

UDK 615 (497.11)

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

ARHIV ZA FARMACIJU

Godina 67

Broj 4

Beograd, 2017.

ČASOPIS SAVEZA
FARMACEUTSKIH
UDRUŽENJA SRBIJE

4/2017

SADRŽAJ – CONTENTS

Originalni naučni radovi – Original scientific papers

- **Mirjana Antonijević, Katarina Nikolić, Jelica Vučićević,
Slavica Oljačić, Danica Agbaba** 233

**3D-QSAR modelovanje i analiza farmakofore antagonista serotonininskih
5-HT_{2A} receptora**

**3D-QSAR modeling and pharmacophore study of serotonin 5-HT_{2A}
receptors antagonists**

Stručni radovi – Professional papers

- **Dragana Vasiljević, Nataša Radonjić, Gordana Vuleta** 248

Vitamini u kozmetičkim proizvodima - savremeni stavovi i praksa

Vitamins in cosmetic products –current opinions and practice

- **Nataša Bubić Pajić, Biljana Gatarić, Jelena Čivčija, Gordana Vuleta** 265

Nanofarmaceutski preparati – karakteristike značajne za farmaceutsku praksu

Nanopharmaceuticals – characteristics of importance for pharmaceutical practice

3D-QSAR modelovanje i analiza farmakofore antagonista serotoninskih 5-HT_{2A} receptora

Mirjana Antonijević, Katarina Nikolić*, Jelica Vučićević,
Slavica Oljačić i Danica Agbaba

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

*Autor za korespondenciju: Prof. dr Katarina Nikolić

Tel: +381-11-3951-259, Mob: +381-63-84-30-677. Fax: +381-11-3974-349

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

Kratak sadržaj

Formiranjem statistički pouzdanog 3D-QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*) modela omogućeno je definisanje strukture farmakofore antagonista serotoninskih 5-HT_{2A} receptora i selekcija ključnih molekulskih determinanti za dizajn novih antagonista serotoninskih 5-HT_{2A} receptora. 3D-QSAR studija je primenjena na seriji od 50 antagonista serotoninskih 5-HT_{2A} receptora koji su podeljeni na trening set od 33 molekula i test set od 14 molekula. Trening set je korišćen za formiranje 3D-QSAR modela, dok je test set primenjen za validaciju modela. Za ovu 3D-QSAR studiju je upotrebljen *Pentacle 1.07* program.

Izračunati validacioni i statistički parametri 3D-QSAR modela ($R^2=0,96$; $Q^2=0,75$; $RMSEE=0,211$), kao i parametri eksterne validacije na test setu ($R^2_{pred}=0,51$; $RMSEP=0,558$), ukazuju na pouzdanost i dobru moć predviđanja izabranog 3D-QSAR modela. Na osnovu najuticajnijih varijabli izabranog 3D-QSAR modela definisana je struktura farmakofora za antagonističko dejstvo na serotoninskim 5-HT_{2A} receptorima: donor i akceptor vodonične veze na rastojanju od 10,4Å-10,8Å (v495: O-N1); karbonilni kiseonik i sterni centar na rastojanju od 14,8Å-15,2Å (v640: N1-TIP); hidrofobni centar i donor vodonične veze na rastojanju od 3,2Å-3,6Å (v276: DRY-O); dva sterna centra na rastojanju od 18,8Å-19,2Å (v248: TIP-TIP).

Ključne reči: 3D-QSAR, antagonisti, 5-HT_{2A}receptori, farmakofora.

1.Uvod

Ranija istraživanja su pokazala da se dejstva serotonina, (*5-HT*), ne odvijaju preko istog tipa receptora. Detaljnijim studijama je utvrđeno da postoji sedam glavnih tipova serotoninskih receptora, *5-HT₁₋₇* od kojih se tipovi 1, 2 i 5 dalje dele na podtipove [1].

5-HT_{2A} serotoninski receptori pripadaju G-protein receptorima, tačnije *Gq* receptorima koji nakon vezivanja agoniste aktiviraju fosfolipazu C koja hidrolizuje fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat na diacilglicerol (DAG) i inozitol-trifosfat. DAG deluje kao sekundarni glasnik i aktivira protein kinazu C koja zajedno sa inozitol-trifosfatom fosforiliše ciljne proteine. Njihovom aktivacijom dolazi do ekscitacije neurona [1].

5-HT_{2A} receptori se nalaze u centralnom nervnom sistemu (CNS), perifernom nervnom sistemu (PNS), na glatkoj muskulaturi, trombocitima, želucu. Efekti *5-HT* na glatkoj muskulaturi i trombocitima, što je poznato već godinama, odvijaju se posredstvom *5-HT_{2A}* receptora. Takođe, halucinogeni efekti koje ostvaruje dimetilamid lizerginska kiselina (LSD) posredovani su ovim tipom receptora. [1]. Uloga *5-HT* receptora u normalnim fiziološkim procesima je verovatno manja, ali on postaje mnogo važniji u patološkim uslovima kao što su migrena, astma, karcinoidni tumori, vaskularna tromboza, šizofrenija, depresija, anksioznost [1].

Utvrđeno je da antagonisti serotoninskih *5-HT_{2A}* receptora deluju anksiolitički i antimigrenozno, a efikasni su i u kontroli nekih simptoma karcinoidnog sindroma. Mnogi atipični antipsihotici, pored dejstva na dopaminske receptore, ispoljavaju i antagonističku aktivnost na *5-HT_{2A}* receptorima, a i sam serotonin ima modulatorni efekat na dopaminergičke puteve. Atipični antipsihotici, za razliku od drugih antipsihotika, u manjoj meri dovode do pojave ekstrapiramidalnog sindroma (npr. hlorpromazin, klozapin, risperidon, kvetiapin) [1]. Postoji mnogo teorija o tome koji je inicijalni događaj koji dovodi do nastanka migrene, a jedna od njih je abnormalno nervno pražnjenje, koje može biti inicirano emocionalnim ili biohemiskim poremećajem. Aktivacijom *5-HT_{2A}* receptora dolazi do oslobađanja azot-monoksida koji dovodi do dilatacije ekstracerebralnih krvnih sudova i senzitizacije senzornih nervnih završetaka. Kao posledica toga, oslobađaju se neuropeptidi koji dovode do neurogene inflamacije i pojave migrane. Dodatni dokaz ovoj teoriji jeste činjenica da u urinu ovih pacijenata postoji povećanje glavnih metabolita serotonina *5-HIAA* (5-hidroksi-3-indol sirćetna kiselina), dok koncentracija serotoninu u krvi opada, verovatno usled pražnjenja trombocita. Antagonisti *5-HT_{2A}* receptora (metizergid, ciproheptadin) se primenjuju u profilaksi migrane. Karcinoidni sindrom je retko oboljenje koje je udruženo sa malignim tumorom enterochromafinskih ćelija. Tumor luči različite hormone od kojih je serotonin najvažniji. Sindrom se dijagnostikuje merenjem ekskrecije *5-HIAA* u urinu, čija je vrednost čak 20 puta povećana. Antagonisti *5-HT_{2A}* receptora, kao što su

metizergid i ciproheptadin, efikasni su u kontroli nekih od simptoma karcinoidnog sindroma [1].

Pregledom literature nisu nađeni podaci o 3D-QSAR analizi i studiji farmakofore antagonista serotoninskih 5-HT_{2A} receptora koji uključuju set strukturno različitih antagonista 5-HT_{2A} receptora. Strukturna različitost i širok opseg aktivnosti ovih antagonista omogućava dobru primenjivost formiranog 3D-QSAR i farmakofornog modela. Glavni ciljevi izvedene 3D-QSAR i farmakoforne studije su bili da se identifikuju najznačajnije molekulske determinante koje utiču na antagonističku aktivnost na 5-HT_{2A} receptorima, razvoj predvidivog i robusnog 3D-QSAR modela, kao i predlaganje strukturalnih modifikacija za dalji dizajn novih antagonista serotoninskih 5-HT_{2A} receptora.

2. Materijal i metode

Serija od 50 jedinjenja, sa eksperimentalnom antagonističkom aktivnošću na serotoninske 5-HT_{2A} receptore, je preuzeta iz ChEMBL baze podataka (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), koja prikazuje podatke iz literature [2-4]. Početna serija ispitivanih jedinjenja je podeljena na test set sačinjen od 14 jedinjenja (Tabela I) i trening set koji se sastojao od 33 jedinjenja (Tabela II).

Tabela I- Prikaz test seta i njihovih aktivnosti

Table I – Activities and compounds from test set

Molekul	pIC _{50exp}	pIC _{50pred}
CHEMBL1222552	5,007	6,150
CHEMBL1222692	6,300	6,455
CHEMBL1222693	6,400	7,290
CHEMBL1222762	7,200	6,746
CHEMBL1276860	6,200	6,389
CHEMBL1277034	7,300	7,213
CHEMBL1277125	6,400	6,942
CHEMBL1277216	6,500	6,766
CHEMBL1277311	7,000	7,224
CHEMBL1277312	7,500	7,143
CHEMBL18972	8,611	8,512
CHEMBL1222625	6,700	7,759
CHEMBL1277678	7,300	6,746
CHEMBL1278020	6,400	6,418
$R^2_{PRED} = 0,51$		RMSEP = 0,558

Tabela II- Prikaz trening seta i njihovih aktivnosti;**Table II-** Activities and compounds from training set;

Molekul	pIC _{50exp}	pIC _{50pred}
CHEMBL1222553	6,500	6,575
CHEMBL1222554	7,100	7,308
CHEMBL1222624	7,400	7,313
CHEMBL1222694	6,900	6,946
CHEMBL1222695	7,300	7,479
CHEMBL1222764	6,600	6,755
CHEMBL1276859	5,914	6,240
CHEMBL1276947	7,500	7,725
CHEMBL1276948	7,800	7,965
CHEMBL1277035	7,300	7,121
CHEMBL1277584	7,200	7,065
CHEMBL1277585	6,200	6,320
CHEMBL1277679	7	6,851
CHEMBL1277769	6,417	6,199
CHEMBL1277770	7,100	7,136
CHEMBL1277854	7,100	7,200
CHEMBL1277854	7,100	7,200
CHEMBL1277935	6,900	6,998
CHEMBL1278019	7,100	7,064
CHEMBL1278021	5,400	5,771
CHEMBL1278112	7,00	7,071
CHEMBL1278114	6,800	6,828
CHEMBL1278115	5,700	5,526
CHEMBL1278116	7,900	7,944
CHEMBL1278201	7,700	7,455
CHEMBL1278202	7,900	7,391
CHEMBL1277217	6,400	6,422
CHEMBL1277126	7,600	6,906
CHEMBL1277401	6,400	6,418
CHEMBL1277491	6,900	6,854
CHEMBL42	8,040	8,185
CHEMBL6437	8,090	8,152
CHEMBL74355	10	9,962
CHEMBL560177	6,200	6,142
R ² = 0,96	<u>Q²</u> = 0,75	RMSEE = 0,211

Podjela jedinjenja u trening i test set izvršena je tako što su sva ispitivana jedinjenja prvo grupisana prema opadajućoj vrednosti aktivnosti, a potom je svako treće jedinjenje izabrano u test set, dok su preostala jedinjenja upotrebljena za formiranje trening seta. Tri jedinjenja čije su karakteristike značajno odstupale u odnosu na ostala ispitivana jedinjenja su isključena iz studije i nisu korišćena u daljoj analizi. Izbačena su jedinjenja CHEMBL1201756 i CHEMBL1222763, koja se na PCA (Principal Component Analysis) grafiku nalaze grupisani daleko od ostalih jedinjenja trening i test seta, kao i jedinjenje CHEMBL1278113 zbog svoje strukturne različitosti u odnosu na data set (jedina struktura sa karboksilatnim anjonom u meta položaju piperazina). Na ovaj način je postignuto da komponente i trening i test seta pokrivaju širok opseg aktivnosti.

Sva jedinjenja koja su korišćena u QSAR analizi su testirana istim eksperimentalnim metodama na 5-HT_{2A} receptorima, pri čemu je njihova aktivnost izražena kao IC₅₀ vrednost. Negativan logaritam IC₅₀ vrednosti (pIC₅₀) je korišćen kao zavisno promenljiva, Y-varijabla (Slika 2.). Širok opseg aktivnosti (pIC₅₀: 5,007-10,000) i strukturna različitost jedinjenja su osigurale dobar kvalitet i široku primenu domena formiranog 3D-QSAR modela.

Za sve ispitivane strukture definisani su dominantni oblici na fiziološkoj pH vrednosti 7,4 pomoću *Marvin Sketch 5.5.1.0* programa [5]. U sledećem koraku dominantni oblici su optimizovani pomoću semiempirijske PM3 (*Parameterized Model revision 3*) metode [6,7] upotrebom *Gaussian 98* softvera [8], u okviru *Chem3DUltra 7* programa [9]. 3D-QSAR model je formiran primenom *Pentacle* programa [10]. *Pentacle* vrši proračun GRID nezavisnih deskriptora (GRIND i GRIND2) iz oblasti molekulskih interakcija (MIFs). MIFs se računaju primenom 4 različite hemijske probe: *O probe* (simulira karbonilni kiseonik i predstavlja grupe koje su akceptor vodonične veze), *DRY probe* (simulira grupe koje ostvaruju hidrofobne interakcije sa ligandom), *N1 probe* (simulira amidni azot, predstavlja grupe donore vodonične veze), i *TIP probe* (simulira grupe koje ostvaruju sterne interakcije sa ligandom). GRID rezolucija je podešena na 0,5 Å. Za izolovanje najrelevantnijih regiona koji predstavljaju željene interakcije između probe i liganda primenjen je ALMOND algoritam pri čemu je broj filtriranih čvorova bio 100 sa 50% relativne težine. GRIND deskriptori su izračunati primenom CLACC algoritma [11] korišćenjem auto- i kros –korelacije između čvorova, sa opsegom ravnjanja od 0,8. Rezultati ove analize su prikazani kao korelogrami koji odgovaraju parovima čvorova iste ili različite probe (Tabela III).

Tabela III -Pozitivne i negativne varijable formiranog 3D-QSAR modela.**Table III** -Summary of most important favorable and unfavorable variables

Varijabla	Rastojanje	Koreogram	PLS koeficijent	Komentar
627	9.6A- 10A	N ₁ -TIP	-0,341	Akceptor vodonične veze i sterni centar;
300	12.8A– 13.2A	DRY-O	-0,488	Hidrofobni region i donor vodonične veze;
276	3.2A- 3.6A	DRY-O	0,321	Hidrofobni region i donor vodonične veze; hidrofobni region fluorobenzena i -NH grupa piperidina
370	14A- 14.4A	DRY-N ₁	-0,458	Hidrofobni region i akceptor vodonične veze; 1,2-dimetilkatehol i -NH grupa piperidina
495	10.4A- 10.8A	O-N ₁	0,563	Donor i akceptor vodonične veze; NH grupa piperidina i -OCH ₃ grupa 1,2-dimetilkatehola
248	18.8A- 19.2A	TIP-TIP	0,414	Dva sterna centra; između fluorobenzena i 1,2-dimetilkatehola
640	14.8A- 15.2A	N ₁ -TIP	0,665	Akceptor vodonične veze i sterni centar;
233	12.8A- 13.2A	TIP-TIP	0,385	Dva sterna centra; fluorobenzen i azota piperidina
243	16.8A- 17.2A	TIP-TIP	-0,259	Dva sterna centra;
147	5.2A- 5.6A	N ₁ -N ₁	-0,372	Dva akceptora vodonične veze;; dve – OCH ₃ grupe 1,2-dimetilkatehola

Izračunati GRIND deskriptori ispitivanih liganada su analizirani u odnosu na Y-varijablu (pIC_{50}) primenom *PLS regresionog (Partil Least Squares Regression)* metoda. PLS regresija je generalizacija linearne regresije koja koristi princip unakrsne validacije da proceni kapacitet predviđanja 3D-QSAR modela [12]. Inicijalna grupa GRIND deskriptora se redukuje primenom metode najmanjih kvadrata (*FFD*) *GOLPE (Generating Optimal Linear PLS Estimations)* [13] da bi obuhvatala samo najznačajnije varijable. Nakon što se primenom metode najmanjih kvadrata smanji inicijalni broj deskriptora, formira se novi 3D-QSAR model primenom PLS metode i računaju se njegovi statistički parametri. Na osnovu izračunatih statističkih parametara R^2 , Q^2 , $RMSEE$ (*Root Mean Square Error of Estimation*) za trening set, i $RMSEP$ (*Root Mean Square Error of Prediction*) i R^2_{pred} za test set, izabran je optimalni 3D-QSAR model sa 156 varijabli i pet PLS komponenti (latentne varijable, LV).

Za inicijalnu validaciju 3D-QSAR modela, izračunati su i primjenjeni parametri kao što su validacioni regresioni faktor unakrsne validacije (Q^2) i predviđena rezidualna suma kvadrata (PRESS). PRESS parametar se računa primenom pristupa izostaviti-jedan (*leave-one-out (LOO)*) tako što se svako jedinjenje ukloni jednom iz trening seta, što rezultuje formiranjem novog modela koji se koristi da predvidi Y-vrednost izostavljenog jedinjenja. [13]. Nakon što sva jedinjenja budu uklonjena jednom iz trening seta, kvadratni zbir razlika između posmatranih i LOO-predviđenih Y-vrednosti ($e_{(i)}$) (PRESS) računa se pomoću jednačine (1).

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (1)$$

Moć predviđanja i robusnost 3D-QSAR modela je procenjena na osnovu RMSEE i Q^2 parametara prikazanih jednačinama (2) i (3).

$$RMSEE = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (2)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SSTo} \quad (3)$$

gde je SSTo -Varijacija, ukupni zbir kvadrata.

Za dobar 3D-QSAR model vrednost Q^2 parametra treba da bude veća od 0,5 [15]. Visoke vrednosti R^2 i Q^2 parametara su neophodne, ali finalna procena pouzdanosti predviđanja formiranog 3D-QSAR modela se bazira na eksternoj validaciji, evaluacijom aktivnosti jedinjenja test seta [16].

Test set koji se sastojao od 14 molekula je korišćen za eksternu validaciju i izračunavanje korena srednje kvadratne greške predviđanja (RMSEP) (jednačina (4)) i koeficijenta korelacije za test set (R^2_{pred}) (jednačina (5)).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (4)$$

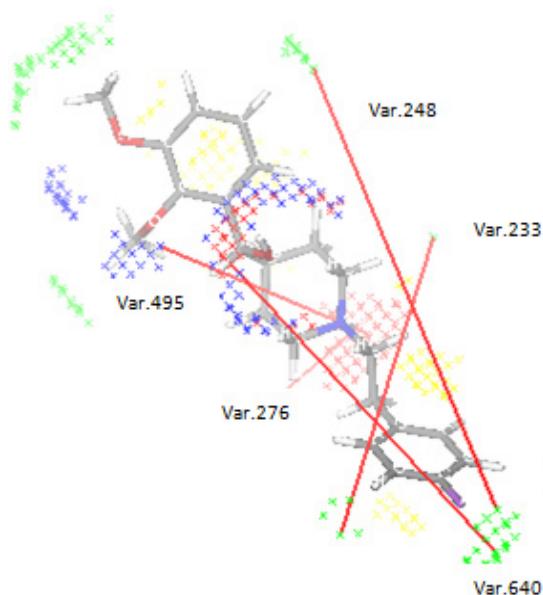
$$R^2_{pred} = 1 - \frac{\Sigma(Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{pred(test)})^2}{\Sigma(Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (5)$$

Pouzdani 3D-QSAR modeli imaju vrednost R^2_{pred} za test set veću od 0,5 [13].

3. Rezultati i diskusija

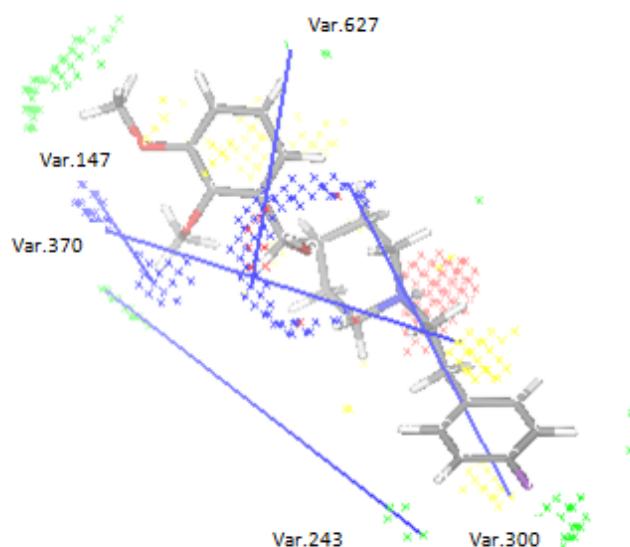
Izračunati validacioni i statistički parametri za trening i test set (Tabele I i II) su u granicama prihvatljivosti, što ukazuje na pouzdanost i dobru moć predviđanja izabranog *3D-QSAR* modela. Relativno niža vrednost R^2_{pred} , kao i razlika koja postoji između *RMSEE* i *RMSEP* vrednosti, ukazuju na mogućnost značajnije greške predviđanja aktivnosti za jedinjenja koja su strukturno različita od jedinjenja trening seta. Najaktivniji molekuli u trening setu su CHEMBL74355, CHEMBL42 i CHEMBL6437, dok su jedinjenja CHEMBL1278021, CHEMBL1278115 i CHEMBL560177 ispoljila najslabiju antagonističku aktivnost na 5-HT_{2A} receptorima.

Molekul CHEMBL74355 sa najvećom aktivnošću ($pIC_{50exp}=10,000$; $pIC_{50pred}=9,962$) karakteriše prisustvo svih pet pozitivnih varijabli (Slika 1.): Var.233 (TIP-TIP) - na rastojanju od 12,8Å-13,2Å se nalaze dva sterna centra (fluorobenzen i azot piperidina), Var.248 (TIP-TIP) - na rastojanju od 18,8Å-19,2Å se nalaze dva sterna centra (fluorobenzen i 1,2-dimetilkatehol), Var.276 (DRY-O) - na rastojanju od 3,2Å-3,6Å se nalaze hidrofobni centar i donor vodonične veze (hidrofobni region fluorobenzena i -NH grupa piperidina), Var.495 (O-N1) - na rastojanju od 10,4Å-10,8Å se nalaze donor i akceptor vodonične veze(-NH grupa piperidina i -OCH₃ grupa 1,2-dimetilkatehola), Var.640 (N1-TIP) - na rastojanju od 14,8Å-15,2Å se nalaze karbonilni kiseonik i sterni centar (fluorobenzen).



Slika 1. Pozitivne varijable molekula CHEMBL74355;
Figure 1. Positive variables of compound CHEMBL 74355;

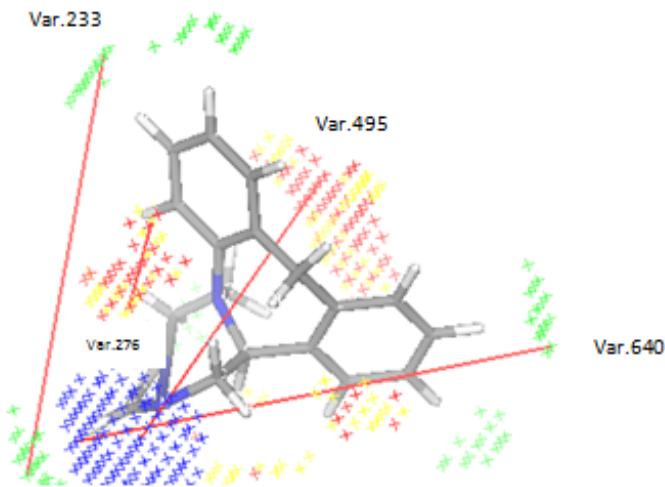
Na molekulu CHEMBL74355 se takođe nalaze i najvažnije negativne varijable za antagonističko dejstvo (Slika 2.): Var.147 (N1-N1) - na rastojanju od 5,2A-5,6A se nalaze dva akceptora vodonične veze (dve $-OCH_3$ grupe 1,2-dimetilkatehola), Var.243 (TIP-TIP) - na rastojanju od 16,8A-17,2A se nalaze dva sterna centra, Var.300 (DRY-O) - na rastojanju od 12,8A-13,2A se nalaze hidrofobni centar i donor vodonične veze, Var.370 (DRY-N1) - na rastojanju od 14,0A-14,4A se nalaze hidrofobni centar i akceptor vodonične veze, Var.627 (N1-TIP) - na rastojanju od 9,6A-10,0A se nalaze karbonilni kiseonik i sterni centar (1,2-dimetilkatehol).



Slika 2. Negativne varijable molekula CHEMBL74355;

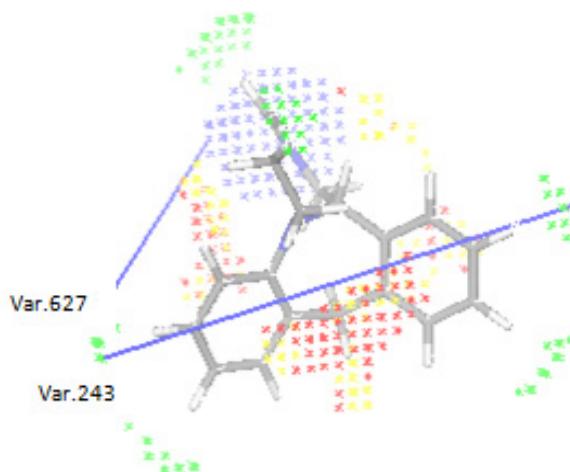
Figure 2. Negative variables of compound CHEMBL74355;

Molekul CHEMBL6437 ($pIC_{50}^{exp}=8,090; pIC_{50}^{pred}=8,152$), je drugi po aktivnosti posle molekula CHEMBL74355. Od pozitivnih varijabli poseduje (Slika 3.): Var.233 (TIP-TIP) - na rastojanju od 12,8A-13,2A se nalaze dva sterna centra (piperazin i benzenov prsten), Var.276 (DRY-O) - na rastojanju od 3,2A-3,6A se nalaze hidrofobni centar i donor vodonične veze (benzen i $-NH$ grupa piperazina), Var.495 (O-N1) - na rastojanju od 10,4A-10,8A se nalaze donor i acceptor vodonične veze, Var.640 (N1-TIP) - na rastojanju od 14,8A-15,2A se nalaze akceptor vodonične veze i hidrofobni centar.



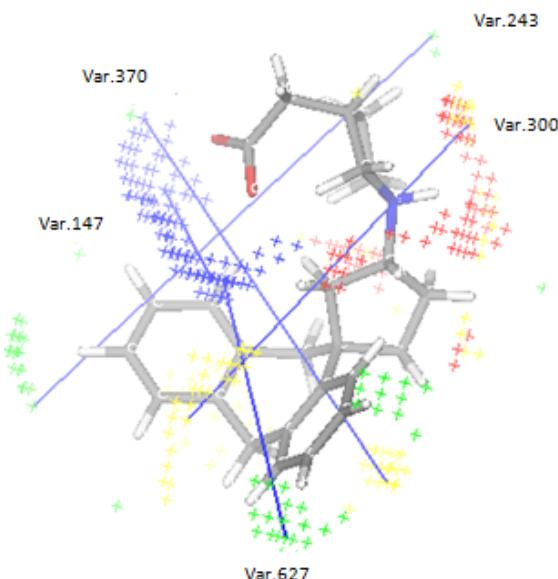
Slika 3. Pozitivne varijable molekula CHEMBL6437;
Figure 3. Positive variables of compound CHEMBL6437;

Od negativnih varijabli molekul CHEMBL6437 ($\text{pIC}_{50}^{\text{exp}}=8,090$; $\text{pIC}_{50}^{\text{pred}}=8,152$) poseduje (Slika 4.): Var.243 (TIP-TIP) - na rastojanju od 16,8A-17,2A se nalaze dva sterna centra (dva benzenova prstena) i Var.627 (N1-TIP) - na rastojanju od 9,6A-10,0A se nalaze akceptor vodonične veze i sterni centar.



Slika 4. Negativne varijable molekula CHEMBL6437;
Figure 4. Negative variables of compound CHEMBL6437;

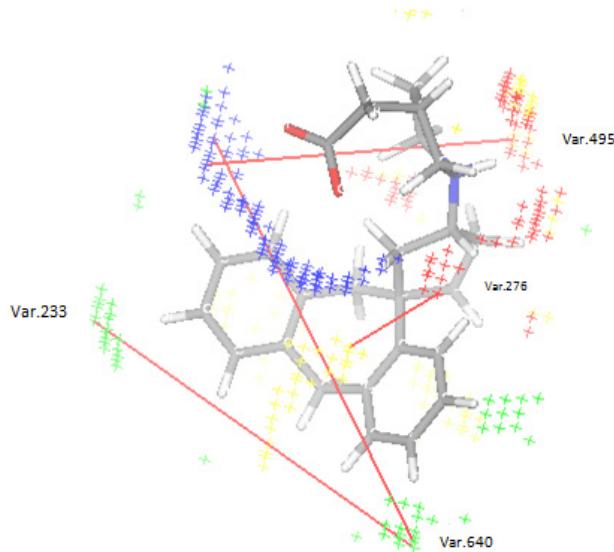
Molekul CHEMBL1276859 ($\text{pIC}_{50\text{exp}} = 5.914$; $\text{pIC}_{50\text{pred}} = 6.240$), spada u molekule sa najmanjom aktivnošću. Od negativnih varijabli poseduje (Slika 5.): Var.147 (N1-N1) - na rastojanju od 5,2A-5,6A se nalaze dva akceptora vodonične veze, Var.243 (TIP-TIP) - na rastojanju od 16,8A-17,2A se nalaze dva sterna centra (benzenov prsten i pirolidin), Var.300 (DRY-O) - na rastojanju od 12,8A-13,2A se nalaze hidrofobni centar i donor vodonične veze, Var.370 (DRY-N₁) - na rastojanju od 14,0A-14,4A se nalaze hidrofobni centar i akceptor vodonične veze, Var.627 (N1-TIP) na rastojanju od 9,6A-10,0A se nalaze akceptor vodonične veze i sterni centar.



Slika 5. Negativne varijable molekula CHEMBL1276859;

Figure 5. Negative variables of compound CHEMBL1276859;

Od pozitivnih varijabli prisutne su (Slika 6.): Var.233 (TIP-TIP) - na rastojanju od 12,8A-13,2A se nalaze dva sterna centra (dva benzenova prstena), Var.276 (DRY-O) - na rastojanju od 3,2A-3,6A se nalaze hidrofobni centar i donor vodonične veze, Var.495 (O-N₁) na rastojanju od 10,4A-10,8A se nalaze donor i akceptor vodonične veze, Var.640 (N1-TIP) - na rastojanju od 14,8A-15,2A se nalaze akceptor vodonične veze i hidrofobni centar.



Slika 6. Pozitivne varijable molekula CHEMBL1276859.

Figure 6. Positive variables of compound CHEMBL1276859.

Kod sva tri opisana molekula (molekul 74355 ($\text{pIC}_{50\text{exp}}=10,000$; $\text{pIC}_{50\text{pred}}=9,962$); molekul 6437 ($\text{pIC}_{50\text{exp}}=8,090$; $\text{pIC}_{50\text{pred}}=8,152$); molekul 1276859 ($\text{pIC}_{50\text{exp}}= 5.914$; $\text{pIC}_{50\text{pred}}=6,240$)), prisutne su pozitivne varijable (Var.233, Var.276, Var.495, Var.640), a samo kod molekula 74355 je prisutna i pozitivna varijabla Var.248. Od negativnih varijabli zajedničke su Var.243 i Var.627, dok su sve ostale negativne varijable prisutne kod molekula 74355 i 1276859.

Kako je jedino u najaktivnijem molekulu (CHEMBL74355) prisutna Var.248 TIP-TIP koja se formira između dva sterna centra (fluorobenzen i 1,2-dimetilkatehol) na rastojanju od 18,8Å-19,2Å, prepostavlja se da će uvođenjem fluora i/ili metoksi grupe, na položaj 5,6, 13 i /ili 14 diazatriciklo[9.4.0.0^{3 ·8}]pentadeka-1(11),3,5,7,9,12,14-heptena, kao i dugolančanih etarskih grupa u para,meta i/ili orto položaj benzenovih prstena vezanih za piperidin, dovesti do snažnije antagonističke aktivnosti na 5-HT_{2A} serotoninskim receptorima. Takođe se prisustvo varijable Var.276 (DRY-O) – koja predstavlja postojanje hidrofobnog centra i donora vodonične veze na rastojanju od 3,2Å-3,6Å (hidrofobni region fluorobenza i –NH grupa piperidina), kao i varijable Var.495 (O-N₁) – prisustvo donora i akceptora vodonične veze na rastojanju od 10,4Å-10,8Å (-NH grupa piperidina i –OCH₃ grupa 1,2-dimetilkatehola), izdvojilo kao bitno za antagonističku aktivnost na serotoninskim 5-HT_{2A} receptorima.

4. Zaključak

Istraživanje sprovedeno na seriji od 50 jedinjenja omogućilo je formiranje 3D-QSAR modela koji je pouzdan i ima dobru moć predviđanja. U prilog tome govore dobijeni validacioni i statistički parametri. Set molekula je podeljen na test i trening set i njihovom analizom formiran je 3D-QSAR model. Na osnovu tog modela kao zaključak se izvodi da je za antagonističku aktivnost na serotonininskim 5-HT_{2A} receptorima najvažnije prisustvo dva sterna centra na odgovarajućem rastojanju. Takođe, bitno je da se na odgovarajućem rastojanju nalaze i hidrofobni centar i donor vodonične veze, kao i prisustvo donora i akceptora vodonične veze. Definisanje ovih pozitivnih varijabli, može se koristiti pri dizajniranju novih antagonista. Pretpostavlja se da će uvođenje ovih funkcionalnih grupa na odgovarajuće položaje dovesti do povećanja antagonističke aktivnosti na 5-HT_{2A} receptorima. Značaj opisane studije se ogleda u tome što je definisana smernica za dizajniranje novih selektivnijih i aktivnijih antagonista 5-HT_{2A} receptora što je od velike važnosti kada se uzme u obzir njihov terapijski potencijal.

Zahvalnica

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

Literatura:

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology*. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; c2003. 184-93p. 525-49 p.
2. Gianotti M, Corti C, Fratte S, Di Fabio R, Leslie C, Wigglesworth M, et al. Novel imidazobenzazepine derivatives as dual H1/5-HT 2A antagonists for the treatment of sleep disorders. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20: 5069-73.
3. Jensen A, Plath N, Pedersen M, Isberg V, Krall J, Frølund B, et al. Design, synthesis, and pharmacological characterization of N- and O-substituted 5,6,7,8-tetrahydro-4H-isoxazolo[4,5-d]diazepin-3-ol analogues: novel 5-HT(2A)/5-HT(2C) receptor agonists with pro-cognitive properties. *J. Med. Chem.* 2013; 56: 1211-27.

4. Holmes I, Micheli F, Gaines S, Lorthioir O, Watson S, Worby A, et al. Dopamine D3 receptor antagonists: The quest for a potentially selective PET ligand. Part one: Lead identification. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009; 19: 4799-801.
5. www.chemaxon.com/products.html
6. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J. Comp. Chem.* 1989a; 10: 209-20.
7. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J. Comp. Chem.* 1989b; 10: 221-64.
8. Gaussian 98 (RevisionA.7) Frisch MJ et al. Gaussian, Inc, Pittsburgh PA, 1998.
9. Chem3D Ultra7.0,Cambridge Soft Corporation, 100 Cambridge Park Dr, Cambridge, USA, 2001.<http://www.cambridgesoft.com/>
10. Pentacle, Version 1.0.7, Molecular Discovery Ltd., Perugia, Italy; 2009.<http://www.moldiscovery.com/software/pentacle/>
11. Duran A, Pastor M. An advanced tool for computing and handling grid-independent descriptors. User Manual Version 1.06; 2011.
12. Wold S, Eriksson L, Trygg J, Kettaneh N. The PLS method-partial least squares projections to latent structures-and its applications in industrial R&D (research, development, and production). Tech rep, Umea University; 2004.
13. Baroni M, Costantino G, Cruciani G, Riganelli D, Valigi R, Clementi S. Generating optimal linear PLS estimations (GOLPE): an advanced chemometric tool for handling 3D-QSAR problems. *QSAR Comb Sci* 1993; 12: 9-20.
14. Ojha PK, Roy K. Comparative QSARs for antimalarial endochins: importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection. *Chemom. Intell. Lab.* 2011; 109: 146–61
15. Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation and exploration. *Mol. Inf.* 2010; 29: 476–88.
16. Golbraikh A, Tropsha A. Beware of q2! *J. Mol. Graph. Model.* 2002; 20: 269–76.

3D-QSAR modeling and pharmacophore study of serotonin 5HT_{2A} receptors antagonists

**Mirjana Antonijević, Katarina Nikolić*, Jelica Vučićević,
Slavica Olijačić, and Danica Agbaba**

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

* Corresponding author: Katarina Nikolic, PhD

Tel: +381-11-3951-259, Mob: +381-63-84-30-677, Fax: +381-11-3974-349

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

Summary

Creation of a statistically reliable 3D-QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) model enables definition of the structure of the pharmacophore for antagonists of serotonin 5-HT_{2A} receptors and selection of the key molecular determinants for the design of new antagonists. A 3D-QSAR study was applied on a series of 50 antagonists of 5-HT_{2A} receptors. The data set is divided into the training set, composed of 33 compounds, and test set containing 14 molecules. The training set was used to build the 3D-QSAR model, while test set was used for model validation. This 3D-QSAR study was performed by use of the Pentacle 1.07 programs. Obtained statistical and validation parameters for training set ($R^2= 0.96$; $Q^2= 0.75$, $RMSEE= 0.211$); and for test set ($R^2_{pred}= 0.51$; $RMSEP= 0.558$); indicate on reliability and good predictive potential of the 3D-QSAR model. Based on the most influential variables of the selected 3D-QSAR model, the molecular determinants for the antagonistic effect on the 5-HT_{2A} receptors were selected: hydrogen bond acceptor and hydrogen bond donor at a distance of 10.4Å-10.8Å (v495: O-N₁); carbonyl oxygen and a steric hot spot at a distance of 14.8Å-15.2Å (v640: N₁-TIP); hydrophobic domain and hydrogen bond acceptor at a distance of 3.2Å-3.6Å (v276: DRY-O); two steric hot spots at a distance of 18.8Å-19.2Å (v248: TIP-TIP).

Keywords: 3D-QSAR, antagonist, 5-HT_{2A} receptors, pharmacophore

Vitamini u kozmetičkim proizvodima - savremeni stavovi i praksa

Dragana Vasiljević^{1*}, Nataša Radonjić², Gordana Vučeta¹

¹Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

²Apoteka Cosmetics Pharmacy 1, MPM doo, Ulica Bratstva i jedinstva bb, 81000 Podgorica, Crna Gora

*Autor za korespondenciju: Dragana Vasiljević, vasilj@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

U savremenim kozmetičkim proizvodima najviše se koriste vitamini A, E, C, B3 i provitamin B5 (pantenol), kao i njihovi brojni derivati.

Kozmetički retinoidi (retinol, retinaldehid i retinil estri) se godinama koriste u kozmetičkom tretmanu znakova (foto)ostarele kože jer posvetljuju hiperpigmentacije, smanjuju grubost kože i fine linije i bore. Noviji derivati vitamina A, retinil retinoat i hidroksipinakolon retinoat su *anti-age* sastojci povećane stabilnosti i smanjenog iritacionog potencijala, u poređenju sa retinolom.

Vitamin E (tokoferol), dovodi do usporavanja nastanka i prividnog smanjenja postojećih bora. Zbog izražene nestabilnosti, vitamin E se koristi u obliku estara, najčešće kao tokoferil acetat. Novina na tržištu je hidrosolubilni derivat vitamina E - natrijum tokoferil fosfat.

Vitamin C (askorbinska kiselina) takođe ima pozitivne efekte na koži, ali je veoma nestabilan. Noviji derivati vitamina C, koji mogu biti hidrosolubilni, amfifilni ili liposolubilni su poboljšane stabilnosti u odnosu na askorbinsku kiselinu. Koriste se u proizvodima za negu i posvetljivanje kože.

Pantenol je izuzetno dobar ovlaživač kože i kose. Vitamin B3 (niacinamid) se uobičajeno koristi u dnevnim kremovima za negu lica, kao kondicioner kože.

Vitamini u kozmetičkim proizvodima se mogu smatrati bezbednim KAS, kada se koriste u odgovarajućim hemijskim oblicima i u odobrenim koncentracijama.

Ključne reči: vitamini i derivati, kozmetički efekti na koži, bezbednost kozmetičkih proizvoda sa vitaminima

Uvod

I pored brojnih novih kozmetički aktivnih supstanci (KAS), koje se nalaze na tržištu, ili su u različitim fazama ispitivanja, vitamini dugi niz godina zauzimaju mesto omiljenih sastojaka u kozmetičkim proizvodima. Mnoge kozmetičke linije za negu kože sadrže upravo vitamine kao aktivne supstance. Korisnici/potrošači veruju da su kozmetički proizvodi sa vitaminima efikasni i bezbedni, a kozmetičke kompanije pokušavaju da ih učine stabilnijim i lakše dostupnim ćelijama kože.

Vitamini mogu da ostvaruju različite povoljne kozmetičke efekte na koži, kao što su poboljšanje izgleda, posvetljivanje hiperpigmentacija, antioksidativno delovanje (neutrališu slobodne radikale na koži), vlaže i omekšavaju kožu, a utiču i na strukturiranje dlake kose. Prema EU Uredbi 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima (1) zabranjena je upotreba tretinoina (retinolna kiselina) i njegovih soli u kozmetičkim proizvodima, kao i vitamina D₂ (ergokalciferol) i D₃ (holekalciferol). Shodno navedenom, neopravdano je i pogrešno dodavanje komercijalnih oralnih uljanih kapi vitamina AD u „vitaminske“ kremove, što je bila praksa u nekim apotekama.

Interes za vitamine A, E i C u kozmetičkim proizvodima traje decenijama, ali je znatno pojačan s obzirom na njihovu ulogu u zaštiti kože od štetnog UV zračenja i kao *anti-age* supstance. Osim njih, danas se kao kozmetički aktivne supstance koriste i određeni vitamini B grupe, najviše pantenol i niacinamid.

Pri proizvodnji kozmetičkih proizvoda sa vitaminima postoji problem u stabilizaciji nestabilnih oblika vitamina, kao što su vitamin A, E i C. Rešenje se može postići pravilnim izborom ostalih sastojaka proizvoda, odnosno odgovarajućih stabilizatora, primenom nosača KAS, posebnim tehnikama izrade proizvoda i upotrebom odgovarajuće ambalaže za kozmetički proizvod.

Poznato je da marketing kozmetičkih proizvoda, koji sadrže jedan ili više vitamina, reklamira njihove kozmetičke efekte, koristeći reč „vitamin“, odnosno ističući da ti proizvodi deluju na koži zahvaljujući prisustvu određenog/ih vitamina, ali u obeležavanju liste sastojaka (INCI liste) moraju navoditi njihova INCI imena, u kojima se ne nalazi reč „vitamin“. Ovakav način obeležavanja (navođenjem INCI) vitamina je potpuno ispravan, jer se dejstva vitamina u organizmu čoveka ostvaruju samo ako se unose kroz usta, u obliku hrane, lekova ili dijetetskih proizvoda.

Kozmetički retinoidi

Retinoidi su klasa supstanci, koje obuhvataju alkoholni oblik vitamina A (retinol) i njegove prirodne i sintetske derivate. Retinol (INCI: Retinol), retinaldehid (INCI: Retinaldehyde) i retinil estri (INCI: Retinyl Acetate, Retinyl Propionate, Retinyl Palmitate) su tzv. kozmetički retinoidi i popularni su kao kozmetički aktivne supstance u savremenim kozmetičkim proizvodima, najviše sa *anti-age* delovanjem.

Sa druge strane, oblici vitamina A, kao što su tretinojn, izotretinojn, tazaroten i adapalen su lekovi i u zemljama Evropske unije je zabranjena njihova upotreba u kozmetičkim proizvodima (aneks/lista II EU Kozmetičke uredbe 1223/2009) (1).

Retinolna kiselina (*all-trans* retinolna kiselina, tretinojn) je aktivni oblik vitamina A i vezuje se za specifične ćelijske (citoplazmatske) i jedarne receptore. Da bi retinoidi delovali, svi se moraju konvertovati u *all-trans* retinolnu kiselinu, koja će se vezati za odgovarajući receptor (2).

Retinol normalizuje životni ciklus keratinocita, utičući na njihov razvoj i diferencijaciju. Stimuliše stvaranje kolagena, elastina i glikozaminglikana. Delujući na ovaj način, poboljšava fine linije i bore, posvetljuje hiperpigmentacije, smanjuje grubost kože (3-6).

Retinol je žućkasta, uljasta tečnost, osetljiva na kiseonik, topotu, svetlost i prisustvo teških metala. Rastvorljiv je u polisorbatu 20, a meša se sa mastima i uljima. Preporučuje se da se proizvodnja i pakovanje proizvoda sa retinolom izvodi pod atmosferom inertnog gasa, na temperaturi do 40 °C (7).

Retinaldehid je najblaži retinoid i preporučuje se osobama sa osetljivom kožom, a ne izaziva fototoksičnost i iritaciju kože. Preporučuje se upotreba retinaldehida u koncentraciji od 0,015-0,1 % (8).

Retinol i njegovi estri su verovatno najviše korišćeni vitamini u kozmetičkim proizvodima. Mogu se dodati brojnim kozmetičkim proizvodima za kožu (kremovi, losioni, maske, serumi), ali u odobrenim koncentracijama (0,05-0,3 %), da bi primenjeni kozmetički proizvod bio bezbedan (9). Najčešći zajednički neželjeni efekat retinoida je retinoidni dermatitis („retinoidna reakcija“), koju karakterišu svrab, peckanje na mestu primene, eritem, kao i deskvamacija ćelija kože. Uglavnom se može javiti tokom prvih dana primene kozmetičkog proizvoda sa retinoidima. Takođe, retinoidi povećavaju osetljivost kože prema UV zračenju, tako da i fotosenzitivnost nije redak neželjeni efekat tokom primene retinoida. To se odnosi i na korišćenje solarijuma. Upotreba retinoida u dnevnoj nezi kože zahteva obavezno nanošenje proizvoda za zaštitu kože od sunca sa SPF 15 (najmanje) i što je moguće manje izlaganje direktnoj sunčevoj svetlosti. Estri retinola se bolje podnose nego retinol, dok retinaldehid ima sličan potencijal iritacije kao retinol (10, 11).

Beta-karoten (INCI: Beta-Carotene) je poznat kao provitamin A i koristi se kao sastojak *anti-age* proizvoda.

Noviji kozmetički retinoidi

Jedan od novijih derivata vitamina A je retinil retinoat. To je ester retinolne kiseline i retinola, koji pokazuje povećanu stabilnost na temperaturu, smanjenu fotoosetljivost i smanjenu toksičnost za ćelije (12, 13). Rezultati *in vivo* ispitivanja, u

kojem je učestvovalo 11 ispitanica starosti od 35 do 56 godina, pokazali su da krem sa 0,06 % retinil retinoata statistički značajno poboljšava stanje kože sa finim borama, u poređenju sa kremom sa 0,075% retinola. Efekti su mereni nakon 12 nedelja korišćenja ispitivanih proizvoda, dva puta dnevno (12, 13).

Još jedan od novijih estara retinolne kiseline je hidroksipinakolon retinoat. Na tržištu se nalazi pod imenom *Granactive Retinoid* (INCI: Dimethyl Isosorbide (and) Hydroxypinacolone Retinoate); Grant Industries, SAD. Prema navodima proizvođača, ovaj sastojak ima efikasnost retinola i njegovih derivata, ali značajno manji potencijal iritacije. Preporučena koncentracija za upotrebu je 1-2%. U *Granactive Retinoid*-u dimetil izosorbid je rastvarač za hidroksipinakolon retinoat. Ovaj sastojak, bezbedan za upotrebu na koži i oko očiju, ubrzava penetraciju retinoida u epidermis (14).

Nosači kozmetičkih retinoida

U cilju povećanja stabilnosti retinoida često se vrši inkapsulacija ovih KAS u različite nosače, kao što su npr. liposomi, nanotopi, mikrokapsule, porozne mikročestice i dr. Inkapsulacijom retinoida se, osim povećane stabilnosti, može postići i poboljšana penetracija u kožu i smanjenje iritacije (4, 15, 16).

Noviji način za poboljšanje stabilnosti retinola, a time i za poboljšanje njegove efikasnosti jeste izrada mikrokapsula sa retinolom. Tehniku mikroinkapsulacije je patentirala kompanija Tagra Biotechnologies (Izrael), a proizvod se može naći na tržištu pod zaštićenim imenom TagravitTM R1. TagravitTM R1 je dizajniran tako da oslobodi retinol iz mikrokapsula nakon mehaničkog pritiska. U toku primene, utrljavanjem kozmetičkog proizvoda sa TagravitTM R1 mikrokapsulama u kožu, polimerni omotač mikrokapsule puca, pri čemu se oslobađa inkapsulirani retinol. Mikrokapsule sadrže 7% retinola, sfernog su oblika i prosečne veličine oko 35µm. Na tržištu se nalaze u obliku praška (4). Stabilnost mikrokapsuliranog retinola je poređena sa čistim retinolom, pri čemu su oba inkorporirana u gel, pH 7,3. Rezultati ispitivanja su pokazali da je sadržaj retinola u mikrokapsulama nakon 550 dana čuvanja uzorka na 25 °C bio 49% od početnog sadržaja, za razliku od čistog retinola, koga u gelu više nije bilo (4).

Procena efikasnosti TagravitTM R1 mikrokapsula sa retinolom vršena je tehnikom Fast Optical *in vivo* Topometry of Human Skin (FOITS). Praćeni su parametri Rz - prosečna dubina neravnina (*engl.* average depth of roughness) i Ra - aritmetička sredina hrapavosti (*engl.* arithmetic mean roughness). 28 ispitanica je nanosilo krem sa retinolom, a 25 krem koji sadrži mikrokapsule sa retinolom, dva puta dnevno, 4 nedelje. Kontrolnu grupu je činilo 28 ispitanica, koje nisu nanosile nijedan krem. Ispitivan je periorbitalni region. Rezultati ispitivanja su pokazali da je smanjenje parametara Rz i Ra za po 3% nakon nanošenja krema sa retinolom, odnosno za po 9% nakon primene krema koji sadrži TagravitTM R1 mikrokapsule sa retinolom. Ovi rezultati su jasno

pokazali da je procesom mikroinkapsulacije očuvana aktivnost retinola, kao sastojka koji deluje na smajenje bora (4).

Još jedna novija KAS na tržištu, sa inkapsuliranim retinolom je InuMax Advanced Retinol (Air Products, sada Evonik, Nemačka), proizvedena InuMax tehnologijom, koja je pod patentnom zaštitom (17). Sadrži visok procenat inkapsuliranog retinola od 8%, a ispitivanjima je dokazano da retinol inkapsuliran u InuMax Advanced Retinol ima znatno bolju stabilnost i dermalnu raspoloživost, kao i znatno manji irritacioni potencijal, u poređenju sa retinolom koji nije inkapsuliran (17).

Jedan od savremenih pristupa za zaštitu nestabilnih retinoida, kao i njihovo kontrolisano oslobođanje je građenje kompleksa. Novo jedinjenje, Retinaldehid γ -Cyclodextrin Complex (RCC) je razvijeno kako bi bila omogućena šira primena retinaldehida. RCC kompleks je dobijen u reakciji retinaldehida i γ -ciklodekstrina. Ovaj kompleks omogućava postepeno i kontrolisano oslobođanje retinaldehida (18).

Tokoferol

Vitamin E (INCI: Tocopherol) je zajedničko ime za 4 tokoferola (α , β , γ , δ). Prirodni oblik vitamina E je označen kao „d“ vitamin E, dok su sintetski oblici smeša 8 izomernih oblika i označeni su sa „dl“. Sintetski vitamin E, dl α -tokoferol ima dvostruko nižu biološku aktivnost od prirodnog vitamina E (19).

Najvažnije uloge vitamina E su zaštita kože od štetnog delovanja UV zraka, vlaženje kože, usporavanje/odlaganje znakova starenja kože (nastajanje bora, linija) i uticaj na mikrocirkulaciju u koži. Vitamin E (u obliku estara) je čest sastojak proizvoda koji treba da uspore nastajanje sitnih i dubljih bora, ali isključivo posle duže primene ovih proizvoda. Usporavanje pojave sitnih bora se može objasniti sposobnošću vitamina E da vlaži kožu, čime se povećava fleksibilnost ćelijskih zidova. Kako vitamin E „hvata“ (hemski neutrališe) slobodne radikale i sprečava lipidnu peroksidaciju kolagenih vlakana, smanjuju se degenerativne promene u dermisu, odnosno usporava se pojava dubljih bora (19). Takođe, alkoholni oblik vitamina E ima i ulogu antioksidansa u kozmetičkim proizvodima, u kojima sprečava oksidaciju liposolubilnih sastojaka, mada je njegova antioksidantna sposobnost slabija od sintetskih antioksidanasa, kao što su BHT i BHA.

Alkoholni oblik vitamina E (d ili dl α -tokoferol) je podložan oksidaciji, te su se u kozmetičkim proizvodima, zbog veće stabilnosti koristili estri tokoferola: linoleat, acetat i sukcinat. α -tokoferil acetat je najstabilniji estar vitamina E. Dobre je podnošljivosti (ne izaziva alergiju i senzibilizaciju kože), niske cene, pa se najviše koristi u proizvodima za negu kože.

Tokoferil acetat je veoma čest sastojak u proizvodima za negu kože, za zaštitu od sunca, za negu kože posle sunčanja, uobičajeno u koncentracijama 0,5% -5% (20).

Vitamin E je nerastvorljiv u vodi i nestabilan u prisustvu toploće i kiseonika, tako da su to dodatne poteškoće koje otežavaju izradu kozmetičkih proizvoda i onemogućavaju njegovo dejstvo na koži. U proizvodnji kozmetičkih proizvoda, α -tokoferol treba dodavati na temperaturi ispod 40 °C, pošto na višim temperaturama može da promeni boju.

Noviji derivati tokoferola

Natrijum tokoferil fosfat (INCI: Sodium Tocopheryl Phosphate) proizvodi japsanska kompanija Showa Denko, pod trgovackim imenom TPNaTM. To je hidrosolubilni estar vitamina E, u obliku praška. Alkoholna grupa tokoferola, osetljiva na kiseonik, hemijski je modifikovana i zaštićena. TPNa se konvertuje u koži pod dejstvom fosfataze u aktivan oblik - tokoferol. Proizvođač navodi da ova aktivna supstanca povećava sintezu ceramida u koži, što dalje povećava efekat vlaženja kože; zatim ima sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala, daje koži svež i mladalački izgled. Proizvođač takođe navodi da TPNa utiče i na enzime, koji učestvuju u metabolisanju i eliminaciji pigmenata, koji izazivaju tamne kolutove oko očiju. U kliničkom ispitivanju od 4 nedelje, primena TPNa je dovela do poboljšanja blistavosti trena (21).

Tokoferil dimetilglicinat (INCI: Tocopheryl Dimethyl Glycinate) (TDMG) je noviji hidrosolubilan derivat tokoferola sa dimetilglicin estrom. Primena 0,5% γ -TDMG na kožu smeđih zamoraca pre i nakon izlaganja UVB i UVA zračenju dovodi do znatnog posvetljivanja kože i do inhibicije sinteze melanina. Ovi rezultati navode da bi primena γ -TDMG mogla da bude efikasna u sprečavanju pigmentacije humane kože uzrokovane sunčanjem (22).

Nosači tokoferola i derivata

Slično kao i u slučaju vitamina A, i vitamin E se inkapsulira u različite nosače (liposomi, etosomi, nanotopi, mikro- i nanoemulzije, čvrste lipidne nanočestice, mili- i nanokapsule i dr.), sa ciljem postizanja optimalne stabilnosti i prihvatljivog roka upotrebe kozmetičkih proizvoda, kao i radi kontrolisane isporuke ovog vitamina.

Ispitivanja su pokazala da etosomi mogu biti pogodniji nosači α -tokoferola, u poređenju sa liposomima (23). Zahvaljujući svojoj strukturi, etosomi mogu da inkapsuliraju i transportuju u dublje slojeve kože visoko lipofilne molekule, kao što je α -tokoferol. U kliničkim studijama na dobrovoljcima je pokazano da su etosomi bezbedni za kožu i da ne izazivaju eritem, a da transportuju tokoferol u ćelije kože i postepeno ga oslobođaju. α -tokoferol će upravo u ćeliji imati najbolje dejstvo „hvatača“ slobodnih radikala (23).

Španska kompanija Lipotec proizvodi milikapsule sa tokoferil acetatom. Milikapsule, pod trgovackim nazivom A2 MillicapsulesTM (INCI: Aqua, PEG-4,

Glycerin, Agar, Alginic Acid, Polysorbate 20) predstavljaju nosače za isporuku lipofilnih aktivnih komponenti. Kapsule su milimetarskih veličina, izrađene od 2 prirodna polimera, izolovana iz algi – agar i alginska kiselina (otuda A2 u nazivu). Na tržištu se nalaze u više veličina i boja, koji vizuelno daju zanimljiv izgled kozmetičkom proizvodu. U isto vreme, ovakav sistem štiti lipofilne aktivne supstance od nepovoljnih spoljašnjih uticaja i ubrzava njihovu penetraciju u kožu. Milikapsule su disperzibilne u tradicionalnim kozmetičkim proizvodima. Kompanija Lipotec proizvodi milikapsule sa tokoferil acetatom u crvenoj, beloj, zelenoj, plavoj i sivoj boji, prečnika 1-3 mm. Koriste se u proizvodima za negu kože, kose, usne duplje. Prema navodima proizvođača, aktivne supstance u milikapsulama zadržavaju svoju efikasnost dok se ne oslobode iz kapsule, posle čega ne zaostaju rezidue kapsula na koži (24).

Askorbinska kiselina

Vitamin C (INCI: Ascorbic acid) je hidrosolubilni antiokidans, koji ima široku primenu u kozmetičkim proizvodima. U koži igra važnu ulogu u fotoprotekциji i prevenciji pojave znakova starenja kože (25). Sposobnost vitamina C da smanji hiperpigmentaciju je posledica inhibicije enzima tirozinaze (26). Vitamin C, kao snažan antioksidans redukuje oksidovani oblik vitamina E i vraća ga u aktivni oblik, te se na taj način ponovo iskorisćuju antioksidantna svojstva vitamina E.

Vitamin C je posvetljujuća KAS, koja je bezbedna za melanocite, ali se zbog svoje nestabilnosti često kombinuje sa drugim KAS, koje takođe pokazuju izvesnu sposobnost posvetljivanja kože (npr. ekstrakt korena sladića ili soje) (27). Za posvetljivanje kože se koriste serumi (losioni), koji sadrže do 10% vitamina C, a pojedini kozmetički proizvodi i 20% vitamina C, čiji pH je u kiselom području (pH 2,0-3,0). To je ispod najnižeg pH (3,0) kozmetičkih proizvoda za duži kontakt sa kožom, dozvoljen u EU, zbog čega su ovakvi kozmetički proizvodi svrstani u tzv. profesionalnu kozmetiku i mogu se koristiti isključivo od strane dermatologa, ili uz njihov nadzor.

Problem izrade kozmetičkih proizvoda sa vitaminom C je izrazita hemijska nestabilnost. Faktori koji utiču na stabilnost, odnosno povećavaju brzinu razgradnje vitamina C su: visoki pH, povišena temperatura, prisustvo kiseonika i jona metala. Razgradnja, praćena žućkastom bojom proizvoda, može se nastaviti ubrzano, a zavisi i od tipa formulacije, pakovanja, uslova čuvanja (28). U jednoj novijoj studiji iz 2016. godine (29) pokazano je da askorbinska kiselina ima veću stabilnost u emulzionom sistemu, u poređenju sa vodenim i propilenglikolnim rastvorima, mikroemulzijama i sistemima sa tečnim kristalima. Da bi se očuvala stabilnost vitamina C u kozmetičkom proizvodu potrebno je da pH proizvoda bude ispod 3,5, pa čak i ispod 3,0. Osim pažljivog izbora formulacije, posebna pažnja se usmerava i na ispravno pakovanje proizvoda - u ambalaži nepropustljivoj za svetlost i vazduh (30).

Noviji derivati askorbinske kiseline

Brojni derivati vitamina C, sintetisani pre svega radi povećanja stabilnosti ovog vitamina, mogu se podeliti na hidrosolubilne (magnezijum ili natrijum-askorbil fosfat, askorbil glukozid, askorbil laktozid, natrijum ili magnezijum askorbat), liposolubilne (askorbil palmitat, askorbil tetraizopalmitat) i amfifilne (trinatrijum askorbil palmitat fosfat, etil askorbinska kiselina).

Askorbil glukozid (INCI: Ascorbyl Glucoside) je stabilan hidrosolubilan derivat vitamina C. Esterifikacijom hidroksilne grupe molekulom glukoze, povećana je stabilnost askorbinske kiseline. Askorbil glukozid ne dovodi do promene boje kozmetičkog proizvoda, a zadržava biološku aktivnost askorbinske kiseline. Deluje kao dobar antioksidans, „smanjuje“ fine linije i bore, popravlja izgled kože i štiti je od oštećenja suncem. U kozmetičkim proizvodima se koristi u koncentraciji 0,1-0,2% (31).

Slično, esterifikacijom hidroksilne grupe laktozom, dobija se stabilan hidrosolubilni derivat askorbil laktozid (INCI: Ascorbyl Lactoside). Ovaj mali hidrosolubilni molekul može da penetrira kroz međućelijske prostore, gde će doći do hidrolize pod dejstvom laktaze na molekul askorbinske kiseline i laktozu. Pokazuje znatno bolju stabilnost u vodi, u poređenju sa askorbinskom kiselinom (32).

Proizvođač Showa Denko (Japan) proizvodi stabilan, hidrosolubilan pro-vitamin vitamina C, askorbil 2-fosfat (AF). Osetljiva hidroksilna grupa vitamina C je zaštićena prevodenjem u fosfatni estar. Estar nije fiziološki aktivан, ali hidrolizuje pod dejstvom fosfataze u aktivnu askorbinsku kiselinu. AF je dostupan za kozmetičku upotrebu u dva oblika, kao magnezijumova so (INCI: Magnesium Ascorbyl Phosphate) (MAF) i natrijumova so (INCI: Sodium Ascorbyl Phosphate) (NAF). Nije uočena razlika u fiziološkom delovanju dve soli, međutim jeste hemijska. MAF je stabilniji oblik, dok je NAF rastvorljiviji u vodi. MAF i NAF se uglavnom koriste kao aktivni sastojci za proizvode namenjene posvetljivanju kože. Većina novijih studija pokazuje značajne rezultate ovih supstanci i u „hvatanju“ slobodnih radikala. Upravo zbog ovog efekta nalaze primenu i u *anti-age* proizvodima, proizvodima za negu kože i proizvodima za masnu kožu i kožu sklonu aknama (33). Preporučene koncentracije NAF, u proizvodima za dnevnu negu kože su 0,2-2%, u proizvodima za zaštitu od sunca 0,2-1%, a u proizvodima za posvetljivanje hiperpigmentacija više od 3% (34). Preporučene koncentracije za MAF, kada se koristi kao KAS su od 1-2%, a ako se koristi kao antioksidans za kozmetički proizvod, preporučena koncentracija je od 0,05-1% (35).

Etil askorbinska kiselina (INCI: 3-O-Ethyl Ascorbic Acid) je stabilan, amfifilni derivat vitamina C, sa efektom posvetljivanja kože. Prema navodima proizvođača sirovine (Lipo Chemicals Inc., SAD), u testu inhibicije melanogeneze, sprovedenom na kulturi melanocita, pokazano je da etil askorbinska kiselina deluje brže od askorbil glukozida i magnezijum askorbil fosfata (36). Za razliku od ovih derivata vitamina C,

koji su estri i kod kojih mora da dođe do hidrolize da bi delovali, ovaj etar deluje odmah.

Askorbil palmitat (INCI: Ascorbyl Palmitate) (AP) je liposolubilni estar askorbinske kiseline. Smatra se da poseduje bolju stabilnost i sposobnost penetracije u kožu u odnosu na askorbinsku kiselinu. Ima antioksidantna svojstva, „hvata“ slobodne radikale u koži i prevenira nastanak bora (25, 37). Osim kao KAS, ova supstanca se decenijama koristi kao dobar liposolubilni antioksidans u kozmetičkim proizvodima, lekovima i hrani.

Za izradu kozmetičkih proizvoda se mogu koristiti i drugi liposolubilni derivati vitamina C, kao što je npr. tetra-izopalmitoil askorbinska kiselina (IPAA) (INCI: Ascorbyl Tetraisopalmitate). Za ovaj derivat se navodi da je stabilniji od vitamina C, kao i da bolje penetrira u kožu (38,39). *In vivo* ispitivanjima, na 20 dobrovoljaca, pokazano je da određene formulacije sa 1% ovog derivata vitamina C popravljaju izgled kože (39).

Nosači askorbinske kiseline i derivata

Inkapsulacija vitamina C u različite nosače može da daje dobre rezultate u pogledu očuvanja stabilnosti ovog vitamina i kontrolisanja isporuke u kožu. Inkapsulacija se više preporučuje u poređenju sa hemijskom modifikacijom, najviše iz razloga što hemijska modifikacija može da izmeni bioaktivnost vitamina C (26).

Noviji sistemi za isporuku vitamina C su čvrste lipidne mikročestice (*engl.* Solid Lipid Microparticles, skr. SLM), koje predstavljaju smešu hidrofilnih surfaktanata i v/u emulzija. Korišćenjem čvrstih lipida, SLM su u čvrstom stanju na sobnoj temperaturi i na taj način obezbeđuju dugoročnu stabilnost aktivne supstance. Pravilnim izborom vrste i koncentracije hidrofilnih i lipofilnih surfaktanata, kao i sa odgovarajućim odnosom vodene i masne faze, SLM mogu samoemulgovanjem u vodenom medijumu formirati v/u/v emulzije. Ovakve višestruke v/u/v emulzije, koje su nastale samoemulgovanjem SLM, omogućavaju produženo oslobađanje i poboljšanu penetraciju vitamina C u kožu svinja (40).

Osim askorbinske kiseline, u različite nosače se mogu inkorporirati i njeni derivati. Tako se, npr. smanjenje razgradnje askorbil palmitata može obezbediti njegovom inkapsulacijom u mikroemulzije, polimerne nanočestice i čvrste lipidne nanočestice (41). U studiji (42) je pokazano da je degradacija askorbil palmitata smanjena, kada je inkapsuliran u nanonosače, koji i sami imaju antioksidantne osobine.

Inkluzijom askorbil tetraizopalmitata, jednog od novijih, liposolubilnih derivata vitamina C, koji je uljasta tečnost, u γ -ciklodekstrin, ili njegovim adsorbovanjem na mezoporoznu siliku dobijaju se praškovi, u kojima je postugnuta dobra stabilnost KAS, a koji se lako mogu inkorporirati u čvrste kozmetičke proizvode, pre svega dekorativne

kozmetike. Oslobađanje askorbil tetraizopalmitata je veoma brzo, kada je nosač γ -ciklodekstrin, ili usporeno, kada je nosač mezoporozna silika (43).

Niacinamid

Vitamin B3 (INCI: Niacinamide), poznat i pod imenom nikotinamid, je snažan antioksidans, koga koža dobro podnosi, a ima ulogu u regeneraciji kože. Potvrđeno je njegovo pozitivno dejstvo na kožu sklonu aknama (44-46). Efekat gela sa 4% niacinamida u nezi kože sklone aknama je uporediv sa efektima 1% klindamicin gela (46). Ispitivanja su takođe potvrdila da upotreba niacinamida značajno smanjuje fine linije i bore, hiperpigmentacije, kao i da poboljšava elastičnost kože (47, 48).

Niacinamid daje lagiju teksturu kozmetičkim proizvodima, što ga čini pogodnim za upotrebu u dnevnim kremovima. Uobičajeno se koristi u koncentraciji 3,5-5 % (49,50). Najveći izazov u formulisanju kozmetičkih proizvoda sa niacinamidom i nikotinskim estrima je izbeći hidrolizu do nikotinske kiseline. Nikotinska kiselina, čak i pri niskoj koncentraciji, može da izazove crvenilo kože (*napomena*: zbog ovog dejstva je izbačen iz kozmetičkih proizvoda tokoferil nikotinat). Poželjno je da pH proizvoda sa niacinamidom bude od 4 do 7, kako bi se izbegla hidroliza. Upravo iz navedenih razloga izrada kozmetičkih proizvoda sa niacinamidom i kiselinama (npr. sa salicilnom kiselinom), kao i baznim sastojcima (npr. cink oksidom) je problematična (3).

Miristil nikotinat (INCI: Myristyl Nicotinate) je lipofilni derivat vitamina B3, koji penetrira u epidermis zahvaljujući lipofilnom „repu“ (ostatak miristinske kiseline). Studije na dobrovoljcima sa fotoostareлом kožom su pokazale da miristil nikotinat poboljšava diferencijaciju ćelija i barijernu funkciju epidermisa, pa može da neguje fotoostarelju kožu (51).

Pantenol

Pantenol (INCI: Panthenol) ili provitamin B5 je prirodni sastojak kože i kose, a njegov nedostatak dovodi do orožavanja, depigmentacije, deskvamacije i svraba. Pantenol penetrira u kožu i povećava sadržaj vode u površinskim slojevima, čime koži daje vlažnost, mekoću i vraća joj elastičnost, čini je glatkom, bez pojave masnoće i lepljivosti. Poboljšava funkciju kožne barijere. Takođe je dobar humektans u kozmetičkim proizvodima (52,53). Preporučene koncentracije su od 2-5%, a najveća dozvoljena koncentracija u kozmetičkim proizvodima za negu kože je 5,3% (54).

Pantenol je i dobar ovlaživač kose, čini dlaku debljom i sjajnjom. Štiti i oporavlja oštećenu dlaku od mehaničkih i hemijskih tretmana (češljanje, šamponiranje, farbanje), a smanjuje i nastanak ispucalih krajeva kose (55,56). Takođe se koristi i u proizvodima za negu noktiju. Može da poveća kapacitet očuvanja vode u noktu, a time se dalje povećavaju fleksibilnost i elastičnost nokatne ploče (55). Preporučene koncentracije

pantenola u proizvodima za negu kose su 0,1-5 %, a u proizvodima za negu noktiju 1% (52,55).

Bezbednost primene kozmetičkih proizvoda sa vitaminima

Potrošači smatraju vitamine bezbednim sastojcima u kozmetičkim proizvodima. To dokazuju i izveštaji o bezbednosti kozmetičkih proizvoda sa vitaminima, primenjenih u određenim koncentracijama i za postizanje određenih kozmetičkih efekata na koži.

Evropski komitet za bezbednost potrošača je u decembru 2016. godine ocenio da je upotreba vitamina A (retinol, retinil palmitat i retinil acetat), u koncentracijama 0,05% u losionima za telo i 0,3% u kremama za ruke, kremama za lice i proizvodima koji se ispiraju sa kože bezbedna. Preporuka je da se vitamin A i njegovi estri ne koriste u Evropskoj uniji u proizvodima za zaštitu od sunca (9).

α -tokoferil acetat je najčešće korišćeni oblik vitamina E u proizvodima za negu kože i proizvodima za zaštitu od sunca. Pored njega, 2012. godine je ocenjena bezbednost upotrebe još 13 tokoferola i tokotrienola kao sastojaka u kozmetičkim proizvodima. Zaključeno je da su ovi sastojci bezbedni za upotrebu u kozmetičkim proizvodima i da ne predstavljaju rizik za iritaciju i senzibilizaciju kože (57) .

Vitamin C se smatra visoko bezbednom KAS, može se primjenjivati svakodnevno, u toku dužeg vremenskog perioda. Može se bezbedno kombinovati sa drugim KAS (UV filteri, derivati vitamina A, glikolna kiselina). Retko se posle primene zapažaju peckanje, eritem i suvoća kože. Ovakve promene brzo se povlače posle primene proizvoda za vlaženje kože. Dodatno upozorenje za proizvode sa vitaminom C se odnosi na primenu u predelu oko očiju – ne preporučuje se primjena na kožu oko očiju.

U izveštaju CIR-a (*engl. Cosmetic Ingredient Review*), iz 2005. godine, navodi se da su L-askorbinska kiselina, kalcijum askorbat, magnezijum askorbat, magnezijum askorbil fosfat, natrijum askorbat i natrijum askorbil fosfat bezbedni za primenu u kozmetičkim proizvodima i da ne predstavljaju rizik za senzibilizaciju ili iritaciju kože (58).

Askorbinska kiselina u proizvodima za profesionalnu upotrebu se koristi u koncentracijama 10-20 % i ovi proizvodi imaju izrazito kiseli pH (2,0-3,0), zbog čega se navodi da se mogu koristiti isključivo od strane dermatologa, ili uz njihov nadzor.

Niacin i niacinamid su u širokoj upotrebi u kozmetičkim proizvodima, prvenstveno kao kondicioneri kože i kose. Oba sastojka se smatraju bezbednim za upotrebu u kozmetičkim proizvodima u Evropskoj uniji. Izveštaj objavljen 2005. godine je potvrdio da niacin i niacinamid ne predstavljaju rizik za senzibilizaciju i iritaciju kože, kao i da su nekomedogeni (59).

Na osnovu izveštaja CIR-a, iz 2016. godine, maksimalna koncentracija pantenola u kozmetičkim proizvodima koji ostaju na koži je 5,3% (54).

Zaključak

Najčešće korišćeni vitamini u kozmetičkim proizvodima su: retinol i njegovi estraski oblici, α -tokoferol, askorbinska kiselina, određeni vitamini B grupe, kao i derivati navedenih vitamina. Prisustvo vitamina u kozmetičkim proizvodima uliva poverenje kod krajnijih korisnika, koji smatraju takav proizvod efikasnim i bezbednim, što može biti ostvareno kada su vitamini prisutni u odobrenim koncentracijama.

Poboljšanje stabilnosti vitamina u kozmetičkim proizvodima može uključivati modifikaciju same molekule vitamina sa ciljem poboljšanja stabilnosti, lipofilnosti ili hidrofilnosti, ili primenu različitih nosača vitamina, koji mogu i modifikovati oslobođanje ovih KAS.

Znanja o kozmetičkim efektima vitamina i njihovih derivata se stalno proširuju i značajna su za razumevanje efikasnosti, ali i bezbednosti kozmetičkih proizvoda sa jednim ili više vitamina u sastavu. Međutim, tvrdnje o kozmetičkim efektima kozmetičkih proizvoda sa vitaminima, kao i sa bilo kojom drugom KAS, moraju biti dokazane isključivo na gotovim kozmetičkim proizvodima, na humanim dobrovoljcima.

Literatura

1. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. Official Journal of the European Union. L 342/59.
2. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Kortting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. Clin Inter Aging. 2006; 1(4): 327-48.
3. Ramos-e-Silva M, Celem LR, Ramos-e-Silva S, Fucci-da-Costa AP. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. Clin Dermatol. 2013;31(6):750-8.
4. Duchi S, Goldstein, D. A Novel Microencapsulating Technology Ensuring Retinol Stability and Activity. SOFW Journal. 2014;140(8):26-33.
5. Kong R, Cui Y, Fisher GJ, Wang X, Chen Y, Schneider LM, Majmudar G. A comparative study of the effects of retinol and retinoic acid on histological, molecular, and clinical properties of human skin. J Cosmet Dermatol. 2016;15(1):49-57.
6. Bouloc A, Vergnanini AL, Issa MC. A double-blind randomized study comparing the association of Retinol and LR2412 with tretinoin 0.025% in photoaged skin. J Cosmet Dermatol. 2015;14(1):40-6.
7. Retinol [Internet]. Technical information, BASF [cited 2017 Oct 29]. Available from: <http://www.dr-baumann-international.co.uk/science/BASF%20Vitamin%20A.pdf>.

8. Serri R, Iorizzo M. Cosmeceuticals: focus on topical retinoids in photoaging. *Clin Dermatol*. 2008; 26:633-5.
9. Opinion on Vitamin A (Retinol, Retinyl Acetate, Retinyl Palmitate) [Internet]. [cited 2017 Sept 7]. Available from:http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_199.pdf.
10. Kennedy C, Bastiaens MT, Bajdik CD, Willemze R, Westendorp RG, Bouwes Bavinck JN. Effects of smoking and sun on the aging skin. *J Invest Dermatol*. 2003;120(4):548-54.
11. Sudel KM, Venzke K, Mielke H, Breitenbach U, Mundt C, Jaspers S, Koop U, Sauermann K, Knussman-Hartig E, Moll I, Gercken G, Young AR, Stab F, Wenck H, Gallinat S. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem Photobiol*. 2005;81(3):581-7.
12. Kim H, Kim N, Jung S, Mun J, Kim J, Kim B, Lee J, Ryoo H, Jung H. Improvement in skin wrinkles from the use of photostable retinyl retinoate: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2010;162:497-502.
13. Kim H, Koh J, Baek J, Seo Y, Kim B, Kim J, Lee J, Ryoo H, Jung H. Retinyl retinoate, a novel hybrid vitamin derivative, improves photoaged skin: a double-blind, randomized-controlled trial. *Skin Res Technol*. 2011;17:380-5.
14. GranactiveRetinoid – The power of retinol without irritation [Internet]. [cited 2017 Sept 30]. Available from:http://www.in-cosmetics.com/RXUK/RXUK_InCosmetics/2015-Website/Documents/in-cos15%20IS,%20T2,D1,Granactive%20Retinoid%20The%20power%20of%20retinol%20without%20the%20irritation,John%20Gormley.pdf?v=635653937948561840.
15. Bissett DL. Common cosmeceuticals. *Clin Dermatol*. 2009;27:435-45.
16. Sauvant P, Cansell M, Sassi AH, Atgie C. Vitamin A enrichment: caution with encapsulation strategies used for food applications. *Food Res Int*. 2012;46(2):469-79.
17. Sacher M, Pérez Sánchez J, Fonseca A. Maximum Stability, Bioavailability and Lower Irritation from Retinol. *SOFW Journal*. 2017;143(3):22-8.
18. Peter D, Stanek J, Gupta S. Retinaldehyde cyclodextrin complex for topical skin therapy. *Glob Dermatol*. 2015;2(6):232-6.
19. Rabe JH, Mamelak AJ, McElquinn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(1):1-19.
20. Vasiljević D, Savić S, Đorđević Lj, Krajišnik D. *Priručnik iz kozmetologije*. Drugo izdanje. Beograd: Nauka; 2009.
21. TPNaTM [Internet]. [cited 2017 Oct 30]. Available from:<http://www.sdk.co.jp/english/products/110/114/12630.html>.
22. Kuwabara Y, Watanabe T, Yasuoka S, Fukui K, Takata J, Yoshiharu K, Okamoto Y, Asano S, Katoh E, Tsuzuki T, Shzuko K. Topical application of gamma-tocopherol derivative prevents UV-induced skin pigmentation. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(6):1175-9.

23. Touitou E, Godin B. New approaches for UV-induced photodamage protection. *J Appl Cosmetol.* 2006;24:139-47.
24. A2 Millicapsules [Internet]. [cited 2017 Oct 30]. Available from:http://www.nova-com.ru/gallery/pdf/A2_millicapsules_E.pdf.
25. Baumann L. Kozmetička dermatologija: načela i praksa. 1. hrvatsko izdanje. Zagreb: Interpretusluge doo; 2011.
26. Pinnell SR. Topical l-ascorbic acid: Percutaneous absorption studies. *Dermatol Surg.* 2001;27:137-42.
27. Stamford NPJ. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *J Cosmet Dermatol.* 2012;11:310-7.
28. Spiclin P, Gasperlin M, Kmetec V. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *Int J Pharm.* 2001;222(2):271-9.
29. Spagnol CM, Ferreira GA, Chiari-André BG, Borges Isaac VL, Corrêa MA, Nunes Salgado HR. Ascorbic Acid in Cosmetic Formulations: Stability, *in vitro* release, and permeation using rapid, inexpensive, and simple methods. *J Disp Sci Techn.* 2016; 38(6):901-8.
30. Segall A, Moyano MA. Stability of vitamin C derivatives in topical formulations containing lipoic acid, vitamins A and E. *Int J Cosmet Sci.* 2008;30(6):453-8.
31. Ascorbyl Glucoside [Internet]. [cited 2017 Sept 30]. Available from:<https://www.gfn-selco.de/en/Productdetails/?details=true&pid=149>.
32. Zan F, Shi L, Xue H. Ascorbyl Lactoside: A New Vitamin C Derivative for Effective Skin Whitening [Internet]. [cited 2017 Sept 19]. Available from:<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/function/active/Ascorbyl-Lactoside-A-New-Vitamin-C-Derivative-for-Effective-Skin-Whitening-291881441.html>.
33. APM, APS [Internet]. [cited 2017 Sept 30]. Available from:https://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/246415?v=636022091249270000.
34. Sodium Ascorbyl Phosphate [Internet]. [cited 2017 Sept 30]. Available from:<http://www.drbbaumann-international.co.uk/science/BASF%20Vitamin%20C.pdf>.
35. Smaoui S, Hlima H, Kadri A. Application of l-ascorbic acid and its derivatives (sodium ascorbyl phosphate and magnesium ascorbyl phosphate) in topical cosmetic formulations: stability studies. *J Chem Soc Pak.* 2013;35(4):1096-102.
36. Ethyl Ascorbic Acid [Internet]. [cited 2017 Sept 30]. Available from:http://www.lipochemicals.com/system/files/brochures/Ethyl%20Ascorbic%20Acid_SS.pdf.
37. Colven RM, Pinnell SR. Topical vitamin C in aging. *Clin Dermatol.* 1996; 14: 227-34.
38. Xiao L, Kaneyasu K, Saitoh Y, Terashima Y, Kowata Y, Miwa N. Cytoprotective effects of the lipoidic-liquiform pro-vitamin C tetraisopalmitoyl-ascorbate (VC-IP) against ultraviolet-A ray-induced injuries in human skin cells together with collagen retention, MMP inhibition and p53gene repression. *J Cell Biochem.* 2009;106:589-98.

39. Campos MP, Gianeti MD, Camargo FB, Gaspar LR. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulation: Stability studies and in vivo efficacy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;82(3):580-6.
40. Gu C, Hu C, Ma C, Fang Q, Xing T, Xia Q. Development and characterization of solid lipid microparticles containing vitamin C for topical and cosmetic use. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2016;118:1093–103.
41. Kristl J, Volk B, Gašperlin M, Šentjurc M, Jurkovič P. Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. *Eur J Pharm Sci.* 2003;19:181-9.
42. Janesirisakule S, Sinthusake T, Wanichwecharungruang S. Nanocarrier with self-antioxidative property for stabilizing and delivering ascorbyl palmitate into skin. *J. Pharm Sci.* 2013;102:2770–9.
43. Bastianini M, Sisani M, Petracci A. Ascorbyl tetraisopalmitate inclusion into γ -cyclodextrin and mesoporous SBA-15: preparation, characterization and in vitro release. *Cosmetics.* 2017; 4(3):21-30.
44. Griffiths CEM. Nicotinamide 4% gel for the treatment of inflammatory acne vulgaris. *J Dermatol Treat.* 1995;6:6-8.
45. Tanno O, Ota Y, Kitamura N, Katsume T, Inoue S. Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier. *Br J Dermatol.* 2000;143:524-31.
46. Shalita AR, Smith JG, Parish LC, Sofman MS, Chalker DK. Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol.* 1995;34(6):434-7.
47. Bissett DL, Miyamoto K, Sun P, Li J, Berge CA. Topical niacinamide reduces yellowing, wrinkling, red blotchiness and hyperpigmented spots in aging facial skin. *Int J Cosmet Sci.* 2004;26:231-8.
48. Bisset DL, Oblong JE, Berge CA. Niacinamide: a B vitamin that improves aging facial skin appearance. *Dermatol Surg.* 2005;31:860-5.
49. Matts PJ, Oblong JE, Bisset DL. A review of the range of effects of niacinamide in human skin. *IFSCC Magazine.* 2002;5(4):285-9.
50. Manela-Azulay M, Bagatin E. Cosmeceuticals vitamins. *Clin Dermatol.* 2009;27:469-474.
51. Jacobson EL, Kim H, Kim M, Williams JD, Coyle DL, Coyle WR, Grove G, Rizer RL, Stratton MS, Jacobson MK. A topical lipophilic niacin derivative increases NAD, epidermal differentiation and barrier function in photodamaged skin. *Exp Dermatol.* 2007;16:490–9.
52. Camargo FB Jr, Gaspar LR, Campos MP. Skin moisturizing effects of panthenol-based formulations. *J Cosmet Sci.* 2011;62(4):361-70.
53. Schmidt-Eckey O. Skin smoothing and moisturizing properties of a panthenol jojoba spray. *SOFW Journal.* 2013;139(1/2):20-5.
54. Safety Assessment of Panthenol, Pantothenic Acid, and Derivatives as Used in Cosmetics [Internet]. [cited 2017 Oct 30]. Available from:<http://www.cir-safety.org/sites/default/files/PANTS012017.pdf>.

55. Casas C. Vitamins. In: Salvador A, Chisvert A, editors. Analysis of Cosmetic Products. Amsterdam, Oksford: Elsevier; 2007. p. 364-79.
56. Panthenol [Internet]. Technical information, BASF [cited 2017 Oct 30]. Available from:<http://www.dr-baumann-international.co.uk/science/BASF%20Panthenol.pdf>.
57. Safety Assessment of Tocopherols and Tocotrienols as Used in Cosmetics [Internet]. [cited 2017 Sept 27]. Available from:<http://www.cir-safety.org/sites/default/files/tocoph032014FR.pdf>.
58. Elmore AR. Final report of the safety assessment of L-Ascorbic Acid, Calcium Ascorbate, Magnesium Ascorbate, Magnesium Ascorbyl Phosphate, Sodium Ascorbate, and Sodium Ascorbyl Phosphate as used in cosmetics. *Int J Toxicol.* 2005;24 Suppl 2:51-111.
59. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final Report of the Safety Assessment of Niacinamide and Niacin. *Int J Toxicol.* 2005;24 Suppl 5:1-31.

Vitamins in cosmetic products – current opinions and practice

Dragana Vasiljević^{1*}, Nataša Radonjić², Gordana Vučeta¹

¹University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

²Cosmetics Pharmacy 1, MPM doo, Ulica Bratstva i jedinstva bb, 81000 Podgorica, Montenegro

*Corresponding author: Dragana Vasiljević, vasilj@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Vitamins A, E, C, B3 and provitamin B5 (panthenol), and their numerous derivatives are most widely used in cosmetic products.

Cosmetic retinoids (retinol, retinaldehyde, and retinyl esters) have been used for years in cosmetic treatments of (photo)aged skin - brightened hyperpigmentation, reducing roughness of the skin and fine lines and wrinkles. Using the new vitamin A derivative, retinyl retinoate, is considered to overcome the problems associated with instability and undesirable effects of retinol. Hydroxypinacolone retinoate is a new anti-aging ingredient with the efficacy of retinol, but with significantly less irritant potential.

Vitamin E (tocopherol) slows down the formation of wrinkles and alleviates the existing ones. Because of the pronounced instability, vitamin E is used in the form of esters, usually as tocopheryl acetate. The novelty on the market is a water-soluble derivative of vitamin E – sodium tocopheryl phosphate.

Vitamin C also has positive effects on the skin. However, free vitamin C (ascorbic acid) is very unstable and easily loses its activity. Newer derivatives of vitamin C, which may be water-soluble, amphiphilic or liposoluble, have improved stability compared to the ascorbic acid. They are used in skin care and skin lightening products.

Panthenol, which is a very good moisturizer, has been used in various cosmetic products for skin and hair for many years. Vitamin B3 (niacinamide) is commonly used in facial day creams, as skin conditioner.

Vitamins in cosmetic products can be considered as safe cosmetic active ingredients, when used in appropriate chemical forms and in allowed concentrations.

Keywords: vitamins and derivatives, cosmetic effects on the skin, safety of cosmetic products with vitamins

Nanofarmaceutski preparati – karakteristike značajne za farmaceutsku praksu

Bubić Pajić Nataša^{1*}, Gatarić Biljana¹, Čivčija Jelena²,
Vuleta Gordana³

¹ Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet – studijski program Farmacija, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Save Mrkalja 14, Banja Luka

² Paracelsus Apotheke, Schillerstraße 35, Schönebeck (Elbe), Njemačka

³ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

* Adresa autora za korespondenciju: natasa.bubic.pajic@med.unibl.org

Kratak sadržaj

U polju farmaceutske tehnologije, nanofarmaceutski preparati/nanofarmaceutici su trenutno tema koja se najviše ispituje i koja najviše obećava. Primjenom materijala zasnovanih na nanotehnologiji, kao nosača za isporuku lijekova, mogu da se poboljšaju njihove farmakološke osobine, mijenjajući farmakokinetiku i distribuciju ljekovitih supstanci u biološkoj sredini. Ovaj pristup je naročito koristan u isporuci lijekova u tumorska tkiva. Zbog svojih karakteristika, nanofarmaceutici imaju mnoge prednosti u odnosu na konvencionalne preparate u hemoterapiji. Najveća prednost je ciljana isporuka lijeka do tumorskog tkiva, što za rezultat ima smanjenu sistemsku toksičnost, koja je najistaknutija mana konvencionalne hemoterapije. Zahvaljujući klinički postignutom uspjehu, poslednjih godina, od svih nanonosača, najviše pažnje i najveću primjenu, postigli su liposomi i micle. Na tržištu je komercijano dostupno više različitih nanofarmaceutika sa ljekovitim supstancama iz farmakoloških grupa kao što su antineoplasticci, anestetici, analgetici, antibiotici, a najčešće su u sljedećim farmaceutskim oblicima: prašak za rastvor za infuziju, suspenzija za injekciju i emulzija za injekciju. Takođe, veći broj nanofarmaceutika je u različitim fazama kliničkih ispitivanja. Ipak, regulatorna tijela do sada nisu ponudila konkretne informacije o ispitivanjima njihovih karakteristika, kontroli kvaliteta i pitanjima bezbjednosti nanofarmaceutika, koje su farmaceutskim kompanijama neophodne u procesu razvoja i pripremi dokumentacije za registraciju nanofarmaceutika, što otežava/odgađa pojavu većeg broja novih lijekova iz ove grupe.

Ključne riječi: nanofarmaceutski preparati/nanofarmaceutici, liposomi, nanokristali, micle, nanoemulzije, nanokompleksi, bezbjednost

Uvod

Nanotehnologija (grč. *nano* – učiniti da nešto izgleda malo), u kontekstu nanomedicine, može se definisati kao tehnologija koja obuhvata proizvodnju nanonosača za ljekovite supstance i dijagnostičke reagense, nanoelektroničkih biosenzora, nanouređaja, kao i nanostrukturiranih mikrouređaja. Na području EU, 2011. godine je usvojena preporuka o definiciji nanomaterijala, prema kojoj nanomaterijal predstavlja prirodni ili materijal proizveden nemajerno ili namjenski, koji se sastoji od pojedinačnih čestica, ili ima oblik agregata ili aglomerata, pri čemu najmanje 50% čestica ima jednu ili više spoljašnjih dimenzija u rasponu 1-100 nm (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm). Međutim, iako se u polju nanotehnologije, prema većini definicija koje su dale različite druge organizacije, udruženja i regulatorna tijela, „nano“ veličina odnosi na veličinu od 1-100 nm u najmanje jednoj dimenziji (1, 2), u polju biomedicine ova definicija treba da se proširi i približi koloidnoj nauci, prema kojoj koloidni sistemi sadrže čestice koje imaju veličinu od 1 nm do 1 μm u najmanje jednoj dimenziji (3, 4). Istraživanja u oblasti biomedicine su prvenstveno usmjereni na razvoj nanonosača koji će dovesti do značajnih poboljšanja u terapiji bolesti, nego na razvoj nosača čije bi se dimenzije strogo uklopile u definiciju nanotehnologije. Stoga, definicija nanotehnologije primjenjene u biomedicinske i kliničke svrhe predstavlja nešto širi pojam (5). Takođe, i FDA, kroz svoj vodič namjenjen industriji (*Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology* (6)), navela je da materijali i proizvodi dimenzija između 100 i 1000 nm mogu da imaju osobine i ispoljavaju fenomene karakteristične za nanomaterijale veličine 1-100 nm. Stoga, postavljanje gornje granice od 1000 nm, u kombinaciji sa prisustvom karakteristika koje su zavisne od veličine čestica, kao i fenomena tipičnih za nanomaterijale (1-100 nm), predstavlja inicijalnu alatku kojom se identificuju materijali ili proizvodi sa osobinama koje su, sa regulatornog aspekta, od posebne važnosti (6).

Nanomedicina je definisana kao primjena nanotehnologije u cilju postavljanja medicinskih dijagnoza, liječenja ili prevencije bolesti, korišćenjem poboljšanih ili novih fizičkih, hemijskih i bioloških materijala na nanometarskoj skali (5) i obuhvata nanofarmaceutike (namijenjene za isporuku lijekova), nanodijagnostičke preparate, preparate koji se koriste za terapiju i dijagnostiku (engl. nanotheranostics) i nanobiomaterijale (npr. medicinski implantati) (8). Nanofarmaceutici, koji čine oko 75% odobrenih nanomedicinskih proizvoda, su lijekovi u čijoj proizvodnji najvažniju ulogu imaju tehnike nanoinženjeringu, pri čemu je korišćeni nanomaterijal od krucijalnog značaja za terapijsku aktivnost preparata ili nanomaterijal aktivnim supstancama mijenja funkcionalnost, dajući im dodatne i jedinstvene karakteristike (3). U razvoju farmaceutskih preparata koji sadrže nanomaterijale (nanofarmaceutici), nanotehnologija je korišćena u cilju poboljšanja rastvoljivosti lijeka (micele,

nanokristali), usmjeravanja lijeka do željenog mesta sa većom preciznošću, kontrolisanja oslobađanja lijeka (nanočestice i liposomi), i/ili poboljšanja transporta kroz biološke barijere (micele i nanočestice). Ovi pristupi imaju za krajnji cilj povećanje biološke raspoloživosti lijeka, veću farmakološku efikasnost i bezbjednost, te poboljšanje liječenja bolesti koje trenutno ne može biti postignuto upotrebom konvencionalnih farmaceutskih oblika (9, 10). Razvoj nanodisperznih sistema je doveo do značajnog napretka u farmakoterapiji: zadovoljavajuće stabilnosti, veće selektivnosti, manje toksičnosti, odgovarajućeg farmakokinetičkog profila inkorporirane ljekovite supstance. Prvi dobijeni nanonosači (nanoemulzije i liposomi) su inkorporirani u određeni broj odobrenih farmaceutskih preparata sa ljekovima kao što su doksorubicin, daunorubicin, amfotericin B, nistatin, morfin, propofol, diazepam, deksametazon, ciklosporin, etomidat. Razvojem nanočestica se otvorio put za kontrolisano oslobađanje i ciljnu isporuku ljekovitih supstanci, s obzirom da one obezbjeđuju bolju zaštitu inkorporiranih supstanci. Takođe, u budućnosti se može očekivati sve veći broj nanofarmaceutskih preparata sa biotehnološkim ljekovitim supstancama (engl. biotech drugs), kao što su nukleinske kiseline, proteini, oligonukleotidi, DNK (11, 8).

Od ranih 90. godina prošlog vijeka pa do danas, broj objavljenih naučnih publikacija u kojima su proučavani nanofarmaceutici eksponencijalno raste. U ovoj oblasti je zabiježeno preko 10000 naučnih radova, 1500 patenata i 115 kliničkih ispitivanja (12). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO), FDA (Food and Drug Administration) i EMA (European Medicines Agency) su odobrile da više različitih nanofarmaceutskih preparata za liječenje različitih bolesti postane komercijalno dostupno (13). Godine 2016. je procjenjeno da je oko 250 nanofarmaceutika odobreno ili je u nekoj od faza kliničkih studija (8). Takođe, prema podacima iz 2017. godine, preko 100 novih lijekova sa nanomaterijalima prolazi kroz različite faze kliničkih ispitivanja (12). Najčešće se radi o ispitivanjima preparata sa ljekovitim supstancama koje su već komercijalno dostupne u farmaceutskim oblicima koji nisu bazirani na nanotehnologiji, a cilj je da se postigne veća efikasnost i/ili bolja podnošljivost lijekova u odnosu na postojeće preparate (13). Osim toga, klinički se ispituju i nanonosači za ciljnu isporuku lijekova i nanočestica zasnovanih na metalima, kojima se lijek na željeno mjesto dostavlja uvođenjem različitih spoljašnjih stimulusa (8).

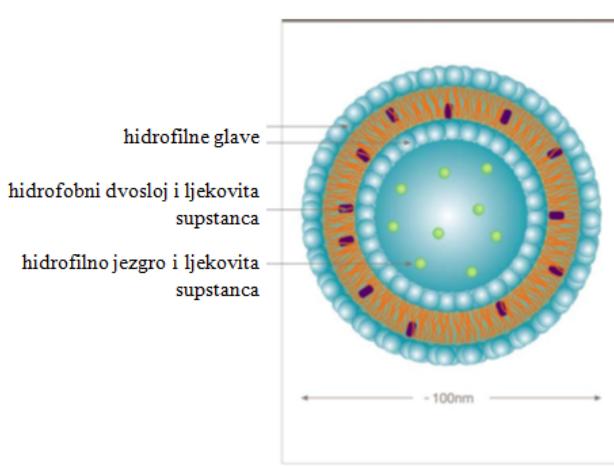
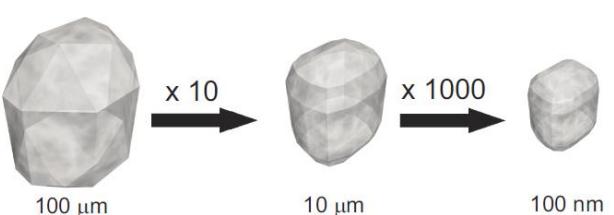
Terapijska efikasnost i bezbjednosti lijekova, pored kvaliteta, osnovni su zahtjevi koje preparat treba da ispuni da bi postigao komercijani uspjeh. Međutim, većina nanofarmaceutika ne ispuni pomenute uslove za registraciju lijeka na tržištu (14). Kao uzroci za ograničen klinički uspjeh nanofarmaceutskih lijekova se najčešće navode nedostatak metoda i standardizovanih protokola za pretklinički razvoj, kao i za ispitivanje efikasnosti, toksičnosti i bezbjednosti ove grupe preparata (15-17).

Odobreni nanofarmaceutski preparati na tržištu lijekova

Na svjetskom tržištu lijekova odobreni nanofarmaceutski preparati uključuju formulacije zasnovane na liposomima, nanoemulzijama, nanokristalima, polimer-protein konjugatima, polimernim lijekovima, nanokompleksima, polimernim micelama, nanočesticama i virosomima (3, 10, 18). U Tabeli I su opisane različite vrste nosača ljekovitih supstanci u nanofarmaceutskim preparatima i shematski prikazana njihova struktura.

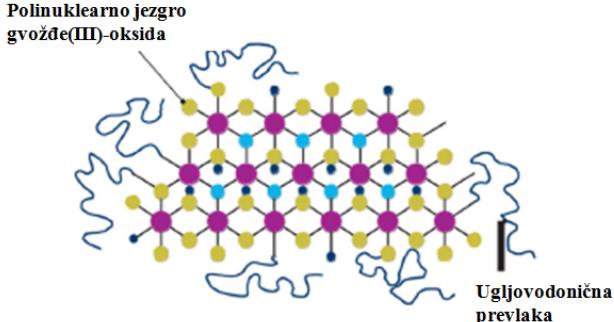
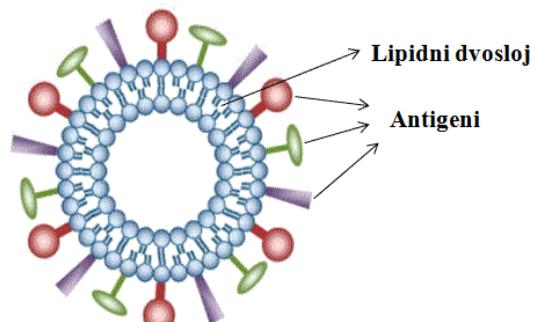
Tabela I Nosači aktivnih supstanci u odobrenim nanofarmaceutskim preparatima – karakteristične osobine i prikaz strukture

Table I Drug carriers in commercially available nanopharmaceutical preparations – characteristics and structure

Nosač aktivne supstance	Definicija/osobine	Shematski prikaz strukture
Liposomi	<ul style="list-style-type: none">Sferične vezikule sastavljene od jednog ili više zakrivljenih lipidnih dvoslojeva koji okružuju vodeno jezgro i po svojoj gradi su slični ćelijskim membranama. Lipofilni krajevi dvoslojeva su orijentisani jedni prema drugima i grade unutrašnji, lipofilni dio vezikule. U ovaj lipofilni dio se mogu inkorporirati lipofilni ili amfifilni lijekovi, ukoliko su pogodne veličine i geometrije molekula. Hidrofilne glave lipida su okrenute prema spoljašnjoj vodenoj fazi i unutrašnjem vodenom jezgru vezikule. U hidrofilne dijelove se mogu inkorporirati lijekovi rastvorljivi u vodi. Veličine su od 10 nm do 10 µm (19-21).	 <p>Preuzeto i prilagođeno prema referenci 21</p>
Nanokristali	<ul style="list-style-type: none">Nanočestice ljekovitih supstanci dimenzija od nekoliko nm do 1000 nm (22, 23).Rastvorljivost aktivnih supstanci je konstantna vrijednost i zavisi od hemijske prirode supstance i rastvarača, i od temperature. Ispod kritične veličine od 1000 nm, saturaciona rastvorljivost supstance je u funkciji veličine čestica i sa smanjenjem njihove veličine, rastvorljivost raste, što povećava stepen njihove resorpcije kada se nađu u GIT-u (3, 24).	 <p>Povećanje površine i broja čestica, smanjenjem veličine čestica Preuzeto iz reference 22</p>

Nosač aktivne supstance	Definicija/osobine	Shematski prikaz strukture
Nanoemulzije	<ul style="list-style-type: none"> Nanoemulzije (ranije submikronske emulzije ili mini emulzije) su disperzije ulja i vode stabilizovane surfaktantima, gdje su dispergovane kapi reda nanometarskih veličina (50-1000 nm, a najčešće 100-500 nm) (25). 	<p>Preuzeto i prilagođeno prema: http://blogs.nottingham.ac.uk/malaysiaknowledgetransfer/2013/06/25/what-is-pharmaceutical-nanoemulsion/</p>
Nanočestice	<ul style="list-style-type: none"> Koloidni sistemi, obično prečnika od 1 do 100 nm, koji su uglavnom izgrađeni od biodegradabilnih polimera (GRAS status, eng. Generally Recognized and Safe) (11, 26). Dijele se na: <ul style="list-style-type: none"> ➤ nanosfere – nanočestice matriksnog tipa čiji cijeli volumen zauzima polimer, sa lijekom dispergovanim u polimerni matriks nanosfere ili adsorbovanim na njenu površinu; ➤ nanokapsule – nanočestice sastavljene od polimerne membrane koja okružuje jezgro ispunjeno tečnošću (ulje ili voda) sa lijekom, ili je lijek adsorbovan na površinu nanokapsule (27-30). 	<p>Preuzeto i prilagođeno prema referenci 29</p>

Nosač aktivne supstance	Definicija/osobine	Shematski prikaz strukture
Polimerne micele	<ul style="list-style-type: none"> Klasa micela (obično sfernog oblika i prečnika 5-100 nm) koja se obrazuje u vodenoj sredini samoorganizovanjem blok kopolimera, sastavljenih od hidrofilnih i hidrofobnih monomernih jedinica, pri koncentraciji višoj od kritične micelarne koncentracije. Ove čestice imaju jezgro izgrađeno od hidrofobnih blokova stabilizovano omotačem od hidrofilnih polimernih lanaca. Iako se za sintetisanje polimernih micela mogu koristiti različiti hidrofilni polimeri, za obrazovanje hidrofilnog omotača se najčešće koriste PEG blokovi sa molekulskom masom od 1 do 15 kDa, a dužina blokova za obrazovanje jezgra je nešto manja nego za formiranje hidrofilnog dijela micele (27, 29, 30). 	<p>Preuzeto i prilagođeno prema referenci 30</p>
Preparati zasnovani na polimerima	<ul style="list-style-type: none"> Ova grupa nosača ljekovitih supstanci se razlikuje od polimernih nanočestica i zasnovana je na upotrebi rastvorljivih polimera kao osnovne komponente jezgra nosača (10). <ul style="list-style-type: none"> Vrste: polimerni lijekovi, polimer-ljek konjugati, polimer-protein konjugati, polimerni vektori i dendrimeri (31). 	<p>Preuzeto i prilagođeno prema referencama 32 i 33</p>

Nosač aktivne supstance	Definicija/osobine	Shematski prikaz strukture
Nanočestice oksida gvožđa	<ul style="list-style-type: none"> Magnetne nanočestice (10-100 nm), sintetisane od gvožđe-oksida ili magnetita, koje ispoljavaju superparamagnetski efekat. Nakon injektovanja u krvni sistem, lijek, koji je vezan za njih, se do mesta djelovanja vodi primjenom lokalnog magnetnog polja (27, 30). 	 <p>Preuzeto i prilagođeno prema referenci 10</p>
Virosomi	<ul style="list-style-type: none"> Male unilamelarne fosfolipidne vezikule koje sadrže na svojoj površini glikoproteine virusa, što im omogućuje fuziju sa ciljanim ćelijama, indukujući pojačan imuni odgovor (9, 10). 	 <p>Preuzeto i prilagođeno prema referenci 34</p>

Većina nanofarmaceutika koji su komercijalno dostupni predstavljaju formulacije koje sadrže ljekovite supstance koje su takođe odobrene u konvencionalnim farmaceutskim oblicima. Među aktivnim supstancama su najviše zastupljeni lijekovi visoke toksičnosti, a najveći broj formulacija sadrži paklitaksel (Abraxane® prašak za suspenziju za infuziju, Abraxis Bio Science; Genexol®-PM prašak za suspenziju za infuziju, Samyang Biopharmaceuticals Corporation; Nanoxel® rastvor za infuziju, Dabur Pharma) ili doksorubicin (Caelyx®/Doxil® koncentrat za rastvor za infuziju, Janssen-Cilag; Myocet® prašak, disperzija i rastvarač za koncentrat za disperziju za infuziju, Cephalon). Mnogi od lijekova imaju i veoma nisku rastvorljivost, zbog čega se u njihovim konvencionalnim farmaceutskim oblicima morao upotrebiti solubilizator neodgovarajućeg toksikološkog profila (makrogol-1500-gliceril triricinoleat – Cremophor® EL) za rastvaranje paklitaksela u Taxol® rastvoru za infuziju, kao i ciklični oligosaharid, hidroksipropil-β-ciklodekstrin, kao posrednik za obrazovanje inkluzionih kompleksa sa itrakonazolom u Sporanox® oralnom rastvoru (13, 22). Kao nosači za

isporuku lijekova u odobrenim nanofarmaceutskim preparatima najčešće su korišćeni liposomi (doksorubicin, daunorubcin, vinkristin, amfotericin B, nistatin, mifamurtid, irinotekan, citarabin, heparin) i nanoemulzije (etomidat, propofol, deksametazon, diazepam, liposolubilni vitamini, ciklosporin, difluprednat), a značajan broj preparata sadrži nanokristale aktivnih supstanci (rapamicin, aprepitant, fenofibrat, megesetrolacetat, paliperidon, olanzapin, morfin, metilfenidat, tizanidin). Takođe, nanofarmaceutici su najčešće odobreni u farmaceutskim oblicima za parenteralnu primjenu: prašak za rastvor za infuziju (Ambisome[®], formulacija amfotericina B sa liposomima), suspenzija za injekciju (Exparel[®], sadrži bupivakain inkapsuliran u liposome) i emulzija za injekciju (Etomidat[®] Lipuro), zatim kao čvrsti farmacetski oblici za peroralnu primjenu (meke kapsule (Sandimmun Neoral[®], samomikroemulgajući preparat sa ciklosporinom), tablete (Triglide[®], sadrži nanokristale fenofibrata), kapsule sa produženim oslobođanjem (Avinza[®], sa nanokristalima morfina; Focalin XR[®], sadrži nanokristale deksametilfenidata)). Osim toga, dostupno je i nekoliko preparata za ostale puteve primjene, i to: pulmonalna (Curosurf[®] suspenzija za endotraheopulmonalno ukapavanje), oftalmološka (Durezol[®] kapi za oči, Restasis[®] kapi za oči, Ikervis[®] kapi za oči) i dermalna primjena (ViaTromb[®] sprej za kožu/gel)), ali i lijekovi iz grupe vakcina, kod kojih su nosači virosomi (Epaxal[®], suspenzija za injekciju, vakcina protiv hepatitisa A; Inflexal[®] V, suspenzija za injekciju, vakcina protiv influence).

Tabela II Primjeri odobrenih nanofarmaceutskih preparata na tržištu Srbije i Bosne i Hercegovine (<https://www.alims.gov.rs/ciril/>, <http://www.almbih.gov.ba/>)

Table II Examples of commercially available nanopharmaceutical preparations in Serbia and Bosnia and Herzegovina (<https://www.alims.gov.rs/ciril/>, <http://www.almbih.gov.ba/>)

Nosač aktivne supstance	Ime lijeka i farmaceutski oblik	Ljekovita supstanca i sadržaj	Indikacija	Proizvodač
Liposomi	Curosurf [®] suspenzija za endotraheopulmonalno ukapavanje	Fosfolipidna frakcija iz pluća svinje (poraktant alfa) 80 mg/ml	Prevencija i terapija respiratornog distres sindroma kod prijevremeno rođene djece	Chiesi Farmaceutici GmbH, Austrija
	Alveofact [®] prašak i rastvarač za suspenziju za endotraheopulmonalno ukapavanje	Fosfolipidna frakcija iz pluća goveda (surfaktant) 45 mg/ml	Prevencija i terapija respiratornog distres sindroma kod prijevremeno rođene djece	Lyomark Pharma GmbH, Njemačka
	Survanta [®] suspenzija za endotraheopulmonalno ukapavanje	Beraktant (ekstrakt govedih pluća) 25 mg/ml	Prevencija i terapija respiratornog distres sindroma kod prijevremeno rođene djece	AbbVie Inc., SAD

Nosač aktivne supstance	Ime lijeka i farmaceutski oblik	Ljekovita supstanca i sadržaj	Indikacije	Proizvodač
Nanokristali	Rapamune® obložena tableta	Rapamicin (sirolimus) 1 mg	Prevencija odbacivanja transplantiranog organa	Pfizer Ireland Pharmaceuticals, Irska
	Emend® kapsula, tvrda	Aprepitant 80 mg i 125 mg	Prevencija mučnine i povraćanja kod emetogene hemoterapije karcinoma	Merck Sharp & Dohme B.V., Holandija
	Lipidil® 145/ Lipanthyl® 145/ Zyglip film tableta tableta	Fenofibrat 145 mg	Hipertrigliceridemija, hiperholosterolemija, dislipidemija	Recipharm Fontaine, Francuska/ Mylan Laboratories SAS, Francuska/ Alkaloid AD, Makedonija
	Xeplion® suspenzija za injekciju sa prođušenim oslobođanjem	Paliperidon-palmitat (39, 78, 117, 156 i 234 mg/ml)	Bipolarni poremećaji, šizofrenija	Janssen Pharmaceutica N.V., Belgija
Nanoemulzije	Diprivan® emulzija za injekciju/ infuziju	Propofol 10 mg/ml	Anestetik	Astra Zeneca, Velika Britanija/Corden Pharma Societa per Azioni, Italija
	Vitalipid® N Adult koncentrat za emulziju za infuziju	Retinol 194,1 µg/ml, fitomenadion 15 µg/ml, ergokarciferol 0,5 µg/ml, tokoferol 0,91 µg/ml	Nadoknada vitamina	Fresenius Kabi AB, Švedska
	Vitalipid® N Infant koncentrat za emulziju za infuziju	Retinol 135,3 µg/ml, fitomenadion 20 µg/ml, ergokarciferol 1 µg/ml, tokoferol 0,64 µg/ml	Nadoknada vitamina	Fresenius Kabi AB, Švedska
SMEDDS*	Sandimmun Neoral® kapsula, meka oralni rastvor	Ciklosporin 25 mg, 50 mg i 100 mg 100 mg/ml	Profilaksa odbacivanja transplantiranog organa	Novartis Pharma, Švajcarska
Polimerne nanočestice	Abraxane® prašak za suspenziju za infuziju	Paklitaksel 5 mg/ml	Metastazirani rak dojke	Celgene Europe Limited, Velika Britanija
Preparati zasnovani na polimerima	Renvela® film tableta prašak za oralnu suspenziju	Sevelamer-hidrohlorid 800 mg 2,4 g	Hiperfosfatemija kod pacijenata na hemodializiji ili peritonealnoj dijalizi	Genzyme Limited, Velika Britanija/ Genzyme Limited, Irska
	Copaxone® rastvor za injekciju u napunjrenom injekcionom špricu	Glatiramer-acetat 20 mg/ ml i 40 mg/ml	Multipla skleroza	Teva Pharmaceuticals Industries Ltd, Izrael/ Teva Pharmaceuticals Europe BV, Holandija/ Norton Healthcare Limited T/A Ivax Pharmaceuticals, Velika Britanija
	Somavert® prašak i rastvarač za rastvor za injekciju	Pegvisomant 10 mg, 15 mg i 20 mg	Akromegalija	Pfizer Manufacturing, Belgija
	PegIntron® prašak i rastvarač za rastvor za injekciju	Peginterferon alfa-2b 50 µg, 80 µg i 100 µg / 0,5 ml	Hronični hepatitis C	Schering-Plough Labo N.V, Belgija

Nosač aktivne supstance	Ime lijeka i farmaceutski oblik	Ljekovita supstanca i sadržaj	Indikacije	Proizvodač
Preparati zasnovani na polimerima	Pegasys® rastvor za injekciju u napunjenom injekcionom špricu/ rastvor za injekciju u penu sa uloškom	Peginterferon alfa-2b 90 µg/0,5 ml, 135 µg/0,5 ml, 180 µg/0,5 ml	Hepatitis B, hronični hepatitis C	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Švajcarska
	Neulastim® rastvor za injekciju u napunjenom injekcionom špricu	Pegfilgrastim 6 mg/0,6 ml	Neutropenija indukovana hemoterapijom	Amgen Europe B.V., Holandija
	Mircera® rastvor za injekciju u napunjenom injekcionom špricu	Metoksi-PEG-epoetin beta 50, 75, 100, 120, 150 i 200 µg /0,3 ml, 360 µg/0,6 ml	Anemija kod hroničnih oboljenja bubrega	Roche Diagnostics GmbH, Njemačka
	Eligard® prašak i rastvarač za rastvor za injekciju	Leuprorelin-acetat 7,5 mg, 22,5 mg i 45 mg	Kancer prostate	Astellas Pharma Europe B.V., Holandija
Nanočestice oksida gvožđa	Venofer® rastvor za injekciju/infuziju	Kompleks gvožđe(III)-oksida i saharoze 20 mg/ml elementarnog gvožđa	Anemija uzrokovana nedostatkom gvožđa	Vifor (International) Inc, Švajcarska
	Monofer® rastvor za injekciju/infuziju	Gvožđe(III)-izomaltozid 1000 100 mg/ml elementarnog gvožđa	Anemija uzrokovana nedostatkom gvožđa	Pharmacosmos A/S, Danska

* SMEDDS (engl. Self Microemulsifying Drug Delivery System) – Samo-mikroemulgajući nosač za isporuku lijeka

S obzirom da su se liposomi kao nosači aktivnih supstanci počeli ispitivati od 1976. godine (35), očekivano je da su najstarija i najzastupljenija klasa nanonosača u kliničkoj primjeni. Osim formulacija lijekova koji se koriste u hemoterapiji (doksorubicin, daunorubicin, vinkristin, citarabin, mifamurtid), preparati sa liposomima su dostupni i za liječenje gljivičnih infekcija (amfotericin B, nistatin), bola (bupivakin, mofin), oboljenja oka (verteporfin), kao i respiratornih oboljenja novorođenčadi (beraktant, bovektant, poraktant alfa). Inkapsulacijom aktivnih supstanci u liposome se usporava njihovo oslobađanje i umanjuje renalni klirens, što mijenja farmakokinetiku slobodnih lijekova (36). Takođe, oblaganjem površine liposoma polietilenglikolima (PEG) ili drugim polimerima se obezbjeđuje sterno ometanje za opsonizaciju od strane retikulo-endotelnog sistema i produžuje vrijeme zadržavanja liposoma u cirkulaciji. Produceno prisustvo liposoma u cirkulaciji omogućuje njihov prolazak na mjesta gdje su krvni sudovi propustljiviji (npr. u regiji tumora) (3, 19, 36). Razvojem preparata sa liposomima DaunoXome® koncentrat za rastvor za infuziju i Caelyx®/Doxil® koncentrat za rastvor za infuziju značajno je smanjena kardiotoksičnost, koja je uobičajena za terapiju daunorubicinom i doksorubicinom (10), kao i povećana akumulacija lijekova u

tumorskog tkiva (3). Slično, neželjena dejstva amfotericina B (reakcije povezane sa primjenom infuzije lijeka i nefrotoksičnost indukovana hroničnom primjenom lijeka) su prevaziđena upotrebom liposoma kao nosača ljekovite supstance u AmBisome® prašku za rastvor za infuziju. Iako je klinička prednost upotrebe nanofarmaceutskih preparata sa liposomima najčešće smanjenje neželjenih efekata lijekova (13), takođe moguće je produžiti poluživot i usporiti oslobađanje lijekova (Caelyx®/Doxil®, DepoCyt®, DepoDur®, Myocet®), smanjiti učestalost doziranja citarabina (DepoCyt®) ili dozu morfin-sulfata za adekvatnu kontrolu bolesti (DepoDur®), kao i oponašati prirodnu strukturu virusa (preparati sa virosomima, poput Inflexal® V, Epaxal®) (3, 10). Godine 2016. je odobren preparat sa liposomima Onivyde® disperzija za injekciju/infuziju, koji sadrži inhibitor topoizomeraze I (irinotekan) inkapsuliran u liposome, a upotrebom ovog lijeka se produžava vrijeme preživljavanja pacijenata sa metastatskim tumorom pankreasa (24).

Antineoplastik paklitaksel je aktivna supstanca u više različitih nanofarmaceutika na tržištu: Genexol-PM®, prašak za suspenziju za infuziju, Nanoxel®, rastvor za infuziju i Abraxane®, prašak za suspenziju za infuziju. S obzirom na njegovu veoma nisku rastvorljivost u vodi, za rastvaranje lijeka u konvencionalnim farmaceutskim oblicima (Taxol® rastvoru za infuziju i generički ekvivalenti) je korišćena smjesa dviju pomoćnih supstanci – surfaktant makrogol-1500-gliceril triricinoleat (Cremophor® EL) i etanol (50:50). Međutim, prisustvo pomenutog surfaktanta u formulaciji je povezano sa pojavom ozbiljnih neželjenih efekata, kao što su hipersenzitivne reakcije (37). U poređenju sa Taxol® rastvorom za infuziju pokazano je da su neželjeni efekti smanjeni upotrebom nanofarmaceutskih preparata sa paklitakselom. Takođe, postignuta je veća ili slična efikasnost u slučaju primjene Genexol®-PM (koji će vjerovatno biti odobren u EU pod imenom Cynvilog®) i Nanoxel®-a, respektivno, kao jedina dva odobrena preparata zasnovana na polimernim micelama (10, 35, 38-40). Abraxane® je zasad jedini odobreni lijek u kojem su polimerne nanočestice nosači paklitaksela. Ovaj sterilni liofilizat sadrži 100 mg paklitaksela u amorfnim nanočesticama albumina prosječnog prečnika od 130 nm i upotrebljava se u obliku suspenzije za infuziju, upravo zahvaljujući veličini čestica od 130 nm, koje se mogu primjenjivati intravenski. Zbog manje toksičnosti i dužeg zadržavanja nanočestica albumina u cirkulaciji, dozvoljena je upotreba paklitaksela u većim dozama, u poređenju sa Taxol®-om (37). Zbog klinički dokazane prednosti u odnosu na konvencionalne formulacije infuzionih rastvora paklitaksela sa surfaktantom, Abraxane® se danas rutinski koristi u kliničkoj praksi za indikaciju metastaziranog raka dojke (13).

Slično kao u slučaju liposoma, polimernih micela i polimernih nanočestica, i u kategoriji nanoemulzija, najveći broj preparata je odobren u farmaceutskim oblicima za parenteralnu primjenu. Tradicionalno, nanoemulzije se već oko pet decenija koriste u totalnoj parenteralnoj ishrani pacijenata. Kapacitet za rastvaranje velikih količina

hidrofobnih lijekova, kao i mogućnost zaštite aktivnih supstanci od hidrolize i enzimske degradacije, čini nanoemulzije veoma pogodnim nosačima za parenteralnu primjenu lijekova. Određen broj nanofarmaceutskih preparata sa nanoemulzijama je odobren za nadokanadu liposolubilnih vitamina (vitamin A, D, E i K) i liječenje različitih bolesti nanofarmaceuticima diazepamom, propofolom, deksametazonom, etomidatom, flurbiprofena i prostaglandinom E1) (41). Takođe, veliku pažnju istraživača privlače samodispergujući nosači za isporuku lijekova zasnovani na lipidima, koji sadrže lijek u homogenoj, izotropnoj smješti sastavljenoj iz lipida (ulja), hidrofilnih surfaktanta/kosurfaktanta, a mogu da sadrže i hidrofilne korastvarače. Kada takvi preparati dospiju u lumen GIT-a, miješanjem sa gastrointestinalnom tečnošću se obrazuje U/V mikroemulzija (samo-mikroemulgujući nosači za isporuku aktivnih supstanci) ili U/V nanoemulzija (samo-nanoemulgujući nosači za isporuku aktivnih supstanci) (42). Za sada, uglavnom zbog ograničenja vezanih za upotrebu surfaktanta i korastvarača, i mogućnosti precipitacije lijeka nakon razblaženja *in vivo* (što vodi do nepredviđene oralne biološke raspoloživosti), samo nekoliko preparata na bazi samo-mikroemulgujućih/samo-nanoemulgujućih nosača je dostupno na tržištu, poput Sandimmun Neoral® mekih kapsula, Sandimmun Neoral® oralnog rastvora (Novartis Pharma, Njemačka) i Norvir® mekih kapsula (Aessica Queenborough Ltd, Velika Britanija) (10, 43).

Najveći broj preparata koji sadrže nanokristale lijekova je namjenjen za peroralni put primjene (tablete, kapsule sa produženim oslobađanjem, tvrde kapsule, oralna suspenzija), dok se manji broj lijekova iz ove kategorije nanofarmaceutika primjenjuje parenteralno. Kao glavne prednosti peroralnih farmaceutskih oblika sa nanokristalima (npr. Rapamune® obložene tablete, Emend® tvrde kapsule, Tricor® tablete, Megace® ES oralna suspenzija) navode se prihvatljivost od strane pacijenata (što može povećati komplijans) i veća biološka raspoloživost u odnosu na rastvore lijekova, proistekla iz smanjivanja čestica lijeka do nanometarskih veličina, što dovodi do povećanja rastvorljivosti lijeka (22). Nadalje, upotreba nanokristala može značajno da umanji zahtjevanu dozu lijeka, kao što je slučaj sa Tricor® tabletama (145 mg fenofibrata u nanofarmaceutiku u poređenju sa tabletama (160 mg) i kapsulama (200 mg) koje sadrže mikronizirani, odnosno nemikronizirani fenofibrat) (44). Osim toga, u slučaju Tricor® tableta, nanokristali fenofibrata značajno umanjuju razliku u apsorpciji između „natašte“ i „site“ faze, u poređenju sa tabletama/kapsulama koje ne sadrže nanokristale aktivne supstance, jer adhezivna svojstva nanokristala na crijevnoj sluzokoži nisu ugrožena u prisustvu hrane, što može biti od značaja za komercijalni uspjeh lijekova ukoliko bi bilo zahtjevano da se uzimaju sa hranom (10).

Parenteralni put primjene lijeka je dominantan i u slučaju formulacija lijekova baziranih na nanočesticama gvožđe(III)-oksida: Feraheme™ (Advanced Magnetics)/Rienso® (Takeda Italia Farmaceutici SpA), Ferinject® (Vifor France SA)/Injectafer® (Luitpold Pharmaceuticals), Venofer® (Vifor (International) Inc),

Ferrlecit® (Aventis Pharma), Monofer® (Pharmacosmos A/S), Ferrisat® (Pharmacosmos A/S) i Cosmofer® (Pharmacosmos A/S). Navedeni rastvori za injekciju/infuziju sa nanočesticama oksida gvožđa koriste se u terapiji anemije, ukoliko se oralnom terapijom ne postiže odgovarajući efekat ili pacijenti imaju hroničnu insuficijenciju funkcije bubrega. Gvožđe se iz ovakvih kompleksnih struktura oslobađa u makrofage retikulo-endotelnog sistema, odakle prelazi intracelularno u zalihe gvožđa ili u transferin u plazmi i postaje dostupno za efektivnu eritropoezu (3, 45). S obzirom da proizvodnja različitih nanokompleksa oksida gvožđa podrazumijeva različite polazne materijale i različite uslove proizvodnje (npr. reakcionalno vrijeme, pH, temperatura), odobreni lijekovi se razlikuju međusobno po svojim fizičkohemijskim osobinama, od kojih neke uopšte ne mogu da se otkriju uobičajenim metodama u kontroli kvaliteta lijekova. Stoga, razlike u strukturi jezgra, veličini čestica i njihovoj distribuciji, odnosu između gvožđa i ugljenog hidrata, mogu značajno da utiču na stabilnost kompleksa, dispoziciju lijeka nakon primjene i oslobađanje gvožđa (45). Ove razlike takođe mogu imati uticaja i na pojavu neželjenih dejstava nakon primjene parenteralnih nanofarmaceutika, kao što je pojava hipofosfatemije (Ferinject®/Injectafer®), prolazne proteinurije (Venofer®), oštećenja jetre (Ferrlecit®) ili alergijskih reakcija, koje su izazvane prisustvom dekstrana, što je zajedničko za sve parenteralne preparate gvožđa (10). U slučaju Monofer® rastvora za injekciju/infuziju, u kojem je nanokompleks matriksne strukture, oslobađanje gvožđa je kontrolisano i usporeno, što obezbjeđuje brzu primjenu lijeka kao visokodozne *i.v.* infuzije ili bolus injekcije, sa malim rizikom za pojavu intoksikacije slobodnim gvožđem (10). Osim lijekova za nadoknadu gvožđa, od 2013. godine je u Evropi odobren još jedan preparat koji sadrži superparamagnete nanocestice gvožđa obložene aminosilanom, a koristi se u terapiji tumora (glioblastoma, prostate i pankreasa): NanoTherm® (MagForce Ag, Njemačka). Injektovane nanocestice se podvrgavaju djelovanju promjenjivog magnetnog polja, što uzrokuje njihovu oscilaciju, koja generiše toplotu direktno u tumorskom tkivu i uništava ga kroz termalnu ablaciju (3).

U kategoriji nanofarmaceutika koji su zasnovani na polimerima, a imaju različite osobine od polimernih nanočestica, najveći broj lijekova predstavlja konjugate proteinskih molekula sa PEG ili lijek-protein konjugate. Zbog svojih dimenzija, fiziološki makromolekuli koji se koriste u terapiji, mogli bi se i sami svrstati u kategoriju nanofarmaceutika, ali se njihovo PEG-ilovanje (uvođenje PEG lanaca) koristi da bi se produžilo njihovo vrijeme zadržavanja u cirkulaciji i smanjila imunogenost (3). Tako je PEG-ilovanje interferona (PegIntron® and Pegasys®) značajno produžilo njihovo vrijeme zadržavanja u cirkulaciji i prelazak u hepatocite, što je dovelo do poboljšanja u liječenju hepatitis (10). Iako razvoj polimernih terapeutika počinje sa formulacijama za tretman malignih oboljenja, odobreni lijekovi uključuju brojne indikacije, poput infektivnih oboljenja (PegIntron® prašak i rastvarač za rastvor za

injekciju i Pegasys® rastvor za injekciju u napunjenom injekcionom špricu), reumatoидног artritisa (Cimzia® rastvor za injekciju i prašak za rastvor za injekciju) i makularne degeneracije (Macugen® rastvor za injekciju) (32). Slično kao kod ostalih grupa nanofarmaceutskih lijekova, i u grupi polimernih terapeutika, parenteralni put primjene lijeka se izdvaja kao dominantan. Samo nekoliko lijekova je namijenjeno za oralnu upotrebu, kao što su Renagel®/Renvela® film tablete i Welchol® tablete i prašak za oralnu suspenziju, a koriste se za liječenje hroničnih oboljenja bubrega, odnosno dijabetesa tipa 2 (32).

U Tabeli II su prikazani odobreni nanofarmaceutici dostupni na tržištu Bosne i Hercegovine i Srbije. U odnosu na preparate koji su odobreni na svjetskom tržištu, gdje se za najveći broj lijekova kao nosači koriste liposomi, na našoj regiji je najviše preparata zasnovanih na polimerima, a slijede ih lijekovi sa nanokristalima aktivnih supstanci.

Nanofarmaceutici u fazi kliničkih ispitivanja

Pored nanofarmaceutskih lijekova koji su odobreni za terapiju, veliki broj nanofarmaceutika trenutno prolazi kroz različite faze kliničkih ispitivanja (Tabela III). Status ovih lijekova je značajan jer daje smjernice za buduća istraživanja, kao što obezbjeđuje uvid u promjene koje se dešavaju u ovoj oblasti, i preparate koji bi mogli da se nađu na tržištu u skorijoj budućnosti (24). U odnosu na odobrene lijekove, sve je veći broj ispitivanih nanofarmaceutika zasnovanih na micelama i konjugatima proteina i lijekova, a kako se iz Tabele III može uočiti, najviše se ispituju formulacije za liječenje malignih bolesti. Tri nanofarmaceutska preparata doksorubicina su trenutno u različitim fazama kliničkih ispitivanja. Kao nosači doksorubicina u ovim preparatima se koriste liposomi (MM-302 i Thermodox®) i polimerne micle (SP-1049-C). Thermodox® je sličan Doxil®, ali su u formulaciju liposoma uključeni lipidi osjetljivi na promjene temperature, čija se struktura mijenja kada se izlože temperaturi od 40-45°C (izazvana radiofrekventnim talasima), pri čemu se na njihovoj membrani obrazuju kanali kroz koje se doksorubicin oslobađa direktno unutar i okolo ciljnog tumorskog tkiva dojke i jetre (24, <http://celsion.com/thermodox/>). U nekim zemljama (EU, Švajcarska, Turska i Izrael) je već dozvoljena njegova upotreba prije registracije, kako bi se tretirala hitna stanja povezana sa hepatobilijarnim tumorima (<http://celsion.com/thermodox/>). Još jedan preparat sa liposomima koji obećava – CPX-351, razvila je kompanija Celator Pharma. Preparat sadrži citarabin i daunorubicin u molarnom odnosu 5:1, a ova kombinacija lijekova se često koristi u terapiji akutne mijeloidne leukemije (46). Međutim, primjenom konvencionalnih metoda liječenja je često veoma teško postići maksimalan sinergistički efekat ovih lijekova, za razliku od primjene nanopreparata, gdje je to omogućeno zbog sekvencialne isporuke lijekova unutar tumorskog tkiva (13).

Tabela III Primjeri nanofarmaceutskih preparata u stadijumu kliničkih ispitivanja (8, 13, 22, 32, 35)

Table III Examples of nanopharmaceutical preparations in clinical trials (8, 13, 22, 32, 35)

Nosač aktivne supstance	Ime lijeka i/ili ljekovita supstanca	Indikacije	Status / faza kliničkih ispitivanja
Liposomi	Thermodox® (doksorubicin)	Hepatobilijarni tumori	III
	Lipoplatin™ (cisplatin)	Različite vrste kancera	II/III
	Lipoxal™ (oksaliplatin)	Rak dojke i gastrointestinalnog trakta	I
	Nanocort® (prednizolon)	Reumatoidni artritis i ulcerozni kolitis	II
	MM-302 (doksorubicin)	Metastazirani rak dojke	III
	CPX-351 (citarabin, daunorubicin)	Visokorizična mijeloblastna leukemija	II
	IHL-305 (irinotekan)	Uznapredovali čvrsti maligni tumori	I
	MM-398 (irinotekan)	Metastazirani rak prostate	III
	Promitil® (mitomicin C)	Uznapredovali čvrsti maligni tumori	I
	Arikace® (amikacin)	Gram negativni mikroorganizmi, Pseudomonas, Mycobacterium avian	III
	Lipoquin® (ciprofloksacin)	Gram negativni mikroorganizmi	II
	Pulmaquin® (ciprofloksacin)	Gram negativni mikroorganizmi	II/III
	Amfotericin B	Kožna lajšmanijaza	II
	L-CsA (ciklosporin)	Komplikacije bronholitisa	I/II
Nanokristali	HL-009 (adenozil-kobalamin)	Atopijski dermatitis	II
	ReadiSorb Glutathione (glutation)	Šizofrenija	I
	Fenofibrat	Dislipidemija, prekomjerna težina	II
	Budesonid	Astma	III
	Panzem® NCD	Karcinom prostate	II
	Panzem® NCD (2-metoksiestradiol) i tamozolamid	Karcinom jajnika	II

Nosač aktivne supstance	Ime lijeka i/ili ljekovita supstanca	Indikacije	Status / faza kliničkih ispitivanja
Nanokristali	Panzem® NCD (2-metoksiestradiol) i Avastin (bevacizumab)	Karcinoidni tumor	II
	Theralux® (timektacin)	Kancer	II
	Paxceed® (paklitaksel)	Reumatodini artritis, psorijaza	okončana
	Megesterol-acetat	HIV infekcija, anoreksija, opšta slabost uzrokovana hroničnim oboljenjem	II
Nanoemulzije	Estradiol i progesteron	Supstitucija hormona (transdermalna)	II
Polimerne micle	Paclital® (paklitaksel)	Maligniteti u ginekologiji	III
	NK-015 (paklitaksel)	Metastazirani rak dojke	III
	NK-012 (metabolit irinotekana)	Uznapredovali čvrsti maligni tumori	I/II
	Nanoplatin® (cisplatin)	Uznapredovali čvrsti maligni tumori	II/III
	NC-4016 (oksaliplatin)	Uznapredovali čvrsti maligni tumori	I
	SP1049-C (doksorubicin)	Uznapredovali rak želuca	III
	BIND-014 (docetaksel)	Metastazirajući rak prostate, rak pluća	II
Polimerne nanočestice	Livatag® (doksorubicin)	Rezistentni hepatocelularni karcinom	III
Preparati zasnovani na polimerima	DTX-SPL8783 (DEP® docetaxel)	Uznapredovali karcinomi	I
	CRLX-101 (kamptotehin)	Uznapredovali čvrsti maligni tumori, kancer rektuma	II
	CRLX-301 (docetaksel)	Refraktorni tumori	I (planirana)
	Opaxio* (paklitaksel)	Karcinom glave i vrata, glioblastoma, ginekološki maligniteti	II/III
	Vivagel® STI	Prevencija infekcija HIV, HPV i genitalnog herpesa	III
	NANOefavirenz	HIV infekcija	I
	NANOlopinavir	HIV infekcija	I
Preparati zasnovani na polimerima	NKTR-118 (nalokson)	Konstipacija indukovana opioidima	II

*FDA dodijelila status „lijek siročić“ (engl. „Orphan drug“)

Klinički se ispituju i nanofarmaceutici koji sadrže docetaksel, paklitaksel, mitomicin C i irinotekan. Može se primjetiti da su polimerne micle korištene kao nosač za isporuku lijekova u tumorsko tkivo u većem broju preparata, što je i očekivano jer su se polimerne micle, zbog svojih jedinstvenih osobina, pokazale kao efikasan

nosač lijekova. Mnogi od njih su u kasnim fazama ispitivanja, poput onih koji sadrže paklitaksel (NK-015 i Paclital®). Takođe, BIND-014, koji je privukao značajnu pažnju zbog svog potencijala u terapiji karcinoma prostate, ima polimerne micele kao nosač za docetaksel, koji je inkorporiran u jezgro polimernih micela, konjugovanih ligandom za ciljano vezivanje sa antigenom specifičnim za membranu ćelija prostate. Slično tome, upotrebom CriPec® polimernih micela, koje je razvila kompanija Cristal Therapeutics, docetaksel se ciljano isporučuje u tkivo čvrstih tumora (24). Takođe, docetaksel je jedina aktivna supstanca podvrgnuta kliničkom ispitivanju u formulaciji zasnovanoj na dendrimerima (DEP® docetaxel/DTX-SPL8783, Starpharma, Australija). Ovaj preparat je trenutno u fazi I kliničkih ispitivanja, čiji rezultati još uvijek nisu dostupni. Međutim, u pretkliničkim studijama je pokazano da je nanopreparat efikasniji i ima manju toksičnost u odnosu na Taxotere® koncentrat za rastvor za infuziju (Sanofi Aventis), pri čemu se naročito ističe odsustvo neutropenije, koja je glavni nedostatak terapije visokim dozama Taxotere®-a (http://www.starpharma.com/drug_delivery/dep_docetaxel). Kompanija Starpharma je razvila takođe i vaginalni gel zasnovan na dendrimerima - VivaGel®. Ovaj gel ne sadrži aktivne supstance, a antimikrobnog djelovanje gela, razvijenog za liječenje rekurentnih bakterijskih vaginoza i prevencije HIV infekcije, potiče od polilizina u strukturi dendrimera (35). VivaGel® BV, koji je indikovan za liječenje bakterijskih vaginoza, je dobio odobrenje za registraciju na teritoriji Australije i EU i očekuje se njegova skora pojava na tržištu. Takođe, na tržištu Australije i Kanade je dostupan VivaGel® kondom, koji se koristi za prevenciju seksualno prenosivih bolesti. Osim toga, za VivaGel® STI, indikovanog za prevenciju HIV infekcije, genitalnog herpesa i infekciju humanim papiloma virusom (HPV), trenutno su u toku ispitivanja koja obuhvata III faza kliničkih studija (http://www.starpharma.com/about_us, http://www.starpharma.com/vivagel/vivagel_clinical_trials). Osim Vivagel®-a, još dvije formulacije zasnovane na polimerima, koje sadrže antiretroviralne lijekove indikovane za liječenje HIV infekcija, prolaze kroz I fazu kliničkih ispitivanja (NANOefavirenz i NANOlopinavir). Od ovih preparata se očekuje da zadrže efikasnost postojećih preparata i povećaju podnošljivost lijekova, uz smanjenje doze lijeka i troškova terapije (13).

Nanofarmaceutici i njihova komercijalizacija

Nanofarmaceutici predstavljaju oko 15% globalnog farmaceutskog tržišta sa približno 250 nanopreparata koji su u kliničkoj praksi ili su u fazi kliničkih ispitivanja (10, 47). Procjenjuje se da će do 2019. godine vrijednost globalnog tržišta nanofarmaceutika dostići vrijednost od 528 milijardi dolara (47). Međutim, iako je ovaj sektor u ekspanziji, komercijalizacija nanofarmaceutika predstavlja veliki izazov. Da bi lijek bio odobren i komercijalizovan, potrebno je dokazati njegovu terapijsku efikasnost i bezbjednost. Nažalost, veliki broj nanofarmaceutskih preparata nije ispunio ove

kriterijume zbog izazova u optimizaciji formulacije, neujednačenosti u kvalitetu od serije do serije, kao i poteškoćama u razvoju robustnog i reproduktibilnog procesa proizvodnje, otežanom *scale-up* postupku i karakterizaciji, nestabilnosti u biološkim uslovima i regulatornim preprekama (10, 14, 16, 18, 48). Takođe, mnogi inovativni nanofarmaceutici sa aktivnim supstancama koje se koriste za liječenje rijetkih oboljenja se neće pojaviti na tržištu, zbog troškova registracije koji su daleko veći od očekivane prodaje takvih preparata (10).

Jedan od najvećih izazova, kako za regulatorna tijela tako i za farmaceutske kompanije, predstavlja nedostatak međunarodno prihvaćene definicije za prefiks "nano", tj. za ključne izraze kao što su nanotehnologija, nanomedicina, nanobiotehnologija, nanolijek, nanoterapeutik, nanofarmaceutski preparat/nanofarmaceutik i nanomaterijal. Usvajanje međunarodno prihvaćenih definicija za ove pojmove je neophodno za harmonizaciju regulative, patentiranje, razvoj standardizovanih postupaka i testova u kontroli kvaliteta nanofarmaceutika, kao i za procjenu bezbjednosti i etičnosti upotrebe ovih lijekova. Ukoliko se granice za veličinu moraju uključiti u definiciju "nano", onda bi, možda, gornja granica od 1000 nm bila najprikladnija, barem u pogledu rasprave koja se vodi o nanofarmaceuticima (49), kao i uzimajući u obzir da je FDA od 2010. godine podigla gornju granicu na 1000 nm u svrhu procjene dokumentacije za registrovanje preparata sa nanomaterijalima (kao što su lijekovi, medicinska sredstva, kozmetički proizvodi) (48), a što je kasnije uključeno i u vodič namjenjen industriji (6).

Doxil® koncentrat za rastvor za infuziju je lijek koji se širom svijeta uspješno koristi u terapiji karcinoma ovarijuma. Do sada je ovaj lijek primijenjen na više od 500 000 pacijenata. Međutim, uprkos širokoj primjeni i velikim naporima farmaceutskih kompanija, nakon više od četiri godine od isteka poslednjeg patenta vezanog za Doxil®, postoji samo jedan generički lijek; Lipodox®, koji je zvanično odobren 2013. godine od strane FDA (8). Prestroga regulativa u oblasti nanomedicine potencijalno stvara nepotrebnu barijeru ka komercijalizaciji nanoterapeutika nanoseći time štetu javnom zdravlju. Sa druge strane, jasno je da postoji potreba za kreiranjem regulatornih vodiča koji bi imali pristup zasnovan na naučnoj osnovi i koji bi omogućili objektivnu procjenu rizika kod primjene nanoterapeutika. Drugim riječima, regulatorni vodiči treba da budu dovoljno fleksibilni da bi mogli da se mijenjaju u korak sa tehnološkim inovacijama u ovoj oblasti. Međutim, iako je FDA održala veliki broj javnih rasprava na ovu temu, postavljala informacije sa različitih konferencija na svoju zvaničnu internet stranicu (<https://www.fda.gov/>), osnovala radnu grupu za pitanja nanotehnologije, objavila veliki broj saopštenja i izdala nacrte vodiča, nije uspjela da ponudi konkretne informacije o ispitivanjima, testovima u kontroli kvaliteta i drugim praktičnim pitanjima, koje su farmaceutskim kompanijama neophodne u procesu razvoja i registracije nanofarmaceutika. Kao posljedica toga, farmaceutska industrija je osuđena da

samostalno sakuplja sve dostupne informacije o "nanoregulativi" ili odobrenim preparatima koji sadrže nanomaterijale ili su proizvedeni prema principima nanotehnologije (49).

Bezbjednost nanofarmaceutskih preparata

Na tržištu postoji relativno veliki broj nanofarmaceutskih preparata za humanu upotrebu, ali se još uvek malo zna o njihovim efektima na zdravlje ljudi i potencijalnoj toksičnosti. Iako je nanotoksičnost kompleksna, poznato je da sistemi i čestice nanoveličine često imaju različite osobine u odnosu na isti materijal na makro nivou (*bulk* materijal) (50). U suštini ne može se pretpostaviti da će nanopreparat biti bezbjedan ili čak "bioekvivalentan" *bulk* materijalu. Ekstremno mala veličina čestica kod nanofarmaceutika može značajno uticati na ADME (Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam i Eliminacija) osobine lijeka (7). S obzirom na to da je stav FDA takav da reguliše samo nanopreparate, a ne nanotehnologiju *per se*, postoji značajan toksikološki rizik za javno zdravlje. Međutim, uprkos zabrinutosti javnosti i farmaceutske industrije ne postoje jasni vodiči ili nacrti vodiča koji bi regulisali ova pitanja. Većina toksikoloških testova omogućava samo procjenu kratkoročne toksičnosti, te je stoga potrebno razviti testove za dugotrajnu procjenu toksičnosti nanofarmaceutskih preparata.

Karakterizacija nanofarmaceutskih preparata se često sprovodi u uslovima koji ne oslikavaju realno fiziološko i biološko okruženje i potrebno je inkorporirati nove metode za kreiranje okruženja koje će bolje imitirati *in vivo* uslove, kao što su mikrofluidi. Osim toga, veoma je bitan odabir pravog životinjskog modela za ispitivanje različitih nanopreparata i sakupljanje podataka koje je moguće ekstrapolirati na čovjeka. Dakle, neophodno je dobro razumjeti kritične fizičkohemiske karakteristike kao i *in vivo* ponašanje nanofarmaceutskih preparata (14). Mnoge studije na životinjama su pokazale da određeni nanomaterijali ne djeluju toksično na jetru i bubrege (51, 52). Ipak, potrebno je sprovesti dodatna istraživanja da bi se razumjela biodistribucija, imuni odgovor, toksičnost i eliminacija nanomaterijala u tijelu čovjeka.

Procjena bezbjednosti primjene nanomaterijala kod čovjeka još uvijek predstavlja veliki izazov. S obzirom na to da ne postoje standardizovane metode za procjenu bezbjednosti, veoma je teško upoređivati rezultate pretkliničkih i kliničkih testova iz različitih laboratorija ili zdravstvenih ustanova. Osim toga, većina izvještaja o rezultatima kliničkih studija za nanofarmaceutike je uglavnom usmjerena na terapijsku efikasnost lijeka, ali ne i na njegovu bezbjednost i potencijalne neželjene efekte kod čovjeka. Dakle, neophodno je razviti jedinstvene standardizovane testove za procjenu bezbjednosti primjene nanomaterijala kod čovjeka (53).

Farmaceutska industrija je u potpunosti svjesna da regulatorne agencije ne mogu ponuditi opšte vodiče i protokole za testiranje svih nanolijekova (nanopreparata). Ipak,

regulatorne agencije bi trebalo da obezbjede vodiče koji bi barem mogli da daju naznake industriji da li će i u kojem obimu njihov nanopreparat biti podvrgnut sveobuhvatnjem regulatornom ispitivanju, u odnosu na konvencionalne lijekove. Za sada se proizvođačima savjetuje da se u ranim fazama razvoja nanofarmaceutika konsultuju sa FDA, kako bi se olakšalo razumijevanje naučnih i regulatornih pitanja i preparati dobili odobrenje da se nađu na tržištu (10, 49). Sa regulatornog aspekta, imperativ je da se definišu kritične osobine preparata, na osnovu kojih bi bilo moguće predvidjeti njegovo ponašanje u *in vivo* uslovima (npr. veličina i raspodjela veličine nanočestica, osobine površine) (10). U tom smislu, FDA je načinila i prvi korak, izdavanjem vodiča koji bi olakšao identifikaciju proizvoda koji sadrže nanomaterijale (6). Potrebno je takođe obezbjediti koordinaciju na globalnom nivou u cilju regulisanja pitanja nanolijekova i definisati koje regulatorne agencije, pored FDA i EMA, bi trebale da imaju ključnu odgovornost u rješavanju ovog pitanja (49). U tom kontekstu, bitno je istaći saradnju između EMA i Japanskog ministarstva zdravlja (engl. *Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare* (MHLW)) koja je rezultirala osnivanjem specijalne radne grupe za pitanje nanolijekova u koje su uključeni regulatorni eksperti i koja djeluje u okvirima Međunarodnog farmaceutskog regulatornog foruma (engl. *International Pharmaceutical Regulatory Forum* (IPRF)) (54).

Primjena nanotehnologije u medicini je dovela do značajnog napretka u postizanju pozitivnog zdravstvenog ishoda kod velikog broja pacijenata. Veoma je bitno ocijeniti da li će primjenom postojećih metoda karakterizacije nanolijekova i regulatornih vodiča moći adekvatno procijeniti njihova bezbjednost i efikasnost. Takođe je neophodno jačati saradnju između akademске zajednice, industrije i regulatornih tijela u cilju boljeg razumijevanja i razvoja regulatornih vodiča u oblasti nanolijekova (13).

Zaključak

U poslednjih nekoliko decenija, razvoj nanofarmaceutika je bio usmjeren ka poboljšanju fizičkohemijskih osobina nanočestica, kao što su veličina, oblik, osobine površine, nanelektrisanje i karakteristike oslobođanja lijeka, kako bi se poboljšao farmakokinetički profil lijeka te osigurala njegova selektivna isporuka. Razvijen je niz različitih tipova nanofarmaceutika od kojih su mnogi u kliničkoj primjeni. U većini slučajeva, riječ je o lijekovima koji osiguravaju pasivnu ciljanu dostavu citostatika u tumorska tkiva, zahvaljujući prolasku nanonosača kroz propustljive krvne sudove tumora, čime je značajno smanjena sistemska toksičnost tih lijekova i/ili povećana efikasnost lijekova u poređenju sa konvencionalnim farmaceutskim oblicima iste lijekovite supstance. Osim odobrenih (registrovanih) lijekova, veliki broj nanofarmaceutika se nalazi u različitim fazama kliničkih ispitivanja. Međutim, ograničen klinički uspjeh nanofarmaceutika je uglavnom uzrokovan izazovima u optimizaciji formulacija, konzistentnosti od serije do serije ovih preparata, robusnošću

procesa proizvodnje, metodama za karakterizaciju i ispitivanje njihovog kvaliteta, regulatornim zahtjevima, nestabilnošću preparata u biološkoj sredini, kao i nepoznavanjem bezbjednosti ove nove vrste lijekova, uglavnom zbog nedostatka adekvatnih testova kojima bi se ispitala i potencijalna dugoročna toksičnost nanopreparata.

Literatura

1. Lövestam G, Rauscher H, Roebben G, Klüttgen BS, Gibson N, Putaud J-P, Stamm H. Considerations on a Definition of Nanomaterial for Regulatory Purposes. JRC Reference Report, 2010. Available from https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/jrc_reference_report_201007_nanomaterials.pdf.
2. Linsinger T, Roebben G, Gilliland D, Calzolai L, Gibson N, Klein C. Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term “nanomaterial”. JRC Reference Report, 2012. Available from https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/irmm_nanomaterials_%28online%29.pdf.
3. Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part I): products on the market. *Int J Nanomed.* 2014;9:4357-73.
4. Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(5):442-53.
5. Wong HL, Wu XY, Bendayan R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(7):686-700.
6. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Technical Report. U.S. Department of Health and Human Services, 2014. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM401695.pdf>.
7. European Technology Platform on NanoMedicine – Nanotechnology for Health. Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for NanoMedicine. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2005.
8. Ragelle H, Danhier F, Preat Veronique, Langer R, Anderson DG. Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017; 14(7):851-64.
9. Wagner W, Husing B, Gaisser S, Bock A. Nanomedicine: drives for development and possible impact, Center ECJR, Studies IfPT, European Commision Joint Research Centre, Institute for Prospective Technological Studies, 2006.
10. Hafner A, Lovrić J, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomed.* 2014;9:1005-23.

11. Savić S, Gluščević I, Milić J, Vuleta G. Nanodisperzni sistemi kao nosači lekovitih supstanci. Arh farm 2005;55:437-54.
12. Alhareth K, Sancey L, Tsapis N, Mignet N. How should we plan the future of nanomedicine for cancer diagnosis and Therapy? *Int J Pharm.* 2017; doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.037.
13. Caster JM, Patel AN, Zhang T, Wang A. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2017;9:e1416.
14. Agrahari V, Hiremath P. Challenges associated and approaches for successful translation of nanomedicines into commercial products. *Nanomedicine (Lond.)*; 2017;12(8):819-23.
15. Hassan S, Prakash G, Ozturk AB, Saghazadeh S, Sohail MF, Seo J, Dokmeci MR, Zhang YS, Khademhosseini A. Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials. *Nano Today*; 2017;15:91-106.
16. Kaur IP, Kakkar V, Deol PK, Yadav M, Singh M, Sharma I. Issues and concerns in nanotech product development and its commercialization. *J Control Release.* 2014;193:51-62 .
17. Sainz V, Connio J, Matos AI, Peres C, Zupančić E, Moura L, Silva LC, Florindo HF, Gaspar RS. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468:504-10.
18. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioeng Transl Med.* 2016;1(1): 10-29.
19. Milić J, Petrović S.D. Karakteristike savremenih farmaceutskih oblika. *Hem ind* 2003;57(10):424-36.
20. Jores K. Lipid Nanodispersions as Drug Carrier Systems – a Physicochemical Characterization (dissertation). Matematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle, 2004.
21. Cukierman E, Khan DR. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2010;80:762-70.
22. Junghanns J-U, Müller R. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine.* 2008;3:295-309.
23. Keck CM, Kobierski S, Mauludin R, M Müller RH. Novel top-down technologies: effective production of ultra-fine drug nanocrystals. In: Douroumis D, Fahr A, editors. *Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs.* John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, 2013, p. 247-63.
24. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res.* 2016;33(10):2373-87.
25. Souto EB, Nayak AP, Murthy RSR. Lipid Nanoemulsions for Anti-Cancer Drug Therapy. *Pharmazie* 2011; 66(7):473-8.
26. Hall J.B, Dobrovolskaia M.A, Patri A.K, McNeil S.E. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine* 2007; 2(6):789-803.
27. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine* 2012;8(2):147-66.
28. Pepić I, Kaić N, Filipović-Grčić J. Nanočestice kao terapijski sustavi za primjenu lijeka u oku. *Farmaceutski glasnik* 2011; 67(2):73-86.

29. Christoforidis J.B, Chang S, Jiang A, Wang J, Cebulla C.M. Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation. *Mediators Inflamm* 2012; 2012:126463.
30. Mishra B, Patel BB, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine* 2010;6:9-24.
31. Gaspar R, Duncan R. Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:1220–1231.
32. Duncan R. Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22(4):492-501.
33. Lee J, Nan A. Combination drug delivery approaches in metastatic breast cancer. *J Drug Deliv.* 2012; article ID 915375, doi: 10.1155/2012/915375.
34. Xu Y, Yuen PW, Lam JK. Intranasal DNA vaccine for protection against respiratory infectious diseases: the delivery perspectives. *Pharmaceutics.* 2014;6(3):378-415.
35. Đekić Lj. Nanomaterijali u farmaceutskim preparatima: karakteristike i primena (specijalistički rad). Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2013.
36. Gabizon A. Liposomal drugg carriers in cancer therapy. In: Torchilin VP, editor. *Nanoparticulates as drug carriers.* Imperial college Press, London, 2006, p. 436-62.
37. Miele E, Spinelli GP, Miele E, Tomao F, Tomao S. Albumin-Bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int J Nanomedicine*, 2009;4:99-105.
38. Lee S-W, Yun M-H, Jeong SW, In C-H, Kim J-Y, Seo M-H, Pai C-M, Kim S-O. Development of docetaxel-loaded intravenous formulation, Nanoxel-PM™ using polymer-based delivery system. *J Control Release.* 2011;155(2):262-71.
39. Werner ME, Cummings ND, Sethi MS, Wang EC, Sukumar R, Moore DT, Wang AZ. Preclinical evaluation of Genexol-PM, a nanoparticle formulation of paclitaxel, as a novel radiosensitizer for the treatment of non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;86(3):463-8.
40. Ranade AA, Joshi DA, Phadke GK, Patil PP, Kasbeker RB, Apte TG, Dasare RR, Mengde SD, Parikh PM, Bhattacharyya GS, Lopes GL. Clinical and economic implications of the use of nanoparticle paclitaxel (Nanoxel) in India. *Ann Oncol.* 2013;24(suppl5):v6-v12.
41. Patil PA, Bhutkar BR. Biomedical application of nanoemulsion – a features review. *IJRM Human.* 2016; 1(3):37-58.
42. Cerpnjak K, Zvonar A, Gasperlin M, Vrečer F. Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Acta Pharm.* 2013;63:427-45.
43. Narang AS, Delmarre D, Gao D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *Int J Pharm.* 2007;354(1-2):9-25.
44. Ling H, Luoma JT, Hilleman D. A review of currently available fenofibrate and fenofibric acid formulations. *Cardiol Res.* 2013;4(2):47-55.
45. Borchard G, Flühmann B, Mühlbach S. Nanoparticle iron medicinal products – Requirements for approval of *intended copies* of non-biological complex drugs (NBCD) and the importance of clinical comparative studies. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;64(2):324-8.

46. Min Y, Caster JM, Eblan MJ, Wang AZ. Clinical translation of nanomedicine. *Chem Rev.* 2015;115(19):11147-90.
47. BCC Research, Nanotechnology in medical applications: the global market. BCC Research LLC; 2015.
48. Desai N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *AAPS J.* 2012; 14(2): 282-95.
49. Bawa R, Barenholz Y, Owen A. The Challenge of Regulating Nanomedicine: Key Issues. In: Braddock M, editor. *Nanomedicines Design, Delivery and Detection*. The Royal Society of Chemistry, 2016, p. 290-314.
50. De Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine.* 2008; 3(2):133-49.
51. Oberdorster O, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology.* 2007;1:2-25.
52. Vega-Villa KR, Takemoto JK, Yanez JA, Remsberg CM, Forrest M L, Davies N M. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv Drug Delivery Rev.* 2008;60:229-38.
53. Su H, Wang Y, Gu Y, Bowman L, Zhao J, Ding M. Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. *J Appl Toxicol.* 2018;38:3-24.
54. IPRF Nanomedicines Working Group Mandate, International Pharmaceutical Regulators Forum, 2017. Available from: <https://www.i-p-r-f.org/index.php/en/>.

Nanopharmaceuticals – characteristics of importance for pharmaceutical practice

**Bubić Pajić Nataša^{1*}, Gatarić Biljana¹, Čivčija Jelena²,
Vuleta Gordana³**

¹ University of Banja Luka, Faculty of Medicine – Pharmacy Department, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Save Mrkalja 14, Banja Luka

² Paracelsus Apotheke, Schillerstraße 35, Schönebeck (Elbe), Germany

³ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

* Correspondence: natasa.bubic.pajic@med.unibl.org

Summary

In the field of pharmaceutical technology, nanopharmaceutical preparations/nanopharmaceuticals are currently the most studied and most promising topic. By using nanomaterials as drug delivery carriers, the pharmacological properties of drugs can be improved by changing their pharmacokinetic properties and distribution in the biological environment. This approach is particularly useful in delivery of chemotherapeutic agents into tumor tissues. Due to their characteristics, nanopharmaceuticals have many advantages over preparations used in conventional chemotherapy. The greatest advantage is the targeted drug delivery to tumor tissues, resulting in reduced systemic toxicity, which is the most prominent disadvantage of conventional chemotherapy. Among various types of nanocarriers, the most attention was drawn to liposomes and micelles, which represent the most successful and commercialized categories within the field of nanomedicine. Several nanotherapeutics, which contain active substances belonging to different pharmacotherapeutical groups (e.g. chemotherapeutical agents, anesthetics, antibiotics, sedatives, etc.), have already entered clinical practice, mainly in following dosage forms: powder for solution for infusion, suspension for injection and emulsion for injection. On the other hand, there is a greater number of drugs undergoing clinical investigation for a variety of indications. However, regulatory agencies have so far failed to provide concrete information on tests for nanopharmaceuticals characterization and quality control, as well as for other practical issues, such as safety, needed in the process of development and registration of nanopharmaceuticals, which complicates/defers the emergence of a larger number of new licensed nanopharmaceutical preparations.

Keywords: nanopharmaceutical preparations/nanopharmaceuticals, liposomes, nanocrystals, nanoparticles, micelles, nanocomplexes, safety
