analogues of a lead, predicting their binding profiles using a group of ligand-based QSAR models, and synthesizing the most promising candidates with the preferred multitarget activities [8-10].

For example, the MAO A/B and AChE/BuChE inhibiting activities of multitarget donepezil and tacrine hybrids [35, 38, 39, 40, 42, 43, 47] were used in our recent 3D-QSAR and **ASS234** optimisation studies [36, 37].

Dopamine D₁-like receptor antagonists

Five distinct GPCRs (D₁-D₅ receptors) have been cloned and determined to mediate the actions of dopamine. The DA receptors are distinct from one another in pharmacology, amino acid sequence, distribution, and physiological function. Based on

their effector-coupling profiles dopamine receptors are organized into two families, the D₁-like (D₁, D₅) and D₂-like (D₂, D₃, D₄) receptors [33].

Dopamine D₁ receptor is predominantly found in the direct pathway of the striato-nigral neurons [48, 49]. The main physiological function of the D₁ receptor is to mediate CNS actions of dopamine to control cognitive function [50] and movement [51, 52].

The physiological processes under dopaminergic control include reward, emotion, cognition, memory, and motor activity. Dysregulation of the dopaminergic system is critical in a number of disease states, including Parkinson disease, Tourette's syndrome, bipolar depression, schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder, and addiction/substance abuse [33]. Dopamine receptor antagonists are a mainstay in the pharmacotherapy of schizophrenia.

Mice lacking the D₁ receptor display deficits in multiple forms of memory, such as impaired spatial memory and deficits in prefrontal cortex-dependent working memory. Therefore the pharmacological evidence that cortical working memory can be modulated with D₁ agonists and antagonists is in agreement with the previous findings [33].

Since D₁ and D₅ receptors possess about 80% homology in their transmembrane domains these two receptors are grouped as D₁-like receptors. Pathophysiology of schizophrenia and related diseases is mainly based on dysfunctions in dopamine, serotonin, and glutamate, [33, 53, 54]. However, selective D₁ antagonism alone is not accepted as effective antipsychotic principle [55, 56]. Therapeutic effects of typical and atypical neuroleptics are mostly mediated by inhibition of dopamine D₂-like receptors (D₂ and D₄ receptors) and other related aminergic receptors [33]. Blockade of dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{2A} receptors is mainly responsible for antipsychotic effect [57], while interaction with various dopamine (D₁, D₃, D₄), serotonin (5-HT_{1A}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}), and histamine H₃ receptors may produce additional antipsychotic or procognitive effects [54, 58, 59]. Moderate antagonistic activity at D₁-receptors of atypical antipsychotic clozapine is suggested to be responsible for its effectiveness against treatment-resistant schizophrenia [55].

Discovery of 1-phenyl-benzapine **1** (SCH 23390) [60], as D₁ specific dopamine antagonist, has initiated development of novel benzazepines for selective targeting D₁ receptor. The pharmacological characterization of **1** (SCH 23390) [60], which has become the prototype of D₁ antagonist, was followed by development of its conformationally restricted analogue **2** (SCH 39166) [61] and fused analogues and their derivatives (Figure 1) [62].

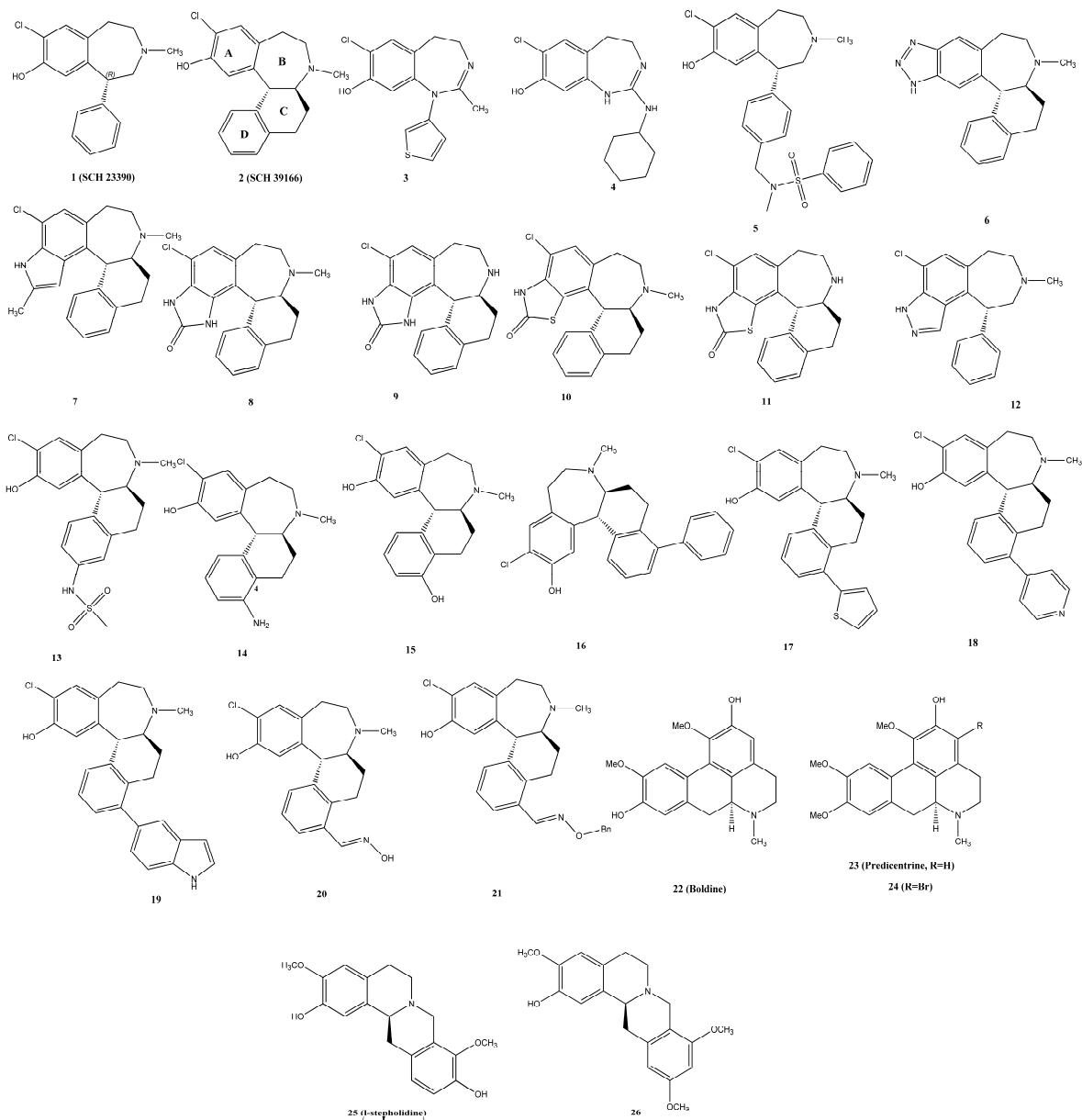


Figure 1. Structural formulas of dopamine D₁-receptor antagonists.

The *R* isomer of **1** (SCH 23390) [60], *R*(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine, is a highly potent enantioselective dopamine D₁-like receptor antagonist with *K_i* of 0.2 and 0.3nM for the D₁ and D₅ receptors, respectively [63, 64]. The C1-position is a chiral center and activity originates from the *R* enantiomer. Besides its high D₁-like antagonistic activity, some *in vitro*

studies demonstrated moderately high binding affinity of **1 (SCH 23390)** to the 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₁ serotonin receptors [65-67], α_{2A} adrenergic receptor (AR) and the 5-HT transporter [68].

Conformationally restricted derivative **2 (SCH 39166)** [61] has exerted high D₁ and D₅ antagonistic activity, moderately high binding affinity of **1 (SCH 23390)** to the 5-HT₂ and 5-HT₁ serotonin receptor subtypes [65, 66] and also to the α_{2a} adrenergic receptor and the 5-HT transporter [68].

As a selective antagonist, **1 (SCH 23390)** has been extensively used for the clarification and better understanding of the role of the D₁ receptors in various CNS disorders.

Examination of the pharmacologic profile of **1 (SCH 23390)** covered its effects on motor behavior and memory, as well as *in vivo* anticonvulsant studies. The anticonvulsant properties of **1 (SCH 23390)** indicated on the importance of D₁ dopaminergic receptor in initiation of generalized seizures. The available pharmacokinetic data of this compound suggest that after oral administration it undergoes extensive first-pass metabolism and has short half-life of around 25 minutes following administration of 0.3 mg/kg i.p. in the rat and therefore could not be further developed as a drug [63, 64]. Even the longer acting analogue **2 (SCH 39166)** [61] showed very low oral bioavailability (0.6%). Pharmacokinetic studies has discovered that extensive O-glucuronidation of the phenol and N-dealkylation of the N-Me group of the **1 (SCH 23390)** and **2 (SCH 39166)** may contribute to the poor pharmacokinetic (PK) profile [69-71].

Since the discovery of the **1 (SCH 23390)**, many dopamine D₁ receptor ligands possessing phenyltetrahydrobenzazepines scaffold have been synthesized and analyzed. In particular, D₁ antagonistic activity of this chemical group of compounds is determined by the nature of C-7 substituent, such as chlorine in the **1 (SCH 23390)** or bromine in the **SKF R-83566** [72, 73].

The two series of 1,3-benzodiazepine based D₁ antagonists, the cyclic *N*-aryl amidine and the cyclic *N*-aryl guanidine, was designed following a pharmacophore models derived from catecholamine analog **1 (SCH 23390)**. By replacing benzazepine core with 1,3-benzodiazepine, metabolically labile N3-methyl group presented in **1 (SCH 23390)** was eliminated while basicity of new model systems, with pK_a values of 8-9 and 10-11 for *N*-aryl amidine and *N*-aryl guanidine respectively, stayed within same range as those for the *tert*-azepine nitrogen center in **1 (SCH 23390)**. Among N1-arylbenzodiazepines the highest affinity for D₁ receptor was observed with 3-thienyl substituent **3** [74], K_i = 87 nM) while within cyclic *N*-aryl guanidines stronger basicity did not result in improved D₁ receptor binding affinity **4** (Figure 1) [75], K_i = 129 nM) [74].

A highly potent D₁/D₅ antagonists **5** [75]) possessing subnanomolar D₁ affinity and high selectivity over D₂ receptor were synthesized by introducing a series of bulky substituents at the *para* position of the pendant phenyl ring in **1** (SCH 23390). The obtained results indicate that the *para* position has a high steric tolerance for substitution [75].

Despite of their cyclic structure the benzazepines possess a considerable degree of conformational mobility and it is considered that equatorial orientation of the phenyl ring is optimal for interaction with the D₁ receptor [61].

The preparation of conformationally restricted analogues of the **1** (SCH 23390) resulted in new series of 6,6a,7,8,9,13b- hexahydro-5*H*-benzo [*d*] naphtho [2,1- *b*] azepines having the B and C rings junction in two possible configurations, B/C-*cis* and B/C-*trans*. Binding studies of the B/C-*cis* and B/C-*trans* series of compounds clearly demonstrated that conformationally rigid *trans* series, where the D ring is unequivocally fixed in an equatorial orientation, possess significantly higher D₁ receptor affinity and selectivity over the D₂ receptor. From this investigation were derived highly selective D₁ receptor antagonist which (-)-6a*S*,13*b* *R* isomer (**2** (SCH 39166)) has the highest D₁ affinity ($K_i = 1.9$ nM for D₁ and 514 nM for D₂). This finding is consistent with the fact that the D₁ receptor activity in the 1-phenyl-1*H*-3-benzazepine series is associated with the *R*-enantiomers [61]. **2** (SCH 39166), also known as ecopipam, has been in clinical trials for several diseases including obesity [76], cocaine addiction [77] schizophrenia [78]. Although **2** (SCH 39166) possess high D₁-like selectivity with reduced affinity for serotonin receptors and longer duration of action in primates in comparison to **1** (SCH 23390), both compounds displayed low oral bioavailability [79].

Various **1** (SCH 23390) and **2** (SCH 39166) analogues were synthesized and evaluated as selective dopamine D₁/D₅ receptor antagonists. Some of these trials include investigation of the phenol bioisosteric analogues of **1** (SCH 23390) and **2** (SCH 39166), such as benzotriazole, indole, benzimidazole, benzimidazolone and benzothiazolone. The designed corresponding heterocyclic systems, containing an N-H hydrogen bond donor group, retained the characteristic of the phenol group that are thought to be responsible for interaction with the receptor. Benzotriazole analogue of **2** (SCH 39166), **6** (Figure 1) [68]), displayed very low affinity for D₁ receptor ($K_i = 583$ nM) suggested that conformer A was not the active binding conformer. In comparison with **6** [68], indole analogue of **2** (SCH 39166) **7** [68] displayed appreciable affinity for D₁ receptor. Further optimization of the hydrogen bond donating properties of different heterocyclis analogues of conformer B also indicated the preference of conformation B over A, whereby hydrogen-bond donating directionality has been established. Among the designed compounds highly selective D₁/D₅ antagonists, benzimidazolone analogue (**8** [68], $K_i = 7$ nM for D₁ and 4.2 nM for D₅) and its corresponding NH benzazepine (**9** [68], $K_i = 16.5$ nM for D₁ and 2.4 nM for D₅) together with benzothiazolone analogue

(**10** [68], $K_i = 2.1$ nM for D_1 , 2.8 nM for D_5) and its corresponding NH benzazepine (**11** [68], $K_i = 6.5$ for D_1 and 1.7 for D_5) were of particular interest in terms of their overall profiles (Figure 1). Improved pharmacokinetic profiles of heterocyclic isosteres demonstrated by rats plasma levels is associated with higher metabolic stability with respect to O-glucuronidation. In contrast, biological evaluation of phenol bioisosteric analogues of **1** (**SCH 23390**) revealed huge decrease in the D_1 binding affinity with exception of **12** [68] which was identified as a potent D_1/D_5 ligand in this series but without significant improvement in pharmacokinetic profile compared to **1** (**SCH 23390**). This finding indicated that molecular rigidity might play important role in improving the pharmacokinetic properties [68].

Functionalization of the D-ring of **2** (**SCH 39166**) with the special focus on the C-3 and C-4 positions have been also examined [75, 80]. Several **2** (**SCH 39166**) analogs substituted on the C-3 and C-4 positions with amino, amido and sulfonamido groups (-NH₂, -NHCOC₃H₅, -NHSO₂CH₃, -NHSO₂CH₂CH₃, -NHCONHCH₂CH₃, -NHCONH-2,6-Cl₂C₆H₃, -NHCO₂CH₂CH₃), showed strong D_1 antagonistic activity [75, 80]. Results of the study indicated on far more significant substitution on C-3 (**13** [75]) than on C-4 (**14** [75]) position of **2** (**SCH 39166**) ligands for strong and selective D_1 receptor antagonism. In addition, high selectivity over D_2 receptor was achieved with C-3 derivatisation while moderate selectivity over D_2 was observed in C-4 series. The most representative compound, sulfonamido D_1 antagonist (**13** [75]) showed even higher affinity to D_1 receptor ($K_i = 0.5$ nM) and selectivity over D_2 , D_4 , 5HT_{2a} and α_{2a} receptors compare to parent drug **2** (**SCH 39166**) while D_5 affinity was somewhat lower. This compound also posses improved pharmacokinetic profile and bioavailability compared to **2** (**SCH 39166**) (rat AUC: 2486 ng/mL.hr and 156 ng/mL.hr for **13** [75] and **2** (**SCH 39166**) respectively; rat bioavailability: 29% and 0.6% for **13** [70] and **2** (**SCH 39166**) respectively [75]). On the other side the position 4 of D-ring can tolerate a wide variety of functional groups such as -CHO, -CH₂OH, -CN, -CO₂Me, -OH and pyrrolidine-2-one wherein in addition to high D_1 antagonistic activity, selectivity over D_2 receptor is also retained (**15** [80]) (Figure 1). However, the most potent dopamine D_1 antagonists from C-4 series were obtained by the introduction of an aromatic group at the position 4 of the D-ring of **2** (**SCH 39166**). Almost every aromatic group including phenyl (**16** [80] D_1 $K_i = 0.2$ nM), 2-thienyl (**17** [80] D_1 $K_i = 0.9$ nM), piridinyl (**18** [80] D_1 $K_i = 0.3$ nM) and indolyl (**19** [80] D_1 $K_i = 0.6$ nM) are well tolerated at the 4-position. Regarding the D_2 selectivity it was observed that unsubstituted phenyl derivative **16** [80], as well as 1*H*-Indol-5-yl (**19** [80]) and 2-thienyl (**17** [80]) derivatives possess significant affinities for D_2 receptor (Figure 1). Among tested compounds improved pharmacokinetic profile compared to **2** (**SCH 39166**) (AUC = 156 h μ g/mL, $C_{max} = 72$ ng/mL, $T_{max} = 0.5$ h) showed 2-thienyl derivative, **17** [81] (AUC = 353 h μ g/mL, $C_{max} = 90$ ng/mL, $T_{max} = 2$ h). Oxime analogs are also well tolerated in the

position 4 (**20** [80] and **21** [80]). The most potent compound in this series is the *O*-benzyl oxime **21** [80] with D_1 K_i of 0.2 nM and notably higher D_2 K_i of 69 nM [80].

Besides this series of benzodiazepines, derivatives of alkaloids such as **boldine**, **predicentrine** and *l*-(**S**)-**stepholidine** have been synthesized and examined as potential D_1 -ligands [81,83].

The neuroleptic-like behavior of aporphine alkaloid **22** (**boldine**) suggested that it may act as dopamine receptors antagonist. In vitro binding studies showed micromolar nonselective D_1 - and D_2 -activity of **22** (**boldine**) while *in vivo* central antidopaminergic activity was negligible (Figure 1) [81, 82]. Unlike apomorphine which typical agonist activity is associated with *R* configuration at C-6a position, **22** (**boldine**) and its 9-*O*-methylated analogue of **23** (**predicentrine**) share the *S* configuration and shows antagonistic properties. The lack of **22** (**boldine**) activity *in vivo* could be related to its unfavorable pharmacokinetics such as short plasma half-life of only few minutes (Figure 1) [83]. Contrary, halogenated derivatives of **22** (**boldine**) and **23** (**predicentrine**) showing higher lipophilicity displayed increased affinity for the D_1 -like receptors and higher selectivity over the D_2 -like receptors. The highest affinity for D_1 receptor and selectivity over D_2 receptor among brominated, chlorinated and iodinated **22** (**boldine**) derivatives showed **3-iodo-boldine** (D_1 , $K_i = 2$ nM, K_i ratio $D_2/D_1 = 34$) [82, 83]. Similar behavior was noticed among halogenated **23** (**predicentrine**) derivatives where **3-iodo-predicentrine** [82] (D_1 , $K_i = 6$ nM) displayed the highest affinity as well as selectivity over D_2 -like receptors, being 140-fold more selective for D_1 -like receptors. Unlike **3-bromo-boldine** derivative, **24** (**3-bromo-predicentrine**) [82] possesses higher affinity and selectivity but lower than **3-iodo-predicentrine** (Figure 1) [82].

Removing of hydroxy group and introducing methoxy group in benzene moiety of **25** (*l*-(**S**)-**stepholidine**) resulted in greater affinity and reversed function (from agonistic to antagonistic) at D_1 receptor (**26** [84]). These results were in accordance with molecular docking studies at human D_1 receptor [84]. The compound **26** [84] displayed 2.5-fold higher affinity for the D_1 receptor ($K_i = 2.53$ nM) compared to **25** (*l*-(**S**)-**stepholidine**) (D_1 , $K_i = 6.23$ nM) and binding affinities for D_2 , 5-HT_{1A}, and 5-HT_{2A} receptors (Figure 1) [84].

Conclusion

Based on the results of the studies novel selective D_1/D_5 antagonists, **8**, **9**, **10**, **11**, and **12** [68], were of particular interest in terms of their overall binding profiles for dopamine D_1/D_5 receptors and α_{2A} -AR, improved pharmacokinetic properties compared to their leads **1** (SCH 23390) and **2** (SCH 39166), and moderate binding affinity to the

5-HT transporter ($K_i = 540$ nM, 6220 nM, 842 nM, 2950 nM, and 137 nM, respectively [68]. The indazole compound **12** in this series was identified as a potent D_1/D_5 ligand [68]. Lead compound **2** has been in human clinical trials for a variety of diseases, including schizophrenia, cocaine addiction, and obesity [68].

Acknowledgement

The study was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Contract #172033.

References

1. Anighoro A, Bajorath J, Rastelli G. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery. *J Med Chem.* 2014; 57: 7874-87.
2. Hopkins AL. Network Pharmacology: The Next Paradigm in Drug Discovery. *Nat Chem Biol.* 2008; 4: 682-90.
3. Boran ADW, Iyengar R. Systems Approaches to Polypharmacology and Drug Discovery. *Curr Opin Drug Discovery Dev.* 2010; 13: 297-309.
4. Mestres J, Gregori-Puigjané E. Conciliating Binding Efficiency and Polypharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30: 470-4.
5. Peters JU. Polypharmacology-Foe or Friend? *J Med Chem.* 2013; 56: 8955-71.
6. Millan MJ. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: conceptual foundation and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol Ther.* 2006; 110: 135-370.
7. Millan MJ. On 'polypharmacy' and multi-target agents, complementary strategies for improving the treatment of depression: a comparative appraisal. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2014; 17: 1009-37.
8. Besnard J, Ruda GF, Setola V, Abecassis K, Rodriguiz RM, Huang XP, Norval, S, Sassano MF, Shin AI, Webster LA, Simeons FRC, Stojanovski L, Prat A, Seidah NG, Constam DB, Bickerton GR, Read KD, Wetsel WC, Gilbert IH, Roth BL, Hopkins AL. Automated Design of Ligands to Polypharmacological Profiles. *Nature* 2012; 492: 215-20.
9. Hajjo R, Grulke CM, Golbraikh A, Setola V, Huang XP, Roth BL, Tropsha A. Development, Validation, and Use of Quantitative Structure-Activity Relationship Models of 5-

- Hydroxytryptamine (2B) Receptor Ligands To Identify Novel Receptor Binders and Putative Valvulopathic Compounds among Common Drugs. *J Med Chem.* 2010; 53: 7573-86.
10. Hajjo R, Setola V, Roth BL, Tropsha A. Chemocentric Informatics Approach to Drug Discovery: Identification and Experimental Validation of Selective Estrogen Receptor Modulators as Ligands of 5-Hydroxytryptamine-6 Receptors and as Potential Cognition Enhancers. *J Med Chem.* 2012; 55: 5704-19.
 11. Zhang L, Fourches D, Sedykh A, Zhu H, Golbraikh A, Ekins S, Clark J, Connelly MC, Sigal M, Hodges D, Guiguemde A, Guy RK, Tropsha A. Discovery of Novel Antimalarial Compounds Enabled by QSAR-Based Virtual Screening. *J Chem Inf Model.* 2013; 53: 475-92.
 12. Nikolic K, Agbaba D, Stark H. Pharmacophore modeling, drug design and virtual screening on multi-targeting procognitive agents approaching histaminergic pathways. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2015; 46: 15–29.
 13. Humbert-Claude M, Morisset S, Gbahou F, Arrang JM. Histamine H3 and dopamine D2 receptor-mediated [35S]GTPγ[S] binding in rat striatum: Evidence for additive effects but lack of interactions. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73: 1172-81.
 14. Garduno-Torres B, Trevino M, Gutierrez R, Arias-Montano JA. Presynaptic histamine H3 receptors regulate glutamate, but not GABA release in rat thalamus. *Neuropharmacology* 2007; 52: 527–35.
 15. Dai H, Fu Q, Shen Y, Hu W, Zhang Z, Timmerman H, Leurs R, Chen Z. The histamine H3 receptor antagonist clobenpropit enhances GABA release to protect against NMDA induced excitotoxicity through the cAMP/protein kinase A pathway in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 2007; 563: 117–23.
 16. Gemkow MJ, Davenport AJ, Harich S, Ellenbroek BA, Cesura A, Hallett D. The histamine H3 receptor as a therapeutic drug target for CNS disorders. *Drug Discovery Today* 2009; 14: 509-15.
 17. Threlfell S, Cragg SJ, Imre K, Turi GF, Coen CW, Greenfield SA. HistamineH3 receptors inhibit serotonin release in substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci.* 2004; 24: 8704–10.
 18. Goedert M, Spillantini MGA. A century of Alzheimer's disease. *Science* 2006; 314: 777–81.
 19. Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic Shotguns versus Magic Bullets: Selectively Non-Selective Drugs for Mood Disorders and Schizophrenia. *Nat Rev Drug Discovery* 2004; 3: 353–9.
 20. Lipina TV, Wang M, Liu F, Roder JC. Synergistic Interactions between PDE4B and GSK-3: DISC1 Mutant Mice. *Neuropharmacology* 2012; 62: 1252–62.
 21. Lipina TV, Palomo V, Gil C, Martinez A, Roder JC. Dual Inhibitor of PDE7 and GSK-3-VP115 Acts as Antipsychotic and Cognitive Enhancer in C57BL/6J Mice. *Neuropharmacology* 2013; 64: 205–14.
 22. Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia - implications for schizophrenia and Parkinson 's disease. *Trends Neurosci.* 1990; 13: 272-6.
 23. Millan MJ. N-Methyl-d-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: Novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology* 2005; 179: 30-53.

24. Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E. Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res.* 2008; 172: 45-71.
25. Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M, Esposito E. Serotonin control of central dopaminergic function: focus on in vivo microdialysis studies. *Prog Brain Res.* 2008; 172: 7-44.
26. Youdim MBH, Buccafusco JJ. Multi-Functional Drugs for Various CNS Targets in the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26: 27–35.
27. Lu JJ, Pan W, Hu YJ, Wang YT. Multi-Target Drugs: The Trend of Drug Research and Development. *PLoS One* 2012; 7: e40262.
28. León R, Garcia AG, Marco-Contelles J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Res Rev* 2013; 33: 139-189.
29. Morphy R, Rankovic Z. Designed Multiple Ligands An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J Med Chem.* 2005; 48: 6523–43.
30. Quesseveur G, Nguyen HT, Gardier AM, Guiard BP. 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression. *Expert. Opin Investig Drugs* 2012; 21: 1701–25.
31. Meltzer HY, Huang M. In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. *Progress in Brain Research.* 2008; 172: 177–97.
32. Millan MJ, Loiseau F, Dekeyne A, Gobert A, Flik G, Cremers TI, Rivet JM, Sicard D, Billiras R, Brocco M. S33138 (N-[4-[2-[(3aS,9bR)-8-cyano-1,3a,4,9b-tetrahydro[1] benzopyrano[3,4-c]pyrrol-2(3H)-yl)-ethyl]phenyl]-acetamide), a preferential dopamine D₃ versus D₂ receptor antagonist and potential antipsychotic agent: III. Actions in models of therapeutic activity and induction of side effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324:1212-26.
33. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th Ed. by Laurence Brunton (Editor), Bruce Chabner (Associated Editor), Bjorn Knollman (Associated Editor) Copyright © 2011 by The McGraw-Hill Companies, Inc.
34. Zheng, H., Fridkin, M., Youdim, M.B.H. Site-Activated Chelators Derived from Anti-Parkinson Drug Rasagiline as a Potential Safer and More Effective Approach to the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* 2010; 35: 2117–2123.
35. Bautista-Aguilera OM, Esteban G, Bolea I, Nikolic K, Agbaba D, Moraleda I, Iriepa I, Samadi A, Soriano E, Unzeta M, Marco-Contelles J. Design, synthesis, pharmacological evaluation, QSAR analysis, molecular modeling and ADMET of novel donepezil–indolyl hybrids as multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2014; 75: 82-95.
36. Bautista-Aguilera OM, Esteban GM, Chioua M, Nikolic K, Agbaba D, Moraleda I, Iriepa I, Soriano E, Samadi A, Unzeta M, Contelles JM. Multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis, biochemical evaluation, ADMET, molecular modeling, and QSAR analysis of novel donepezil-pyridyl hybrids. *Drug Design, Development and Therapy* 2014; 8: 1893-910.
37. Bautista-Aguilera OM, Samadi A, Chioua M, Nikolic K, Filipic S, Agbaba D, Soriano E, Andrés L, Rodríguez-Franco MI, Alcaro S, Ramsay RR, Ortuso F, Yañez M, Contelles JM. N-Methyl-N-

- ((1-methyl-5-(3-(1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-yl)propoxy)-1H-indol-2-yl)methyl)prop-2-yn-1-amine, a New Cholinesterase and Monoamine Oxidase Dual Inhibitor. *J Med Chem.* 2014; 57: 10455-63.
38. Bolea I, Juárez-Jiménez J, de los Ríos C, Chioua M, Pouplana, R, Javier Luque F, Unzeta M, Marco-Contelles J, Samadi A. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of Donepezil and N-[(5-(Benzyloxy)-1-methyl-1H-indol-2-yl)methyl]-Nmethylprop-2-yn-1-amine Hybrids as New Multipotent Cholinesterase/Monoamine Oxidase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem.* 2011; 54: 8251–70.
 39. Marco-Contelles J, Leon R, Rios C, Guglietta A, Terencio J, Lopez MG, Garcia, AG, Villarroya M. Novel Multipotent Tacrine-Dihydropyridine Hybrids with Improved Acetylcholinesterase Inhibitory and Neuroprotective Activities as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem.* 2006; 49: No 26.
 40. Marco-Contelles J, Leon R, Rios C, Samadi A, Bartolini M, Andrisano V, Huertas O, Barril X, Luque FJ, Rodriguez-Franco MI, Lopez B, Lopez MG, Garcia AG, Carmo Carreiras M, Villarroya M. Tacripyrines, the First Tacrine-Dihydropyridine Hybrids, as Multitarget-Directed Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem.* 2009; 52: 2724–32.
 41. Nikolic K, Mavridis L, Aguilera O M B, Contelles JM, Stark H, Carreiras M, Rossi I, Massarelli P, Agbaba D, Ramsay RR, Mitchell JBO. Predicting targets of compounds against neurological diseases using cheminformatic methodology. *J Comput Aided Mol Des.* 2015; 29: 183-98.
 42. Pérez V, Marco-Contelles J, Fernández-Álvarez E, Unzeta M. Relevance of benzyloxy group in 2-indolyl methylamines in the selective MAO-B inhibition. *Brit J Pharmacol.* 1999; 127: 869-876.
 43. Samadi A, Chioua M, Bolea I, de los Ríos C, Iriepa I, Moraleda I, Bastida A, Esteban G, Unzeta M, Gálvez E, Marco-Contelles J. Synthesis, biological assessment and molecular modeling of new multipotent MAO and cholinesterase inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2011; 46: 4665-8.
 44. Cherkasov A, Muratov EN, Fourches D, Varnek A, Baskin II, Cronin M, Dearden J, Gramatica P, Martin YC, Todeschini R, Consonni V, KuzMin VE, Cramer R, Benigni R, Yang C, Rathman JI, Terfloth L, Gasteiger J, Richard A, Tropsha A. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? *J Med Chem.* 2014; 57: 4977–5010.
 45. Cramer RD. The Inevitable QSAR Renaissance. *J Comput-Aided Mol Des.* 2012; 26: 35–38.
 46. Ning X; Rangwala H; Karypis G. Multi-Assay-Based Structure–Activity Relationship Models: Improving Structure–Activity Relationship Models by Incorporating Activity Information from Related Targets. *J Chem Inf Model.* 2009; 49: 2444–56.
 47. Bolea I, Gella A, Monjas L, Pérez C, Rodríguez-Franco MI, Marco-Contelles J, Samadi A, Unzeta M. Multipotent, permeable drug ASS234 inhibits A β aggregation, possesses antioxidant properties and protects from A β -induced apoptosis in vitro. *Curr Alzheimer Res.* 2013; 10: 797–808.
 48. Rice ME, Cragg SJ. Dopamine spillover after quantal release: Rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev.* 2008; 58: 303–13.

49. Fuxe K, Marcellino D, Rivera A, Diaz-Cabiale Z, Filip M, Gago B, Roberts DCS, Langel U, Genedani S, Ferraro L, de la Calle A, Narvaez J, Tanganelli S, Woods A, Agnati LF. Receptor-receptor interactions within receptor mosaics. Impact on neuropsychopharmacology. *Brain Res Rev.* 2008; 58: 415-52.
50. Previc FH. Dopamine and the origins of human intelligence. *Brain Cogn.* 1999; 41: 299-350.
51. Carlsson A. On the neuronal circuitries and neurotransmitters involved in the control of locomotor activity. *J Neural Transm Suppl.* 1993; 40: 1-12.
52. Carlsson A. A paradigm shift in brain research. *Science* 2001; 294: 1021-24.
53. Witkin JM, Nelson DL. Selective histamine H3 receptor antagonists for treatment of cognitive deficiencies and other disorders of the central nervous system. *Pharmacol Ther.* 2004; 103: 1-20.
54. Esbenhade TA, Browman KE, Bitner RS, Strakhova M, Cowart MD, Brioni JD. The histamine H3 receptor: An attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol.* 2008; 154: 1166-81.
55. Tauscher J, Hussain T, Agid O, Verhoeff NP, Wilson AA, Houle S, Remington G, Zipursky RB, Kapur S. Equivalent occupancy of dopamine D1 and D2 receptors with clozapine: differentiation from other atypical antipsychotics. *Am J Psychiatry.* 2004; 161: 1620-5.
56. Sedvall GC, Karlsson P. Pharmacological manipulation of D1-dopamine receptor functions in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol.* 2006; 21: S181-8.
57. Remington G. Understanding antipsychotic "atypicality": a clinical and pharmacological moving target. *J Psychiatry Neurosci.* 2003; 28: 275-84.
58. Coburg Y, Kottke T, Weizel L, Ligneau X, Stark H. Potential utility of histamine H3 receptor antagonist pharmacophore in antipsychotics. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19: 538-42.
59. Reynolds GP. Receptor mechanisms in the treatment of schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 2004; 18: 340-5.
60. Hyttel J. SCH 23390 - the first selective dopamine D-1 antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1983; 91: 153-4.
61. Berger JG, Chang WK, Clader JW, Hou D, Chipkin RE, McPhail AT. Synthesis and Receptor Affinities of Some Conformationally Restricted Analogues of the Dopamine D1 Selective Ligand (5R)-8-Chloro-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1H-3-benzazepin-7-ol. *J Med Chem.* 1989; 32: 1913-21.
62. Andersen PH, Grønvald FC, Hohlweg R, Hansen LB, Guddal E, Braestrup C, Nielsen EB. NNC-112 1, NNC-687 and NNC-756 1, new selective and highly potent dopamine receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1992; 219: 45-52.
63. Bourne JA, Fosbraey P, Halliday J. SCH 23390 affords protection against soman-evoked seizures in the freely moving guinea-pig: A concomitant neurochemical, electrophysiological and behavioral study. *Neuropharmacol.* 2001; 40: 279-88.
64. Bourne JA. SCH 23390: The First Selective Dopamine D1-Like Receptor Antagonist. *CNS Drug Rev.* 2001; 7: 399-414.

65. Bischoff S, Heinrich M, Sonntag JM, Krauss J. The D-1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 also interacts potently with brain serotonin (5-HT₂) receptors. *Eur J Pharmacol.* 1986; 129: 367-70.
66. Skarsfeldt T, Larsen JJ. SCH 23390 - a selective dopamine D-1 receptor antagonist with putative 5-HT₁ receptor agonistic activity. *Eur J Pharmacol.* 1988; 148: 389-95.
67. Tamagnan G, Baldwin RM, Kula NS, Baldessarini RJ, Innis RB. Cyclopentadienyltricarbonylrheniumbenzazepines: synthesis and binding affinity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000; 10: 1113-5.
68. Wu WL, Burnett DA, Spring R, Greenlee WJ, Smith M, Favreau L, Fawzi A, Zhang H, Lachowicz JE. Dopamine D1/D5 Receptor Antagonists with Improved Pharmacokinetics: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Phenol Bioisosteric Analogues of Benzazepine D1/D5 Antagonists. *J Med Chem.* 2005; 48: 680-93.
69. Tedford CE, Coffin VL, Ruperto V, Cohen M, McQuade RD, Johnson R, Kim HK, Lin CC. Determination of plasma and brain concentrations of SCH 39166 and their correlation to conditioned avoidance behavior in rats. *Psychopharmacol.* 1993; 113: 199-204.
70. Tedford CE, Ruperto VB, Coffin VL, Cohen M, Libonati M, Barnett A. SCH 39166, a novel dopamine D1 receptor antagonist: in vitro investigation of its glucuronidation and potential species differences. *Drug Dev Res.* 1992; 26: 389-403.
71. Tedford CE, Ruperto VB, Barnett A. Characterization of a rat liver glucuronosyltransferase that glucuronidates the selective D1 antagonist, SCH 23390 and other benzazepines. *Drug Metab Dispos.* 1990; 19: 1152-9.
72. Flaim KE, Gessner GW, Croke ST, Heys JR, Weinstock J. Regulation of agonist and antagonist binding to striatal D-1 dopamine receptors: Studies using the selective D-1 antagonist [3H]SK&F R-83566. *Life Sci.* 1986; 38: 2087-96.
73. Ohlstein EH, Berkowitz BA. SCH 23390 and SK&F 83566 are antagonists at vascular dopamine and serotonin receptors. *Eur J Pharmacol.* 1985; 108: 205-8.
74. Zhu Z, Sun ZY, YeY, McKittrick B, Greenlee W, Czarniecki M, Fawzi A, Zhang H, Lachowicz JE. Design and discovery of 1,3-benzodiazepines as novel dopamine antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19: 5218-21.
75. Qiang L, Sasikumar TK, Burnett DA, Su J, Tang H, Ye Y, Mazzola RDJr, Zhu Z, McKittrick BA, Greenlee WJ, Fawzi A, Smith M, Zhang H, Lachowicz JE. Discovery of new SCH 39166 analogs as potent and selective dopamine D1 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 20: 836-40.
76. Astrup A, Greenway FL, Ling W, Pedicone L, Lachowicz J, Strader CD, Kwan R. Randomized Controlled Trials of the D1/D5 Antagonist Ecopipam for Weight Loss in Obese Subjects. *Obesity* 2007; 15: 1717-31.
77. Haney M, Ward AS, Foltin RW, Fischman MW. Effects of ecopipam, a selective dopamine D1 antagonist, on smoked cocaine self-administration by humans. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 155: 330-7.

78. Karlsson P, Smith L, Farde L, Härnryd C, Sedvall G, Wiesel FA. Lack of apparent antipsychotic effect of the D1-dopamine receptor antagonist SCH39166 in acutely ill schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995; 121: 309-16.
79. Barnett A, McQuade RD, Tedford C. Highlights of D1 dopamine receptor antagonist research. *Neurochem Int* 20 (Suppl) 1992; 119S-122S.
80. Sasikumar TK, Burnett DA, Greenlee WJ, Smith M, Fawzi A, Zhang H, Lachowicz JE. Remote functionalization of SCH 39166: Discovery of potent and selective benzazepine dopamine D1 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20: 832–5.
81. Asencio M, Delaquerrière B, Cassels BK, Speisky H, Comoy E, Protais P. Biochemical and Behavioral Effects of Boldine and Glaucine on Dopamine Systems. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999; 62: 7–13.
82. Asencio M, Hurtado-Guzmán C, López JJ, Cassels BK, Protais P, Chagraoui A. Structure–affinity relationships of halogenated predicentrine and glaucine derivatives at D1 and D2 dopaminergic receptors: halogenation and D1 receptor selectivity. *Bioorg Med Chem*. 2005; 13: 3699-704
83. Sobarzo-Sánchez EM, Arbaoui J, Protais P, Cassels BK. Halogenated Boldine Derivatives with Enhanced Monoamine Receptor Selectivity. *J Nat Prod*. 2000; 63: 480-4.
84. Qian W, Lu W, Sun H, Li Z, Zhu L, Zhao R, Zhang L, Zhou S, Zhou Y, Jiang H, Zhen X, Liu H. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel tetrahydroprotoberberine derivatives: Selective inhibitors of dopamine D1 receptor. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20: 4862–71.

Polifarmakologija antagonista dopaminskih D₁-receptora

Katarina Nikolić*, Slavica Filipić, Danica Agbaba

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

* Autor za korespondenciju:

Doc. dr. Katarina Nikolić, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija
tel: +381-11-3951-259, fax: +381-11-3974-349
e-mail: knikolic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Istraživanje novih lekova koji deluju kao selektivni ligandi za određeno ciljno mesto i tako usporavaju ili zaustavljaju patofiziološki process danas se smatra nedovoljno efikasnim u razvoju lekova za kompleksna oboljenja nastala usled više patofizioloških procesa i promena u nekoliko signalnih puteva. Najveći izazov predstavlja razvoj lekova koji specifično modifikuju aktivnost nekoliko izabranih ciljnih mesta dejstva, a istovremeno minimalno stupaju u interakciju sa ostalim biomolekulima. Kompleksni patofiziološki procesi psihijatrijskih i neurodegenerativnih oboljenja i interakcija neurotransmiterskih sistema su dva ključna razloga za primenu strategije polifarmakologije (strategije multiplih ciljnih mesta) u razvoju efikasnih lekova koji deluju na centralni nervni sistem. U ovom radu dat je pregled polifarmakoloških profila i potencijalne terapijske primene antagonista receptora koji pripadaju D₁ familiji dopaminskih receptora.

Ključne reči: polifarmakologija, multitarget lekovi, dopaminski receptori

Osnovni principi izučavanja toksikologije smeša

Aleksandra Buha, Vesna Matović*

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

*Autor za korespondenciju: Vesna Matović, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, 11221 Beograd, Vojvode Stepe 450
e-mail: vevodi@pharmacy.bg.ac.rs
tel: +381 11 3951251

Kratak sadržaj

Većina toksikoloških studija i evaluacija rizika odnose se na pojedinačne hemikalije. Međutim, u realnom okruženju izloženi smo istovremeno velikom broju hemikalija, što ukazuje da bi pri proceni izloženosti i rizika trebalo posmatrati smeše, a ne samo pojedinačne hemikalije. Ovaj pregledni rad o toksikologiji hemijskih smeša pokriva više stavki, od osnovnih koncepata i terminologije zajedničkog dejstva i interakcija hemikalija do različitih modela za ispitivanje toksičnosti smeša. Literaturni podaci ukazuju na činjenicu da izloženost smešama koje sadrže niske nivoe hemikalija, nivoe koji su niži od njihovih doza bez štetnog efekta (No observed adverse effect level - NOAEL) vrednosti, može rezultirati toksičnim odgovorom bez obzira da li komponente smeše imaju ili ne sličan način dejstva. Dati su i različiti pristupi i primeri koncepata i modela procene toksičnosti prioriternih smeša iz realnog života, strategija i smernice, kao i dalji izazovi.

Ključne reči: smeše, toksičnost, koncepti i modeli, interakcije komponenata

Uvod

Okruženi smo sa preko 50 miliona hemikalija, od kojih su neke prirodnog porekla a mnoge je čovek sintetisao ili izolovao iz različitih izvora kako bi sebi omogućio što bolji, savremeniji, udobniji život. Bez brojnih hemikalija ne bismo mogli ni da zamislimo opstanak, ali ne smemo zaboraviti da sve hemikalije nose sa sobom i negativne, neželjene a često i toksične efekte po čoveka i životnu sredinu. Svake godine se na zemaljskoj kugli zabeleži preko 15 miliona slučajeva trovanja, od čega preko 50% čine trovanja dece. Pri tome znamo da su upravo akutna trovanja, uz kardiovaskularne bolesti i karcinome, najčešći uzročnici smrtnosti na našoj planeti.

Poznato je da je čovek još od svojih prvih koraka shvatio da je okružen i supstancama koje mu mogu nauditi ali pri tome i pomoći u lovu i odbrani od neprijatelja. Nije znao, naravno, da objasni uzrok toksičnosti na primer kukute, ugljen monoksida, olova i drugih brojnih hemikalija, efekte koji one izazivaju u organizmu a još manje mehanizme njihovog dejstva na živi svet. Trebalo je da prođe mnogo godina da bi se stekla ta znanja, pa je tako danas toksikologija multidisciplinarna nauka koja je upravo zbog svoje obimnosti podeljena na niz grana, tj. disciplina. Danas posedujemo brojna znanja o efektima koje pojedine supstance izazivaju pri akutnom trovanju, tj. pri jednokratnoj izloženosti ali i pri hroničnoj izloženosti celog radnog ili životnog veka. Znamo neke od mehanizama toksičnosti, kao i činjenicu da čak i izloženost niskim dozama određenih hemikalija, posebno kroz duži vremenski period može toksično delovati na nervni sistem, endokrini sistem, a izvestan broj hemikalija može ispoljiti i genotoksični, mutageni efekat i dovesti do nastanka karcinoma.

Pa ipak, da li možemo biti zadovoljni svim ovim znanjima koja danas posedujemo? Možemo slobodno reći – ne, i to ne samo zato što je čovek besкраjno radoznao u svojim saznanjima i istraživanjima. Nama je cilj da svedemo rizik od hemikalija po zdravlje ljudi i životnu sredinu na minimum, tj. na prihvatljiv rizik. Međutim, procena toksičnosti i rizika koje hemikalije predstavljaju po zdravlje ljudi i životnu sredinu otežava i komplikuje činjenica da su ljudi u svakodnevnom životu izloženi kompleksnim smešama o čijim toksičnim efektima imamo nedovoljno podataka.

Evaluacija potencijalne opasnosti po zdravlje ljudi od izloženosti smešama različitih hemikalija predstavlja jedan od najvećih izazova u toksikologiji. Veliki broj supstanci se istovremeno nalazi u ekosistemima, lancima ishrane i ljudskom tkivu, uglavnom u niskim koncentracijama. Poznato je da se u organizmu svakog čoveka može detektovati oko 300 hemikalija, i da čak i nerođene bebe u svom organizmu imaju hemikalije poreklom iz majčinog organizma.

U naučnim krugovima toksikologije se već niz godina ukazuje na tzv. „koktel” hemikalija kojima je izložen živi svet, kao i na potrebu istraživanja da li istovremena

izloženost većem broju hemikalija, iako prisutnim u niskim dozama, može rezultirati rizikom po zdravlje ljudi i ekosisteme.

Podela smeša i međusobni efekti komponenata smeša

Postoje različiti oblici smeša i prema Agenciji za toksične supstance i registar bolesti (Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR) možemo ih podeliti na smeše hemikalija koje se proizvode kao takve (različite formulacije pesticida, benzin, itd), smeše koje nastaju kao nusprodukti različitih procesa poput sagorevanja goriva, pušenja cigareta, i tzv. „slučajne” smeše koje se sastoje od hemikalija koje potiču iz različitih izvora (1).

Međutim, u literaturi se mogu naći i druge podele smeša. Tako već dugi niz godina koristimo i podelu na *jednostavne* i *složene (kompleksne)* smeše (2). *Jednostavne* smeše su one koje se sastoje od relativno malog broja hemikalija (najčešće manje od 10), pri čemu je njihov sastav poznat i kvalitativno i kvantitativno, a primeri takvih smeša su kokteli pesticida, grupa estara alil alkohola, kombinacije lekova. *Složene* smeše se definišu kao smeše koje sadrže desetine, stotine ili čak hiljade hemikalija, čiji sastav kvalitativno i kvantitativno nije u potpunosti poznat, a primeri su pijaća voda, pare koje nastaju pri zavarivanju, radna atmosfera, itd (2).

Smeše takođe možemo podeliti i prema načinu dejstva njenih komponenata, pa tako razlikujemo smeše čije komponente imaju sličan način dejstva i smeše čije komponente ispoljavaju različite mehanizme dejstva. Kao primer prve grupe možemo navesti polihlorovane dioksine i furane (PCDD/Fs) s obzirom na činjenicu da ove hemikalije reaguju sa istim ciljnim molekulama u organizmu, a može se pretpostaviti da će se postići isti efekat ukoliko jednu hemikaliju u ovakvim smešama zamenimo sa ekvivalentnom dozom druge, pa su još 1926. godine Loewe i Muischnek dali koncept adicije doza, odnosno koncentracija (3). Široku primenu ovog koncepta nalazimo u tzv. faktoru ekvivalenta toksičnosti (toxicity equivalence factor - TEF), konceptu koji se koristi u proceni rizika npr. PCDD/Fs, organofosfata. Ovaj koncept dozne aditivnosti ukazuje da svi toksični agensi, prisutni u smeši u bilo kojoj koncentraciji, doprinose ukupnoj toksičnosti smeše, čak ukoliko su prisutni i u koncentracijama koje su niže od njihovih NOAEL vrednosti, odnosno i pri dozama individualnih komponenata koje ne ispoljavaju toksične efekte. Za smeše sa različitim načinima dejstava komponenata se smatralo da je efekat smeše nezavisan od komponenata smeše, na osnovu čega se može izvesti zaključak da se toksični efekti takve smeše neće javiti sve dok doze pojedinačnih sastojaka ne prelaze njihove NOAEL vrednosti (4). Međutim, literaturni podaci ukazuju da ovakav pristup ima nedostataka, odnosno ukazuju na činjenicu da izloženost smešama koje sadrže niske nivoe hemikalija, nivoe koji su niži od njihovih NOAEL vrednosti, može rezultirati toksičnim odgovorom bez obzira da li komponente imaju ili ne sličan način dejstva, odnosno empirijsko iskustvo ne može podržati pristup da su

smeše supstanci koje ne ispoljavaju sličan efekat a prisutne su u nivoima ispod njihovih NOAEL vrednosti, bezbedne (5). Tako je na primer u studiji ispitivanja toksičnih efekata smeše od 33 hemikalije koje se mogu podeliti u 3 grupe prema načinu dejstva, zaključeno da je smeša izazvala 50% smrtnosti riba iako su komponente bile u koncentracijama ispod koncentracija bez efekta (No observed effect concentration - NOEC) (6). U to vreme, pre 30 godina, dobijeni rezultat je doveden u sumnju, tj. postavilo se pitanje tačnosti prethodno određenih NOEC vrednosti, ali su kasnija ispitivanja opovrgla ovu sumnju. U ispitivanju proliferacije ćelija korišćenjem humanih MCF-7 ćelija kancera dojke, Payne i sar. (7) su pokazali da smeša 2 agonista estrogenih receptora (dihlor-difenil-trihloretan - DDT i heksahlorcikloheksan) prisutnih u koncentracijama koje odgovaraju 25-100% njihovih pojedinačnih NOEC vrednosti, ispoljava toksičnost. Na isti zaključak ukazuju i ispitivanja Walter i sar. (8) koji su utvrdili efekat smeše 11 zagađivača prethodno dokazanih da izazivaju reproduktivnu toksičnost algi. Primenjeni zajedno, u niskim koncentracijama koje su pojedinačno ispoljavale do 1% efekta, izazvale su zajednički efekat od 64%.

Pored ove dve grupe smeša, smeša komponenata sa sličnim dejstvom i dejstvom komponenata koje nije slično, već pre nekih 50 godina, pioniri u istraživanju smeša (9,10) uvode kao treću kategoriju *interakcije*, koje su definisane kao svi oblici zajedničkog efekta koji odstupaju od prethodno opisana dva, tj. ukazuju na kombinovano dejstvo dve hemikalije koje može biti jače (sinergizam, potenciranje, supra-aditivnost) ili slabije (antagonizam, inhibicija, sub-aditivnost, infra-aditivnost) u odnosu na efekat aditivnosti. Ono sa čime se sigurno možemo složiti je da u organizmu komponente u smeši mogu delovati nezavisno jedna od druge odnosno bez uticaja jedna na drugu, pri čemu se njihove doze ili efekti adiraju, i da sa druge strane, komponente smeše mogu intereagovati, a mogući mehanizmi nastanka interakcija podrazumevaju hemijske, toksikokinetičke i toksikodinamske interakcije. Tabela I daje prikaz terminologije koja se najčešće koristi u studijama toksičnosti smeša (11).

Tabela I Terminologija koja se koriste u ispitivanju međusobnih uticaja hemikalija u smeši.

Table I Terminology used in joint action investigation of chemicals in mixture

Pojam	Definicija
Interakcije	Efekat smeše je različit od aditivnosti bazirano na uspostavljenom doza-odgovor odnosu pojedinačnih komponenata smeše.
Aditivnost	Efekat smeše se može proceniti na osnovu zbira nivoa izloženosti ili efekata pojedinačnih komponenata smeše.
Bez očiglednog uticaja	Kada komponenta smeše koja ne ispoljava toksične efekte na određeni sistem organa nema uticaja na toksičnost druge komponente na taj sistem organa.
Sinergizam	Efekat smeše je veći nego što se procenjuje za aditivnost na bazi toksičnosti pojedinačnih komponenata smeše.
Potencijacija	Kada komponenta smeše koja ne ispoljava toksične efekte na određeni sistem organa pojačava toksičnost druge komponente smeše na taj sistem organa.
Antagonizam	Efekat smeše je manji nego što se procenjuje za aditivnost na bazi toksičnosti pojedinačnih komponenata smeše.
Inhibicija	Kada komponenta smeše koja ne ispoljava toksične efekte na određeni sistem organa smanjuje toksičnost druge komponente smeše na taj sistem organa.
Maskiranje	Kada komponenta smeše ima suprotne ili kompetitivne efekte u odnosu na drugu komponentu smeše na istom sistemu organa, pri čemu komponente smanjuju jedna drugoj efekat, ili pak jedna komponenta nadjačava efekat druge.

Različiti pristupi i ograničenja pri ispitivanju toksičnosti smeša

Postoje dva osnovna pristupa u istraživanju smeša. Pristup „istraživanja celih smeša” u kojem se istražuju kompleksne smeše kao celine, dok se efekti pojedinačnih komponenata prisutnih u smešama ne razmatraju. Ovaj pristup koristan je za istraživanje specifičnih smeša, ali ne daje uvid u to kako pojedinačne komponente doprinose ukupnom efektu smeša. Da bi se razumeo doprinos pojedinačnih komponenata smeše ukupnom efektu smeše treba primeniti pristup koji se bazira na analizi komponenata, odnosno pristup kojim se predviđa efekat smeše na bazi znanja o efektima hemikalija koje ulaze u sastav smeše, pri čemu je neophodno odgovoriti na sledeća pitanja: 1. Da li je moguće predvideti efekte smeša na bazi podataka o

toksičnosti pojedinačnih komponenata smeše? 2. Može li se očekivati rizik pri ekspoziciji većem broju hemikalija prisutnih u niskim dozama? 3. Kolike su šanse da će hemikalije reagovati jedna sa drugom dovodeći do sinergizma i koji su to faktori koji determinišu potencijal za sinergističke interakcije itd.?

Tokom poslednjih decenija, predloženo je više modela za procenu toksičnosti smeša, i to od tradicionalnih metoda ispitivanja pa do sofisticiranih, fiziološki-zasnovanih toksikokinetičkih modela, izoblograma ili analize doza/odgovor površine, celokupne ili frakcione faktorske analize, itd (3). Sve one imaju prednosti ali i nedostatke i ograničenja.

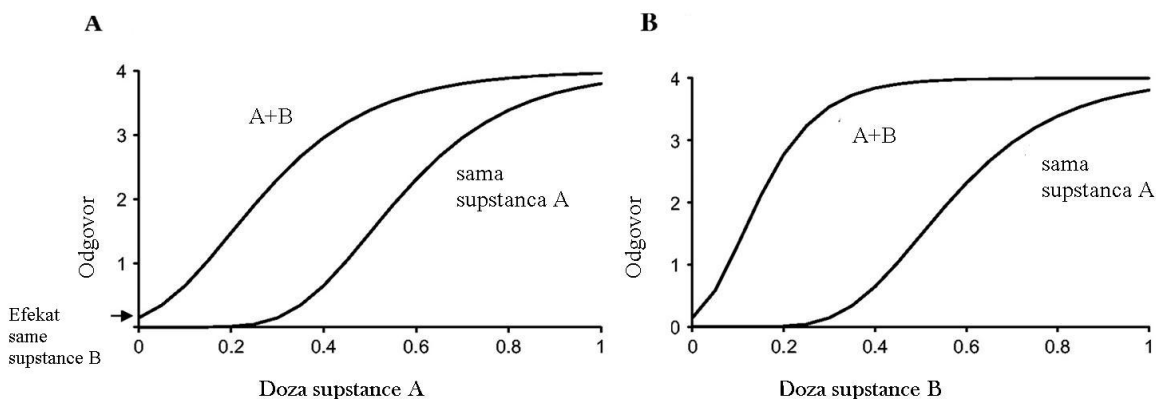
Za procenu toksičnosti i ekotoksičnosti pri izloženosti smešama različitih supstanci koje ne utiču jedna na drugu, odnosno ne stupaju u interakcije u osnovi se mogu primeniti dva pristupa: „suma doza/koncentracija” i „suma odgovora/efekata” (1). Pristup „suma doza/koncentracija” može dati pouzdanu procenu kombinovanih efekata komponenata koje imaju sličan mehanizam delovanja, a nemaju uticaj jedna na drugu na mestu efekta. Ovaj proces zasniva se na adiciji doza, odnosno koncentracija komponenata smeše, pri čemu se u obzir uzima njihova različita potentnost korišćenjem faktora relativne toksičnosti. Ovaj princip pretpostavlja da svaka hemikalija prisutna u smeši, bez obzira na to u koliko maloj količini, doprinosi ukupnoj toksičnosti smeše. Pristup „suma odgovora/efekata” koristi se ukoliko hemikalije komponente smeše deluju različitim mehanizmima toksičnosti ne utičući jedna na drugu. Treba istaći da prema ovom pristupu procene toksičnosti smeša, komponente koje su u smeši prisutne u dozama koje ne daju efekte ne doprinose ukupnoj toksičnosti smeše. Međutim, ove dve metodologije mogu dovesti do različitih procenjenih rizika za istu smešu, što može biti problem kada nije potpuno jasno za koji koncept se treba opredeliti. Osim toga, primena koncepta aditivnosti u potpunosti zanemaruje javljanje interakcija među hemikalijama u smeši, mogućnost razvijanja jačih, odnosno slabijih efekata od očekivanih na bazi adicije doza ili odgovora, kao i mogućnost razvijanja efekata koje pojedinačne komponente ne bi ispoljile. Stoga je razvijen objedinjen koncept koji je u skladu sa obe predložene forme aditivnosti, a u obzir uzima i mogućnost nastanka interakcija između komponenata smeše. Ovaj koncept koristi statistički model koji se bazira na osnovnoj definiciji aditivnosti koju je dao Berenbaum (12). Prema ovoj definiciji:

$$\sum x_i/E_i=1, \text{ gde } i \text{ ima vrednosti od } 1 \text{ do } c$$

u kombinaciji c hemikalija, E_i predstavlja koncentraciju/dozu i-te komponente koja dovodi do fiksnog odgovora, dok x_i predstavlja koncentraciju/dozu i-te komponente u kombinaciji sa c hemikalijama koja daje isti takav odgovor. Prema tome, ako je leva strana jednaka 1, supstance ne stupaju u interakcije, ukoliko je <1 radi se o

odgovoru koji je veći od aditivnog odnosno o sinergizmu, a ako je >1 u pitanju je odgovor manji od aditivnog odnosno radi se o antagonizmu.

Postoje brojne mogućnosti statističke obrade podataka pri proceni interakcija između komponenata smeše koje podrazumevaju faktorsku analizu, doza - efekat analizu površine i statističke metode za testiranje odstupanja od aditivnosti (3,13). Statistički modeli za testiranje odstupanja od aditivnosti korisni su u detekciji i karakterizaciji interakcija između komponenata smeše, a baziraju se na osnovnom konceptu da interakcije između komponenata smeše dovode do promena u nagibu krive doza - odgovor jedne komponente u prisustvu druge (13). Ovaj koncept zasniva se na pretpostavci da ukoliko postoje interakcije između komponenata smeše, nagib krive odnosa doza - odgovor hemikalije se menja u prisustvu jedne ili više drugih hemikalija komponenata smeše. Obrnuto, ako se nagib krive doza odgovor ne menja u prisustvu druge supstance onda hemikalije ne intereaguju tj. kombinuju se aditivno (13,14). Grafički prikaz ovog koncepta dat je na Slici 1.



Slika 1. A. Odsustvo promena u nagibu između krive doza-odgovor za supstancu A i krive doza-odgovor za supstancu A u prisustvu jedne doze supstance B ukazuje na odsustvo interakcija. B. Promena u nagibu između krive doza-odgovor za supstancu A i krive doza-odgovor za supstancu A u prisustvu jedne doze supstance B ukazuje na interakcije između supstanci A i B.

Figure 1. A. No slope change between dose-response curve for substance A and dose-response curve for substance A in the presence of one dose of substance B indicate no interaction. B. Change of slope between dose-response curve for substance A and dose-response curve for substance A in the presence of one dose of substance B indicate interaction.

Pored činjenice da svaki od modela za procenu toksičnosti smeše ima i svoja ograničenja, još jedan problem vezan za ispitivanje toksičnosti smeša je činjenica da se većina studija toksičnosti smeše bavi ispitivanjima toksičnosti visokih doza smeše koje sadrže nekoliko komponenti, dok je većina stvarnih izloženosti ljudi u životnoj sredini zapravo izloženost smešama koje sadrže brojne komponente, ali u niskim koncentracijama. Stoga se prilikom ekstrapolacije podataka dobijenih u takvim studijama javljaju izvesne nesigurnosti, a dodatni problem predstavlja činjenica da i odabir doza i koncentracija komponenata smeše može imati uticaj na potencijalne interakcije između komponenata smeša, pa samim tim i na njenu toksičnost. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka može se čak zaključiti da se značajne toksične interakcije između komponenata smeše mogu očekivati u dozama koje su ispod doza koje daju efekte kada se radi o pojedinačnim supstancama, čak i više nego pri visokim dozama (15).

Pitanje toksikološke procene rizika smeša postaje posebno kompleksno ukoliko želimo da izvršimo realnu projekciju izloženosti, s obzirom na činjenicu da su i ljudi, ali i ostali organizmi, izloženi multi-komponentnim smešama hemikalija prisutnih u našem okruženju - vodi, vazduhu, zemljištu, hrani i različitim predmetima opšte upotrebe. Problem postaje još složeniji ukoliko su to smeše koje nemaju u potpunosti definisan sastav, što je u realnom životu čest slučaj.

Aktuelna istraživanja u oblasti toksikologije smeše

Toksičnost smeše jedna je od velikih nepoznanica toksikologije, posebno ukoliko se u obzir uzme činjenica da su istraživanja ukazala na prisustvo velikog broja hemikalija u našem organizmu. Tako je 2009. godine Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) objavio četvrti nacionalni izveštaj o izloženosti hemikalijama iz životne sredine (16) koji predstavlja najdetaljniju procenu izloženosti populacije SAD hemikalijama iz životne sredine. Tom prilikom utvrđeno je prisustvo 212 hemikalija u ljudskoj krvi ili urinu među kojima su se nalazila brojna organohlorna jedinjenja i toksični metali. Naravno, sama detekcija ovih supstanci u organizmu ne znači nužno da će ove hemikalije u organizmu dovesti do toksičnih efekata, ali ovi podaci daju još jednu potvrdu značaja toksikološkog istraživanja „koktel efekta” prisutnih smeša u našem organizmu.

Do sada su istraživanja toksikologije smeša uglavnom obuhvatila grupe jedinjenja kao što su toksični metali, organski rastvarači, perzistentni organski zagađivači, pesticidi, te su predloženi i profili interakcija sledećih smeša: arsen, kadmijum, hrom, olovo; benzen, toluen, etilbenzen, ksilen; olovo, mangan, cink, bakar; perzistentne hemikalije prisutne u mleku dojilja; perzistentne hemikalije u ribama; trihloretilen, dihloretan i tetrahloretilen; cezijum, kobalt, polihlorovani bifenili, stroncijum, trihloretilen; arsen, hidrazini, mlazno gorivo, stroncijum-90, uranijum; atrazin,

deetiltrazin, diazinon, nitrati, simazin; hlorporifos, olovo, živa, metil-živa. Toksičnost navedenih smeša je razmatrana na osnovu literaturnih podataka o toksičnosti pojedinih komponenata smeše, kao i različitih kombinacija komponenata smeše, smeše su definisane na osnovu njihovog toksikološkog značaja koji je ocenjen kao prioritetan (17).

U novijoj literaturi se može naći i određen broj radova koji se bave ispitivanjem dvokomponentnih smeša, i to ispitivanjem toksičnosti smeša koje sadrže dva predstavnika jedne grupe hemikalija, kao što su na primer metali (18,19), ali i ispitivanja smeša koje sadrže komponente različitih toksikokinetičkih i toksikodinamičkih osobina, često sa ciljem definisanja međusobnih efekata komponenata, prisustva i tipa interakcija među komponentama na mestima toksičnog dejstva smeša (20,21,22,23).

Smernice u oblasti toksikologije smeša

Imajući u vidu značaj toksikologije smeša, brojne međunarodne organizacije razvijaju smernice i okvire za procenu rizika od smeša. Tako, ATSDR kao i druge relevantne organizacije poput Agencije za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency - EPA), Nacionalnog instituta za bezbednost i zdravlje na radu (National Institute of Occupational Safety and Health - NIOSH) razvijaju različite kriterijume, vodiče ili regulativu u ovoj oblasti. Evropska komisija je 2009. godine dala pregled naučnog i regulatornog stanovišta o toksikologiji smeša i preporuke o potrebnim aktivnostima za dalja istraživanja u ovoj oblasti u svom Izveštaju o toksičnosti smeša (State of the Art Report on Mixture Toxicity) (24). Na značaj problematike toksikologije smeša ukazuju i aktivnosti Svetske zdravstvene organizacije koja je 2007. godine u saradnji sa Internacionalnim programom o bezbednosti hemikalija (International Program on Chemical Safety) organizovala konferenciju čiji je cilj bio da analizira trenutno stanje u ovoj oblasti i predloži dalje korake. Izveštaj sa ovog sastanka sadržao je detaljan predlog smernica koje se i danas koriste u ovoj oblasti (25). Ove smernice su podržale i druge relevantne organizacije, kao što su Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (The Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD) i Naučni institut za ispitivanje zdravlja ljudi i životne sredine (Health and Environmental Science Institute - HESI). Okvir se bazira na hijerarhijskom pristupu koji uključuje razmatranje hazarda i ekspozicije u više različitih nivoa, pri čemu je svaki sledeći nivo „prefinjeniji” odnosno sigurniji ali zahteva više rada i više dostupnih podataka, a postavljeni okviri testirani su i donekle revidirani u istraživanjima koja su usledila (26).

Iako je poslednjih decenija uloženi ogroman napor značajnih organizacija ali i pojedinaca u okviru toksikologije da se odgovori na pitanje da li istovremena izloženost niskim dozama različitih hemikalija predstavlja rizik po ljudsko zdravlje i životnu

okolinu, na mnoga pitanja tek treba dati odgovor. Sigurno je da ne možemo očekivati da se ispitaju sve smeše kojima smo okruženi, imajući u vidu beskrajne kombinacije i to različitih doza 50 miliona hemikalija kojima smo okruženi. Pa ipak moramo naći način da bar delimično odgovorimo koliki toksikološki i ekotoksikološki rizik nose smeše iz našeg okruženja: kozmetički proizvodi, sredstva za zaštitu bilja, hemikalije koje se emituju pri različitim procesima proizvodnje, transporta, reciklaže, spaljivanja ili nekog drugog postupka uništavanja, ali i brojnih hemikalija koje se nalaze u vodi, vazduhu, zemljištu, hrani, bioti i humanom tkivu kao rezultat emisije iz različitih izvora.

Zahvalnica

Rad je delimično finansiran od strane Ministarstva za obrazovanje, nauku i tehnološki razvoj, broj projekta III46009.

Literatura

1. ATSDR. Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures. Agency Toxic Subst. Dis. Regist. 2004.
2. Feron VJ, Groten JP, van Bladeren, PJ. Exposure of humans to complex chemical mixtures: Hazard identification and risk assessment. Arch Toxicol Supp. 1998; 20, 363-373.
3. Feron VJ, Groten JP. Toxicological evaluation of chemical mixtures. Food Chem Toxicol. 2002; 40, 825-839.
4. COT (Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment). Risk Assessment of Mixtures of Pesticides and Similar Substances. London, UK. 2002.
5. Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, Backhaus T. Low-level exposure to multiple chemicals: Reason for human health concerns? Environ Health Perspect. 2007; 115, 106–114.
6. Hermens J, Leeuwang P, Musch A. Joint toxicity of mixtures of groups of organic pollutants to the guppy (*Poecilia reticulata*). Ecotoxicol Environ Saf. 1985, 9, 321-326.
7. Payne J, Scholze M, Kortenkamp A. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. Environ Health Perspect. 2001, 109, 391-397.
8. Walter H, Consolaro F, Gramatica P, Scholze M, Altenburger R. Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentrations (NOECs). Ecotoxicology 2002, 11, 299-310.
9. Bliss CI. The toxicity of of poisons applied jointly. Ann Appl Biol 1939, 26, 585-615.
10. Plackett RL, Hewlett PS. Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides. Annals of Applied Biology 1948, 35, 347-358.

11. Hertzberg RC, MacDonell MM. Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Sci Total Environ.* 2002; 288(1-2), 31-42.
12. Berenbaum MC. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol.* 1985; 114, 413–431.
13. Teuschler L, Klaunig J, Carney E, Chambers J, Conolly R, Gennings C, et al. Support of science-based decisions concerning the evaluation of the toxicology of mixtures: A new beginning. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2002; 36, 34–39.
14. Gennings C, Carter WH, Carchman RA, Teuschler LK, Simmons JE, Carney EW. A unifying concept for assessing toxicological interactions: Changes in slope. *Toxicol Sci.* 2005; 88, 287–297.
15. EFSA European Food Safety Authority. International Framework Dealing with Human Risk Assessment of Combined Exposure to Multiple Chemicals. *EFSA Journal.* 2013; 11(7), 3313.
16. CDC Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services, Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. CDC, Atlanta, SAD. 2009.
17. ATSDR - Interaction Profiles for Toxic Substances [WWW Document], n.d. URL <http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/index.asp> (accessed 27.11.15).
18. Matović V, Buha A, Đukic-Ćosic D, Bulat, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem Toxicol.* 2015, 78: 130-140.
19. Liu Y, Vijver MG, Peijnenburg WJ. Comparing three approaches in extending biotic ligand models to predict the toxicity of binary metal mixtures (Cu–Ni, Cu–Zn and Cu–Ag) to lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Chemosphere* 2014, 112, 282-288.
20. Buha A, Antonijević B, Bulat Z, Jačević V, Milovanović V, Matović V. The impact of prolonged cadmium exposure and co-exposure with polychlorinated biphenyls on thyroid function in rats. *Toxicol Lett.* 2013; 221: 83-90.
21. Ćurčić M, Janković S, Jačević V, Stanković S, Vučinić S, Durgo K, Bulat Z., Antonijević B. Combined effects of cadmium and decabrominated diphenyl ether on thyroid hormones in rats. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2012, 63, 255–262.
22. Zhu B, Wang Q, Wang X, Zhou B. Impact of co-exposure with lead and decabromodiphenyl ether (BDE-209) on thyroid function in zebrafish larvae. *Aquat Toxicol.* 2014, 157, 186–195.
23. Chen L, Zhang W, Zhang R, Lin K, He L, Wu L. The bioavailability and adverse impacts of lead and decabromodiphenyl ether on soil microbial activities. *Environ Sci Pollut Res.* 2015, 1-9.
24. EC European Commission, 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity. European Union.
25. International Programme on Chemical Safety. Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment. WHO 2009.
26. Meek ME, Boobis AR, Crofton KM, Heinemeyer G, Raaij MV, Vickers C. Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: A WHO/IPCS framework, *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011; 60, 1-14.

Basic principles of toxicological evaluation of mixtures

Aleksandra Buha , Vesna Matović*

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

*Author for correspondence: Vesna Matović, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, 11221 Belgrade, Vojvode Stepe 450

e-mail: vevodi@pharmacy.bg.ac.rs

tel: +381 11 3951251

Summary

The vast majority of toxicity studies and risk assessments deals with single chemicals. In reality, however, humans are exposed simultaneously to a large number of chemicals, indicating that exposure assessment and safety evaluation should focus on mixtures rather than on single chemicals. This review on the toxicology of chemical mixtures covers widely varying issues, ranging from the basic concepts and terminology of joint action and interaction of chemicals to different designs for studying the toxicity of mixtures. Literature data indicate that exposure to mixtures which contain low levels of chemicals, levels lower than their no observed adverse effect levels (NOAELs), can exert toxic effects whether their components have similar modes of action or not. Different approaches and examples of studies on priority real-life mixtures, strategy and guidelines for mixture risk assessment as well as challenges ahead are also presented.

Key words: mixtures, toxicity, concepts and models, interactions of components

Kozmetičke sirovine poreklom iz mora u proizvodima za negu kože

Ana Emeti¹, Dragana Vasiljević^{2*}, Marija Primorac², Gordana Vuleta²

¹ Crystal Derma d.o.o., Murmanska 11a, 11000 Beograd

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

*Autor za korespondenciju:

Dragana Vasiljević, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd
e-mail: vasilj@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Morska voda, so i mulj koriste se od davnina u tretmanima za ulepšavanje, ali se njihovi aktivni sastojci tek od nedavno koriste za izradu kozmetičkih proizvoda. Kozmetičke sirovine poreklom iz mora najviše se dobijaju iz algi i mikroalgi, mikroorganizama, sunđerica i korala. Egzopolisaharidi su novije kozmetičke sirovine koje proizvode morski mikroorganizmi. Navodi se da oni štite kožu od štetnih spoljašnjih uticaja, daju joj mekoću i smanjuju fine linije. Ekstrakti mikroalgi deluju antioksidantno i podstiču sintezu kolagena tipa I. Ekstrakt korala sa pseudopterozinima se koristi za umirivanje kože, dok su morski sunđeri jedan od najvećih alternativnih izvora za dobijanje kolagena. Od svih sirovina poreklom iz mora, alge su najviše istražene i imaju najveći potencijal. Iz algi se dobijaju karagen, agar i alginati, koji se koriste kao humektansi, ugušćivači i gelirajuća sredstva. Aktivni sastojci ekstrakata algi (polisaharidi, proteini, vitamini, minerali) hidriraju kožu, smanjuju fine linije, štite kožu od UV zraka, smanjuju crvenilo kože, a koriste se i u kozmetičkim proizvodima za smanjenje celulita.

Ključne reči: kozmetičke sirovine/sastojci iz mora, alge, sunđeri, korali, nega kože

Uvod

Više od 70% površine zemaljske kugle je prekriveno okeanima i morima, u kojima živi preko 90% organizama prisutnih na planeti. Morski organizmi su prirodni i obnovljiv izvor sastojaka, veoma različitih strukturnih i funkcionalnih karakteristika, koji danas nalaze veoma veliku primenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (1-3).

Sirovine poreklom iz mora veoma su popularne u savremenoj kozmetologiji, jer asociraju na svežinu, čistoću i lepotu. Sastojci iz mora se odavno koriste za izradu sapuna, različitih proizvoda za čišćenje i negu kože, šampona, proizvoda za brijanje. Čak i pesak i mulj, sa dna mora ili okeana, nalaze svoje mesto u izradi kozmetičkih proizvoda (1).

Najdublji delovi okeana i mora bogati su brojnim organizmima, koji su razvili zaštitne mehanizme prema ekstremnim temperaturama, pH vrednostima i UV zračenju. Oni su izvori veoma različitih sastojaka (vitamini, minerali, amino-kiseline, proteini, šećeri, lipidi, terpenoidi, polifenoli, polisaharidi, enzimi, pigmenti i dr.), koji na koži mogu da ispolje regenerativno, emolijentno, vlažeće, antioksidantno i zaštitno delovanje. S druge strane, sirovine poreklom iz mora, kao što su npr. karagen, agar, alginati mogu da doprinesu lepšem izgledu i većoj stabilnosti kozmetičkih proizvoda (4). Biotehnološki procesi, za dobijanje prirodnih sirovina na industrijskom nivou, sve više se usavršavaju, čime se štiti autentičnost sredine i sprečava narušavanje ili uništavanje prirode (1).

U kozmetičkim proizvodima, od sirovina poreklom iz mora, najviše se koriste morska voda i so, mulj, ekstrakti algi, mikroalgi i korala, polisaharidi mikroorganizama i „morski” kolagen.

Morska voda, so i mulj

Morsku vodu i morsku so još su stari Rimljani koristili za talasoterapiju (terapija morskom vodom). Prisutni minerali u morskoj vodi su fosfor, magnezijum, cink, gvožđe, mangan, hrom, selen, jod i kalijum, za koje se smatra da mogu imati blagotvorno dejstvo na koži (1, 3). Morska voda i so iz Mrtvog mora sadrže visoke koncentracije bromida i magnezijuma. Litar ove vode sarži čak 35% mineralnih materija (3, 5). Morska so se naročito koristi u izradi kozmetičkih proizvoda za piling, a za prisutne minerale se veruje da mogu uticati na cirkulaciju u koži (1). So dobijena isparavanjem morske vode (INCI: Sea salt) koristi se u proizvodima za kupanje i tretmane u tzv. spa centrima, u tonicima, kremama za lice i maskama za kosu. Preporučene koncentracije za upotrebu su 1-20% (6).

Morski mulj (INCI: Silt) se sakuplja sa morskog dna i sastoji se od finih, mikroniziranih čestica koje se talože vekovima. Sadrži veliku količinu aluminijum-

gvožđe- i magnezijum-silikata, u kristalnom i amorfnom obliku, sulfata i karbonata, kvarcnog peska, mika (*engl.* mica), oligoelemenata, što se dovodi u vezu sa mogućnošću da morski mulj pospešuje regeneraciju kože. Okluzija, koja se stvara nanošenjem mulja na kožu, povećava temperaturu na tom mestu, utiče na cirkulaciju i može doprineti boljem delovanju kozmetički aktivnih sastojaka. Mulj ima i veliku mogućnost adsorpcije, pa se koristi i u proizvodima za masnu kožu. Najviše je zastupljen u maskama za lice, sapunima, proizvodima za smanjenje celulita, proizvodima za piling. U maskama za lice, morski mulj se često kombinuje sa glinom (7).

Morski mikroorganizmi

Egzopolisaharidi (EPS) su polisaharidi koje stvaraju enzimi prisutni na ćelijskom zidu morskih bakterija, a sekretuju ih u spoljašnju okolinu. Egzopolisaharidi pomažu bakterijama da prežive na velikoj dubini mora i okeana, pri ekstremno niskoj temperaturi, visokom pritisku i minimalnoj količini svetlosti. Količina proizvedenih egzopolisaharida zavisi od bakterijske vrste koja ih proizvodi (8, 9).

Alteromonas macleodii je aerobna, nefermentativna, neluminiscentna, gram-negativna bakterija. Može da se razvija i pri normalnom atmosferskom pritisku, što je velika prednost, s obzirom da je problematičan opstanak organizama iz velikih dubina mora u uslovima koji vladaju na površini (9). *Alteromonas Ferment Filtrate* je INCI naziv za kozmetičku sirovinu – filtrat (Exo HTM, Lucas Mayer Cosmetics, Kanada), koji se dobija tako što u određenom medijumu za rast *Alteromonas macleodii* izaziva fermentaciju (10). Supernatant nakon fermentacije sadrži aminokiseline i mlečnu kiselinu, koje se primenjuju u kozmetičkim proizvodima namenjenim za hidrataciju kože (11).

Jedan od glavnih razloga za upotrebu egzopolisaharida u kozmetičkim proizvodima je visok sadržaj uronskih kiselina (glukuronska i galakturonska kiselina) (12). Na svetskom tržištu se mogu naći različiti egzopolisaharidi za kozmetičku upotrebu, a jedan od njih je i Hyadisine[®] (INCI: Aqua, Pseudoalteromonas, Exopolysaccharides, Citric acid), proizvođača Lipotec, Španija, dobijen biotehnološkim postupkom. Hyadisine[®] je „morska” alternativa hijaluronskoj kiselini, jer kao glavnu komponentu sadrži glukuronsku kiselinu, koja ulazi i u sastav hijaluronske kiseline. Proizvođač navodi da Hyadisine[®] ima i trenutni i produžen efekat hidratacije kože, a određena *in vitro* i *in vivo* ispitivanja su pokazala da ima čak veći afinitet za vezivanje vode od hijaluronske kiseline. U *in vivo* studiji, koju je sproveo proizvođač, učestvovalo je 20 ispitanica, prosečne starosti 44,3 godine. Placebo krem je nanošen na desnu stranu lica, a krem sa 0,1 % Pseudoalteromonas egzopolisaharida na levu stranu lica tokom 20 dana, dva puta dnevno. Hidratacija kože je merena korneometrom CM 825 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Keln, Nemačka) nakon 2 i 8 sati, kao i 20-og

dana po nanošenju krema. Proizvođač navodi da su u ovom ispitivanju zabeležena značajna povećanja hidriranosti kože upotrebom krema sa 0,1% Pseudoalteromonas egzopolisaharida, u odnosu na placebo krem. Dobijeni rezultati su pokazali da je vlažnost kože povećana za 36,8% nakon 2h nanošenja krema sa 0,1% Psudoalteromonas egzopolisaharida, 30,8% nakon 8h i 37,2% nakon 20 dana (13).

U drugom *in vivo* ispitivanju, u kome je učestvovalo 10 ispitanica, pokazano je da krem sa 5% Hyadisine[®] može da smanji fine linije oko očiju za 33% nakon 15 dana i 44% nakon 30 dana upotrebe, ako se krem nanosi dva puta dnevno. Ovi rezultati su dobijeni pravljenjem silikonskih otisaka kože oko očiju i njihovom analizom konfokalnim mikroskopom (13).

Mikroalge

Za razliku od velikog broja makroalgi, samo se nekoliko vrsta mikroalgi koristi kao sirovina u kozmetologiji. Mikroalge sadrže vitamine, pigmente, proteine i druge sastojke koji nalaze primenu u kozmetologiji. Prema navodima određenih proizvođača, ekstrakti mikroalgi mogu da utiču na smanjenje oksidativnog stresa ćelije, što je značajno dejstvo u kozmetičkim proizvodima sa oznakom „antiaging”. Izvori antioksidanasa su mikroalge *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Porphyridium cruentum* (14).

Phaeodactylum tricornerutum je mikroalga, rasprostranjena u priobalnim vodama Mediterana, Velike Britanije, Baltika i Kariba. Ekstrakt *Phaeodactylum tricornerutum* je veoma bogat polinezasićenim masnim kiselinama. Ovaj ekstrakt može da utiče na sintezu cerebrozida i ceramida 4, 5 i 6 i na koži ostvaruje hidrirajuće efekte. Na tržištu se mogu naći kozmetičke sirovine, kao što su Depollutine[®] (Soliance, Francuska) i Megassane[®] (Impag, Švajcarska), koje sadrže ekstrakt *Phaeodactylum tricornerutum*. Depollutine[®] (INCI: Aqua, Arginine PCA, *Phaeodactylum tricornerutum* extract) je kozmetička sirovina sa anti-age delovanjem u koncentracijama 1-3% (15). Proizvođač navodi da Megassane[®] (INCI: Caprylic/Capric Triglyceride, *Phaeodactylum Tricornerutum* extract, Tocopherol) štiti proteine kože od UV zraka, revitalizuje kožu i ima anti-age efekat. Preporučena koncentracija Megassane[®] u kozmetičkim proizvodima je 0,1-0,3% (16).

Porphyridium cruentum spada u red crvenih mikroalgi. Sadrži polisaharide slične humanim glikozaminoglikanima (GAG), koji imaju sposobnost da obrazuju tanki zaštitni film na koži. Porphyraline SP[®] (INCI: *Porphyridium Cruentum* extract), proizvođača Impag, Švajcarska, preporučuje se zbog vlaženja površine kože, jer obrazuje nevidljiv film na koži i štiti je od spoljašnjih uticaja (16). Liftonin[®]-xpress 4 (INCI: Hydroxypropyl Methylcellulose, Pullulan, *Porphyridium Cruentum* Extract), proizvođača Rahn, Švajcarska je liofilizat crvene alge *Porphyridium cruentum* koji hidrira kožu i smanjuje dubinu finih linija. U *in vivo* studiji, koju je sproveo proizvođač

Rahn, učestvovao je 21 dobrovoljac, kavkaskog tipa kože, starosti između 49 i 64 godine (prosečna starost 59 godina). Na zonu oko jednog oka nanošen je gel sa 3% Liftonin[®]-xpress-a 4. Isti gel, bez Liftonin[®]-xpress-a nanošen je na fine linije zone oko drugog oka. Dubina finih linija merena je 3D optičkim PRIMOS uređajem, pre i 1h posle primene gelova. Rezultati su pokazali da je dubina finih linija smanjena za 31%, a hrpavost kože za 12% nakon jedne primene gela sa 3% Liftonin[®]-xpress-a 4 (17).

Porphyraline SP[®] i Liftonin[®]-xpress 4 se preporučuju u proizvodima u koncentraciji 0,5-3 %, za poboljšavanje glatkoće i vlažnosti površinskih slojeva kože (17).

Nemačka kompanija Evonik proizvodi standardizovani ekstrakt mikroalge *Cyanidium caldarium*, pod zaštićenim nazivom TEGO[®] Stemlastin. Ekstrakt sadrži minerale, aminokiseline, polifenole i γ -aminobuternu kiselinu. Prema navodima proizvođača, TEGO[®] Stemlastin vraća koži mladalački izgled i smanjuje znakove hronološkog starenja, a preporučuje se, u koncentracijama 1-5%, za izradu kremova, maski i seruma za lice (18, 19). Rezultati sprovedenih ispitivanja su pokazali da prirodni u/v krem sa 3% TEGO[®] Stemlastin-a, koji je stabilizovan upotrebom emulgatora gliceril stearat citrata (Axol[®] C62 pellets, proizvođača Evonik, Nemačka) ima lep izgled i dobru fizičku stabilnost u toku šest meseci skladištenja na sobnoj temperaturi (20).

Alge

Tradicionalna klasifikacija algi zasnovana je na boji njihovog talusa, pa su na osnovu toga razvrstane u sledeće glavne grupe: crvene (Rodophyta), mrke (Pheophyta), zelene (Chlorophyta) i plavo-zelene (Cyanophyta) (2, 21). Crvene i mrke alge imaju najveći značaj u kozmetičkoj industriji. U formulacijama kozmetičkih proizvoda uglavnom se nalaze tečni ekstrakti algi, dok su alge u obliku praška (osušene i sprasene alge) manje zastupljene. Brojni agresivni fizičko-hemijski postupci, pri izolaciji i prečišćavanju aktivnih sastojaka iz algi mogu da dovedu do uništavanja ili neželjenog modifikovanja aktivnih sastojaka. Ekstrakcija omogućava izolovanje najvećeg broja aktivnih sastojaka: vitamina, proteina, minerala, lipida, pigmenta i drugih. Pod opštim INCI nazivom „Algae Extract” moguće je naći širok opseg ekstrakata iz različitih vrsta (makro- i mikro-) algi. Ovi ekstrakti se upotrebljavaju u kozmetičkim proizvodima za vlaženje kože, anti-age proizvodima, za smanjenje crvenila kože lica, za tretiranje delova tela sa celulitom, kao i za zaštitu od UV zračenja (2, 21).

Najznačajniji sastojci iz crvenih algi su: agar, karagen, fikobiliproteini, polinezasićene masne kiseline i terpeni.

Agar (INCI: Agar) se uglavnom dobija iz vrsta algi *Gracilaria* i *Gelidium*. Koristi se kao gelirajuće sredstvo, ugušćivač i kao sredstvo za stabilizaciju kozmetičkih emulzija (22).

Karagen (INCI: Carageenan) se dobija iz algi *Gigartina stellata* i *Chondrus crispus*. U kozmetičkim proizvodima se upotrebljavaju natrijum-, kalijum-, kalcijum- i magnezijum-karagenati. Koriste se u gelovima i krem-gelovima za negu kože i kao ugušćivači u mutnim pastama za zube, nekim šamponima i određenim vrstama kozmetičkih losiona (22).

Arct'Alg[®] (INCI: *Chondrus Crispus* (Carrageenan) extract), proizvod firme Biotech (SAD), je ekstrakt iz crvene alge *Chondrus crispus*. U sastav ove alge, osim polisaharida karagena, ulaze i taurin, antioksidansi floridozidi i peptid L-citrulil-L-arginin. Suva masa crvenih algi sadrži do 10% L-citrulil-L-arginina. L-citrulin ulazi u sastav prirodnog vlažećeg faktora kože - NMF (*engl.* Natural Moisturizing Factor), koji se nalazi u korneocitima u obliku granula. Arct'Alg[®] se koristi (1-5%) u kozmetičkim proizvodima za vlaženje i zaštitu kože lica i tela (23, 24).

Najznačajnija jedinjenja, koja se dobijaju iz mrkih algi, a ulaze u sastav kozmetičkih proizvoda su: alginati, fukoidani, florotanini i fukoksantin. Najčešće vrste mrkih algi, koje se koriste za dobijanje kozmetičkih sirovina su *Saccharina longicuris*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, *Pelvetia canaliculata* i *Undaria pinnatifida* (25).

Alginati su derivati alginske kiseline, polimera manuronske i glukuronske kiseline i imaju primenu kao ugušćivači. U kozmetičkim proizvodima se najčešće koristi natrijum alginat (INCI: Algin). U maskama za lice, gelovima za kosu i šamponima, natrijum alginat se koristi u koncentraciji 2-6%, a u pastama za zube 0,5-1%. Alginati su i humektansi, povećavaju količinu vode u koži i tako imaju uticaj na njenu hidrataciju (22, 26).

Fukoidani su sulfatni polisaharidi, koji sadrže fukozu, a ekstrahovani su iz *Fucus vesiculosus*, *Ecklonia kurome* i *Pelvetia canaliculata*. Imaju sposobnost da formiraju film na koži i kosi, zadržavaju neophodnu vlagu, pa se nalaze u proizvodima za hidrataciju kože, šamponima i kondicionerima za kosu (21). Tajvanska kompanija Hi-Q je iz mrkih algi specijalnim biotehnoškim postupkom dobila fukoidan niske molekulske mase (< 500 Da), koji je plasirala na tržište pod nazivom FucoSkin. Prema navodima proizvođača, oligofukoidan ima mnogo bolje efekte na koži od fukoidana makromolekulske strukture, u smislu smanjenja finih linija, povećanja elastičnosti i sadržaja vlage u koži (27).

Florotanini su fenolna jedinjenja, koja se nalaze jedino u strukturi mrkih algi. Ispitivanja koja se sprovode pokazuju da su florotanini vrlo efikasni u „hvatanju” slobodnih radikala, imaju antioksidantnu ulogu i štite kožu od UVA i UVB zraka (21).

Fukoksantin je najznačajniji karotenoid, izolovan iz mrkih algi, sa antioksidantnim i zaštitnim dejstvom od UV zračenja. Takođe, fukoksantin ima pozitivan efekat na izbeljivanje hiperpigmentirane kože (26).

Fucus vesiculosus je mrka alga, koja se u kozmetičkim proizvodima koristi zbog visokog sadržaja alginata (do 40%), polisaharida (do 60%), fukosterola, vitamina i minerala (13-23%). Ekstrakt *Fucus vesiculosus*-a može se koristiti u koncentraciji 1-10%, u kozmetičkim proizvodima za smanjenje crvenila kože, hidrataciju, anti-age i proizvodima za smanjenje celulita (28). Francuska kompanija Seppic proizvodi tečne ekstrakte *Fucus vesiculosus*-a: Phycol FV™ (INCI: Aqua, Propylene glycol, *Fucus vesiculosus* extract) i Superphyco-D BG PF™ (INCI: Aqua, Butylene glycol, *Algae* extract), koji su rastvorljivi u vodi i Oleaphycol FV™ (INCI: Caprylic/Capric Triglyceride, *Fucus vesiculosus* extract), koji je rastvorljiv u ulju (29).

Sunđeri i korali

Ekstrakt dobijen iz mekog korala *Pseudopterogorgia elisabethae* koristi se već nekoliko godina kao aktivni sastojak kozmetičkih proizvoda za smanjenje crvenila kože. Ekstrakt sadrži pseudopterozine (diterpenpentoziglikozide), a preporučuje se u kozmetičkim proizvodima koji neguju kožu posle izlaganja suncu (1).

Od oko 7000 izolovanih morskih sirovina, 33% se dobija iz sunđera, koji su veoma važan izvor različitih sastojaka, posebno kolagena. Kolagen (poznat kao morski kolagen), koji se dobija iz morskih organizama (riba, sunđera, meduza), sadrži visoku koncentraciju 4-hidroksiprolina. Sadržaj kolagena u sunđerima varira od 6-16%. Prečišćeni morski kolagen dobijen iz sunđera *Ircinia fusca* identičan je po strukturi humanim kolagenima tip I i tip IV, pa može predstavljati bezbednu zamenu za životinjski kolagen, koji se ne koristi u kozmetologiji (30).

Hymeniacidon heliophila, poznat i kao „sunčani sunđer”, bogat je 5-hidroksitriptofanom i može da štiti kožu od UV zračenja. Ekstrakt *Hymeniacidon heliophila* utiče na mikrocirkulaciju (tvrdi se da smanjuje tamne kolutove oko očiju) i deluje antioksidantno, te je sastojak anti-age proizvoda, proizvoda za negu kože oko očiju i proizvoda za zaštitu kože od sunca (1).

Zaključak

Različiti organizmi nastanjeni u morima i okeanima, pre svega alge, sunđeri, korali i mikroorganizmi, danas su značajni izvori sirovina za kozmetičku industriju. Sastojci, poreklom iz mora su prirodni, a izvori za njihovo dobijanje su obnovljivi, što je od izuzetnog značaja za očuvanje čovekove okoline. Aktivni sastojci poreklom iz mora (najčešće ekstrakti makro- i mikroalgi, „morski” kolagen, egzopolisaharidi iz morskih mikroorganizama) mogu da ispolje različite kozmetičke efekte na koži, pre svega vlaženje kože, antioksidantni efekat, smanjenje dubine finih linija, nega kože posle sunčanja, smanjenje crvenila kože lica. S druge strane, karagen, agar i alginati, koji se dobijaju iz algi, takođe su značajni za kozmetičku industriju kao ugušćivači i gelirajuća sredstva.

Potrošači su zainteresovani za kozmetičke proizvode koji sadrže sastojke poreklom iz mora, posebno za kreme i losione za negu kože, koji sadrže morski kolagen ili ekstrakte algi.

Literatura

1. Broakway B. Marine derived ingredients for personal care. *Personal Care*. 2012; 5(2): 70-3.
2. Wang HM, Chen CC, Huynh P, Chang JS. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Biores Technol*. 2015;184: 355–62.
3. Kim SK. Marine cosmeceuticals. *J Cosm Dermat*. 2014; 13: 56-67.
4. Balboa EM, Conde E, Soto ML, Armada LP, Domínguez H. Cosmetics from marine source. In: Kim SK (ed). *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2015, 1015-42.
5. The Deep Sea [Internet]. Dr Paul Yancey/MarineBio.org. [cited 2014 May 22]. Available from: <http://marinebio.org/oceans/deep>.
6. Sea Salt Extra Fine: Moisture Balance from the Sea [Internet]. Innovadex [cited 2014 May 22]. Available from: www.innovadex.com/documents/1190569.pdf?bs=762&b=319713&st=20.
7. Thermal Alluvium with Oligoelements [Internet]. Provital Group (Spain, International sort). [cited 2014 July 15]. Available from: www.ulprospector.com/documents/742520.pdf?bs=2443&b=71285&st=1&sl=30437042&crit=a2V5d29yZDpbbXVkXQ%3d%3d&k=mud|muds.
8. Nwodo UU, Green E, Okoh AI. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(11):14002-15.
9. Thibodeau A. Protecting the Skin from Environmental Stresses [Internet]. Atrium Biotechnologies, Quebec, PQ Canada [cited 2014 July 15]. Available from: www.alluredbooks.com/sample_pages/ss_sample_2.pdf.
10. SpecialChem [Internet]. [cited 2014 July 15]. Available from: www.specialchem4cosmetics.com/services/inci/ingredient.aspx?id=17052.
11. Izawa N, Sone T. Cosmetic ingredients Fermented by Lactic Acid Bacteria. In: Anazawa H, Shimizu S (eds). *Microbial Production: From Genome Design to Cell Engineering*. New York: Springer. 2014; 233-42.
12. Vidanarachchi J, Kurukulasuriya M. Industrial Applications of Chitosan as a Marine Cosmeceutical. In: Kim SK (ed). *Marine cosmeceuticals - Trends and prospects*. Boca Raton: CRC Press. 2012; 335-71.
13. Mateu M, Davi C, Cañadas E, Soley A, Delgado R. Effective ingredients from marine biotechnology. *Personal Care*. 2012; 5(2) 53-7.
14. Stolz P, Obermayer B. Manufacturing microalge for skin care. *Cosm Toil*. 2005; 120(3): 99-106.

15. SpecialChem [Internet]. [cited 2014 July 19]. Available from: www.specialchem4cosmetics.com/tds/depollutine/soliance/18061/index.aspx.
16. Impag AG. Solianceproduct catalogue - 2014. [Internet]. [cited 2014 July 15]. Available from: www.impag.ch/fileadmin/resources/files/ch/Personal_Care/Publikationen/Produktkatalog_Soliance_2014_web.pdf.
17. Culture of microalgae in hatcheries [Internet]. Wikipedia. [cited 2014 August 27]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Culture_of_microalgae_in_hatcheries.
18. TEGO[®] Stemlastin - Combats the appearance of chronological aging. [Internet]. [cited 2015 Juny 17]. Available from: http://glenncorp.com/wp-content/uploads/2014/04/USA_DS_TEGO-Stemlastin_02182015-2.pdf.
19. Pflaumbaum M, Farwick M, Mentel M, Köhler T, Schild J. Red algae delays chronological ageing. *Personal Care* 2013; 4: 113-6.
20. Planić S. Kozmetički U/V kremovi stabilizovani prirodnim emulgatorom gliceril stearat citratom - formulacija i karakterizacija. Završni rad. Beograd: Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2015.
21. Smith L. Marine products. In: Schlossman M (ed). *The Chemistry and Manufacture of cosmetics: Cosmetic Specialties and Ingredients*. Boca Raton: Allured Business Media. 2010; 165-225.
22. Čajkovac M. *Kozmetologija*. Drugo izdanje. Jastrebarsko: Naklada Slap. 2005; 114-5.
23. Arct'Alg[®] [Internet]. [cited 2014 September 12]. Available from: <http://www.biosiltech.com/sites/default/files/Arct-Alg.pdf>.
24. Nicolay J, Frechet M. Red algae extract improves barrier recovery. *Personal Care*. 2013; 6(5): 37-40.
25. Yang B, Lin X, Zhou X, Yang X, Liu Y. Chemical and Biological Aspects of Marine Cosmeceuticals. In: Kim SK (ed). *Marine cosmeceuticals - Trends and prospects*. Boca Raton: CRC Press. 2012; 11-30.
26. Senevirathne M, Kim SK. Brown Algae-Derived Compounds as Potential Cosmeceuticals. In: Kim SK (ed). *Marine cosmeceuticals - Trends and prospects*. Boca Raton: CRC Press. 2012; 179-86.
27. Scott R. Marine ingredients: latest actives from the deep. *Personal Care* 2015; 4: 43-4.
28. Provital Group (Spain, International sort). [cited 2014 August 11]. Available from: www.centerchem.com/Products/DownloadFile.aspx?FileID=6442.
29. Seppic. Biotech Marine. High Tech Bioactive Substances & Plant Stem Cells Catalogue. Katalog proizvođača. 2014.
30. Rao VJ, Pallela R, Prakash B. Prospect of marine sponge collagen and its applications in cosmetology. In: Kim SK. (ed). *Marine cosmeceuticals - Trends and prospects*. Boca Raton: CRC Press. 2012; 77-105.

Cosmetic ingredients from the sea in skin care products

Ana Emeti¹, Dragana Vasiljević^{2*}, Marija Primorac², Gordana Vuleta²

¹ Crystal Derma d.o.o., Murmanska 11a, 11000 Belgrade

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

Summary

Sea water, salt and mud have been used for centuries in beautification treatments, but their active ingredients have become a recent challenge in formulating new cosmetic products. Cosmetic ingredients which originate from the sea, are mostly obtained from algae, microalgae, marine sponges, corals and microorganisms. Exopolysaccharides (EPS) are new cosmetic ingredients produced by marine micro-organisms. They are used to protect skin from harmful external influences, give it softness and minimize fine lines. Pseudopterosins, present in the extracts of corals, are used to soothe the skin, while marine sponges are one of the major alternative to animal-derived collagen. Algae have been the most researched group, with the greatest potential among different sources of marine ingredients. Carrageenan, agar, and alginates from algae act as humectants, thickeners and gelling agents. The active ingredients of algae extracts (polysaccharides, proteins, vitamins, minerals) could hydrate, minimize fine lines, protect the skin from UV radiation, decrease redness and cellulite.

Keywords: cosmetic ingredients from the sea, algae, sponges, corals, skin care

Prilozi – Contributions

POVEZIVANJE INDUSTRIJE I UNIVERZITETA U NASTAVI INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Nastavnici i saradnici Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu su u periodu 2013 – 2015. godina učestvovali u realizaciji projekta LIAT-Ph (*Linking Industry and Academia in Teaching Pharmaceutical Development and Manufacture*) koji je finansiran u okviru programa Erasmus+ Lifelong Learning. Koordinator projekta bio je Univerzitet u Dublinu, a učesnici su, pored Univerziteta u Beogradu, bili i Univerzitet u Ljubljani, Univerzitet u Helsinkiju, Kraljičin univerzitet u Belfastu i sedam kompanija: Amebis Ltd., APC Ltd., Innopharma Labs Ltd., Nacionalni institut za istraživanje i obuku u oblasti biotehnoških procesa, Pfizer Ltd. i Sigmoid Pharma Ltd. iz Irske i Brinox inženjering d.o.o. iz Slovenije.



Cilj projekta je bio uspostavljanje saradnje između univerziteta i farmaceutske industrije usmerene ka unapređenju nastavnih sadržaja i metoda nastave u oblasti farmaceutske tehnologije i industrijske farmacije. U početnoj fazi rada, identifikovane su kompetencije farmaceuta od značaja za rad u razvoju i proizvodnji lekova i sprovedena uporedna analiza nastavnih sadržaja iz ove oblasti na nivou integrisanih akademskih studija farmacije, kao i na nivou poslediplomskih doktorskih i specijalističkih studija. Partneri iz industrije su pokazali zainteresovanost i spremnost da doprinesu kreiranju nastavnih sadržaja, učestvuju u realizaciji nastave kao gostujući predavači, kao i kroz organizaciju posete studenata i studentske letnje prakse.

U okviru projekta održana su tri zajednička intenzivna seminara za studente doktorskih studija, uz učešće nastavnika sa različitih univerziteta i predavača iz industrije. Prvi intenzivni seminar, posvećen razvoju i proizvodnji bioloških lekova održan je u Nacionalnom institutu za istraživanje i obuku u oblasti biotehnoških procesa u Dublinu. Organizator i domaćin Drugog intenzivnog seminara bio je Univerzitet u Beogradu. Tema je bila „Razvoj i proizvodnja lekova u okviru QbD koncepta”, a učesnici su, pored predavanja, učestvovali i u interaktivnim radionicama posvećenim primeni eksperimentalnog dizajna u razvoju i proizvodnji lekova i primeni računarskih metoda simulacije gastrointestinalne apsorpcije lekova. Treći intenzivni seminar je održan na Kraljičinom univerzitetu u Belfastu. Tema seminara su bile novine u razvoju i proizvodnji čvrstih farmaceutskih oblika.

Razvijena su i četiri zajednička onlajn kursa namenjena studentima doktorskih studija i stručnjacima zaposlenim u farmaceutskoj industriji. Teme kurseva su: (1) Preformulaciona istraživanja u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika, (2) Eksperimentalni dizajn u farmaceutskoj tehnologiji, (3) Napredna ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata, i (4) Izazovi u razvoju lekova za primenu u veterini. Kursevi su dostupni na platformi za e-učenje Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (uz prijavu preko veb stranice projekta).

Pored rada na razvoju nastavnih materijala, prepoznata je i potreba za promenom načina realizacije nastave i provere znanja. Naglašen je značaj primene metoda aktivnog učenja, zasnovanih na analizi i rešavanju problema iz prakse, kao i procena znanja koja će obuhvatiti realne studije slučaja, te je u okviru projekta pripremljena zajednička baza pitanja zasnovanih na prikazu studija slučaja, za različite nivoe nastave.

U okviru projekta je realizovana i letnja praksa studenata doktorskih studija u kompanijama učesnicima projekta, kao i dve konferencije posvećene kompetencijama u

oblasti industrijske farmacije (Portorož, 2014 i Helsinki, 2015). Ostvarena je intenzivna saradnja, razmena informacija, znanja, iskustava i dobrih praksi između institucija učesnica kao osnov i model za dalje povezivanje i saradnju u okviru „saveza znanja”. Više informacija o konzorcijumu i rezultatima projekta može se naći na veb-sajtu www.liatph.com.



Co-funded by the Lifelong
Learning Programme
of the European Union

prof. dr Jelena Parojčić
rukovodilac projektnog tima
Univerziteta u Beogradu