

Toksikologija

Toxicology

SADRŽAJ - CONTENTS

TOKS-P1

PROCENA TOKSIKOLOŠKE BEZBEDNOSTI ANALIZIRANIH DEČJIH IGRAČAKA NA TRŽIŠTU SRBIJE

TOXICOLOGICAL SAFETY ASSESSMENT OF ANALYZED TOYS ON SERBIAN MARKET

- **Marija Stanković, Marija Đorđević, Ana Stanisavljev** 431

TOKS-P2

PRIMENA PROAST SOFTVERA U PROCENI REAKTIVACIONOG POTENCIJALA NOVOSINTETISANIH ANTIDOTA K203 I K027 KOD AKUTNOG TROVANJA DIHLORVOSOM

REACTIVATING POTENCY EVALUATION OF NEWLY SYNTHESIZED ANTIDOTES K203 AND K027 IN ACUTE DICHLORVOS POISONING BY PROAST SOFTWARE

- **Evica Antonijević, Kamil Musilek, Kamil Kuča, Danijela Đukić-Ćosić, Marijana Ćurčić, Milena Anđelković, Biljana Antonijević** 433

TOKS-P3

EFIKASNOST BIOHEMIJSKIH I pH TEST TRAKA U OTKRIVANJU MANIPULACIJE URINOM TOKOM TESTIRANJA NA PSIHOAKTIVNE SUPSTANCE

EFFICIENCY OF BIOCHEMICAL AND pH TEST STRIPS IN IDENTIFYING OF MANIPULATION IN DRUG URINE ANALYSIS

- **Dragana Javorac, Ivana Rajšić, Simona Tatović, Katarina Baralić, Danijela Đukić-Ćosić, Zorica Bulat** 435

TOKS-P4

SOFTVERI ZA PROCENU TOKSIČNOSTI NEČISTOĆA U LEKOVIMA: DEREK NEXUS I OECD QSAR TOOLBOX

COMPUTATIONAL METHODS FOR TOXICITY ASSESSMENT OF PHARMACEUTICAL IMPURITIES: DEREK NEXUS AND OECD QSAR TOOLBOX

- **Katarina Baralić, Dragana Javorac, Zorica Bulat, Danijela Đukić-Ćosić, Marijana Ćurčić, Evica Antonijević, Biljana Antonijević** 437

TOKS-P5

PROCENA PREVALENCE NOVIH PSIHOAKTIVNIH SUPSTANCI: PROBLEMI I POTENCIJALNA REŠENJA

ESTIMATION OF NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCES PREVALENCE: PROBLEMS AND POTENTIAL SOLUTIONS

- **Ivana Rajšić, Nataša Milošević, Zorica Bulat** **439**

TOKS-P6

PRIMENA MULTIPLE FAKTORSKE REGRESIJE U PROCENI INTERAKCIJA KADMIJUMA I BDE-209 NA NIVOU HORMONA ŠTITNE ŽLEZDE

MULTIPLE FACTORIAL REGRESSION IN THE ASSESSMENT OF CADMIUM AND BDE-209 INTERACTIONS ON THYROID HORMONE LEVELS

- **Marijana Ćurčić, Saša Janković, Aleksandra Buha, Slavica Vučinić, Zorica Bulat, Biljana Antonijević** **441**

TOKS-P7

KOMPARATIVNA TOKSIKOGENOMIČKA BAZA PODATAKA: ANALIZA POVEZANOSTI HEMIKALIJA/GEN/BOLEST

TOXICOGENOMIC DATA MINING: THE COMPARATIVE TOXICOGENOMICS DATABASE

- **Katarina Baralić, Dragica Jorgovanović, Biljana Antonijević, Evica Antonijević, Marijana Ćurčić, Danijela Đukić-Ćosić** **443**

TOKS-P8

TOKSIKOGENOMIČKI METOD ISPITIVANJA VEZE ŽIVA-GEN-RAZVOJ BOLESTI

MERCURY-GENE-DISEASE ASSOCIATIONS: TOXICOGENOMICS DATA MINING APPROACH

- **Katarina Baralić, Dragica Jorgovanović, Marijana Ćurčić, Evica Antonijević, Katarina Živančević, Biljana Antonijević, Danijela Đukić-Ćosić** **445**

TOKS-P9

**ODREĐIVANJE TEBAINA I METABOLITA U POSTMORTEM BIOLOŠKIM
TEČNOSTIMA: PRIKAZ SLUČAJA**

**DETERMINATION OF THEBAINE AND METABOLITES IN POSTMORTEM
BIOLOGICAL FLUIDS: CASE REPORT**

- Gordana Brajković, Jasmina Jović Stošić,
Snežana Đorđević, Vesna Kilibarda, Tanja Stevović,
Zorica Brajković, Slavica Vučinić

447

TOKS-P10

**INTERAKCIJE IZMEĐU MAGNEZIJUMA I TOKSIČNIH METALA (KADMIJUMA I
OLOVA) NA NIVOU GENA – ANALIZA TOKSIKOGENOMIČKIH PODATAKA**

**INTERACTIONS BETWEEN MAGNESIUM AND TOXIC METALS (CADMIUM
AND LEAD) ON THE GENE LEVEL – TOXICOGENOMICS DATA MINING**

- Dragica Jorgovanović, Katarina Baralić,
Milena Anđelković, Zorica Bulat,
Vesna Matović, Danijela Đukić-Čosić

449

TOKS-P11

**TOKSIKOGENOMIČKA ANALIZA UTICAJA RAZLIČITIH JEDINJENJA
MAGNEZIJUMA NA GENE**

**TOXICOGENOMIC ANALYSES OF DIFFERENT MAGNESIUM COMPOUNDS
EFFECTS ON GENES**

- Dragica Jorgovanović, Katarina Baralić,
Zorica Bulat, Aleksandra Buha Đorđević,
Vesna Matović, Danijela Đukić-Čosić

451

TOKS-P12

**UTICAJ TERAPIJSKE PRIMENE LEKOVA NA POUZDANOST DOKAZIVANJA
AMFETAMINA KOMERCIJALNIM TEST TRAKAMA**

**THE IMPACT OF THERAPEUTIC USE OF DRUGS ON THE RELIABILITY OF
AMPHETAMINE COMMERCIAL TEST STRIPS**

- Marija Brković, Katarina Baralić, Dragana Javorac,
Marijana Čurčić, Evica Antonijević, Zorica Bulat,
Danijela Đukić-Čosić

453

TOKS-P13

**UTICAJ OTC PREPARATA NA BAZI IBUPROFENA I PSEUDOEFEDRINA NA
POUZDANOST PRELIMINARNE ANALIZE ZLOUPOTREBE PSIHOAKTIVNIH
SUPSTANCI**

**EFFECT OF OTC PREPARATIONS WITH IBUPROFEN AND
PSEUDOEPHEDRINE ON THE RELIABILITY OF THE PRELIMINARY ANALYSIS
OF PSYCHOACTIVE SUBSTANCES ABUSE**

- **Milica Marković, Katarina Baralić,
Vera Lukić, Zorica Bulat, Evica Antonijević,
Marijana Ćurčić, Danijela Đukić-Ćosić**

455

TOKS-P14

**UTICAJ RAZLIČITIH FARMACEUTSKIH OBLIKA OTC PREPARATA SA
PSEUDOEFEDRINOM NA POJAVU LAŽNO POZITVNIH REZULTATA
KOMERCIJALNIH TEST TRAKA NA AMFETAMIN**

**EFFECT OF DIFFERENT PHARMACEUTICAL FORMS OF OTC WITH
PSEUDOEPHEDRINE ON POSITIVE RESULTS ON COMMERCIAL TEST PANELS
FOR AMPHETAMINE**

- **Milica Pavlović, Filip Dimitrijević, Katarina Baralić,
Marijana Ćurčić, Zorica Bulat, Evica Antonijević,
Danijela Đukić-Ćosić**

457

TOKS-P15

**ČAJ OD KANTARIONA (*HYPERICUM PERFORATUM* L.) KAO IZVOR
IZLOŽENOSTI KADMIJUMU**

**ST JOHN'S WORT (*HYPERICUM PERFORATUM* L.) TEA AS A SOURCE OF
EXPOSURE TO CADMIUM**

- **Milica Vasilov, Vladimir Berta, Sergej Jakimenko,
Aleksandra Repić, Marijana Ćurčić, Zorica Bulat,
Danijela Đukić-Ćosić**

459

PROCENA TOKSIKOLOŠKE BEZBEDNOSTI ANALIZIRANIH DEČIJIH IGRAČAKA NA TRŽIŠTU SRBIJE

Marija Stanković, Marija Đorđević, Ana Stanisavljev

Gradski zavod za javno zdravlje, Beograd (Srbija)

Rad obuhvata analizu bezbednosti dečijih igračaka u zavisnosti od vrste materijala na sadržaj metala i metaloida i ftalata, kao i migraciju moguće prisutnih toksičnih materija (metala i metaloida, primarnih i sekundarnih aromatičnih amina, formaldehida i policikličnih aromatičnihugljovodonika) u skladu sa zahtevima standarda SRPS EN 71-3:2017 i SRPS EN71-9:2009, važećim Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti predmeta opšte upotrebe i Pravilnikom o ograničenjima i zabranama proizvodnje, stavljanja u promet i korišćenja hemikalija.

Sadržaj metala i metaloida u igračkama od elastomera, višeslojnog kartona, masa za crtanje i oblikovanje određuje se tehnikom ICP-OES. Istom tehnikom se određuju metali i metaloidi iz odgovarajućih migracionih rastvora u koje su delovi igračke potopljene: dejonizovane vode, pljuvačke, 3% sirćetne kiseline i prema standardu SRPS EN71-3: 2017: rastvoru 0,07M HCl i 0,14M HCl. Migracija formaldehida u igračkama od tekstila, celuloze, drveta i elastomera određuje se spektrofotometrijski u migracionom rastvoru dejonizovane vode ili 3% sirćetne kiseline u koje je igračka potopljena u zavisnosti od tipa uzorka i primenjenog standarda. Sadržaj ftalata u polimernim delovima igračaka se određuje tehnikom GC-MS. Migracija primarnih i sekundarnih aromatičnih amina i policikličnih aromatičnih ugljovodonika se određuje se iz migracionog rastvora dejonizovane vode koji je migracioni rastvor izbora prema standardu SRPS EN 71-10:2015 tehnikom GC-MS.

Među 200 analiziranih uzoraka dečijih igračaka u poslednjih 15 meseci ustanovljeno je da je 4% bilo neispravno zbog povećane migracije olova, nikla ili barijuma, 12% zbog povećanog sadržaja ftalata i 3% zbog povećane migracije formaldehida u igračkama od celuloze i tekstila.

Naša laboratorijska praksa je pokazala da je najveći broj uzoraka igračaka bio neispravan zbog povećanog sadržaja ftalata i da najveći problem za proizvođače igračaka predstavlja poreklo plastike. Ipak, najveći broj analiziranih uzoraka igračaka, prema parametrima koji se određuju u zavisnosti od vrste materijala od kojih su napravljene, zadovoljio je postavljene kriterijume bezbednosti zadate važećim nacionalnim standardima i pravilnicima.

TOXICOLOGICAL SAFETY ASSESSMENT OF ANALYZED TOYS ON SERBIAN MARKET

Marija Stanković, Marija Đorđević, Ana Stanisavljev

Institute of Public Health, Belgrade (Serbia)

This paper deals with toys safety regarding the content of metals and metalloids and phthalates and migration of possibly present toxic materials (metals and metalloids, primary and secondary aromatic amines, formaldehyde, and polycyclic aromatic carbohydrates) in conformity with standards SRPS EN 71-3:2017, SRPS EN71-9:2009, National general product safety regulation and Regulations of limiting and banning production, placing on market, and using of chemicals.

Content of metals and metalloids in toys made of elastomers, multilayer cardboard, drawing masses and moldings is determined by the ICP-OES technique. The same technique is used to determine metals and metalloids from migration solutions in which toys are immersed: deionized water, saliva, 3% acetic acid and according to the standard SRPS EN 71-3: 2017: solution of 0.07M HCl and 0.14M HCl. Migration of formaldehyde in toys made of textile, cellulose, wood and elastomers is determined by spectrophotometry in the migration solution of deionized water or 3% acetic acid in which the toy is immersed, depending on the kind of the sample and the applied standard. The content of phthalates in polymer toy parts is determined by the GC-MS technique. Migration of primary and secondary aromatic amines and polycyclic aromatic carbohydrates is determined from migration solution of deionized water, which is the solution of choice according to the standard SRPS EN 71-10:2015, by the GC-MS technique.

Among 200 analyzed toy samples during the last 15 months, it has been established that 4% did not comply due to increased migration of lead, nickel or barium, 12% due to increased content of phthalates, and 3% due to increased migration of formaldehyde.

Our laboratory practice showed that majority of toys samples that failed toxicological safety assessment had increased content of phthalates. However, most of the analyzed toy samples conformed to required safety criteria defined by national standards and regulations.

PRIMENA PROAST SOFTVERA U PROCENI REAKTIVACIONOG POTENCIJALA NOVOSINTETISANIH ANTIDOTA K203 I K027 KOD AKUTNOG TROVANJA DIHLORVOSOM

**Evica Antonijević¹, Kamil Musilek², Kamil Kuča², Danijela Đukić-Ćosić¹,
Marijana Ćurčić¹, Milena Anđelković¹, Biljana Antonijević¹**

¹Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet (Srbija), ²Univerzitet Hradec Kralove, Fakultet za nauku, Katedra za hemiju (Češka)

U terapiji akutnog trovanja organofosfornim pesticidima i nervnim bojnim otrovima, piridinjumski oksimi, kao reaktivatori inhibirane acetilholinesteraze (AChE), predstavljaju još uvek jedine kauzalne antidote. U poslednjoj dekadi eksperimentalnih istraživanja u ovoj oblasti, obećavajuće *in vitro* i *in vivo* rezultate dali su novosintetisani oksimi K203 i K027. Međutim, prema našim saznanjima, do sada nije kvantitativno ispitana *in vivo* dozna zavisnost efekta oksima, koja bi omogućila preciznije sagledavanje mehanizma dejstva i poređenje njihove efikasnosti. Stoga je u ovom istraživanju ispitana dozna zavisnost efekta reaktivacije AChE oksimima K203 i K027 *Benchmark* metodologijom za kvantitativnu analizu doza-efekat odnosa, kod pacova akutno trovanih dihlorvosom (DDVP).

Mušjaci *Wistar* pacova (5/grupi) tretirani su oksimom (0/1,25/2,5/5/25/50% LD₅₀, *i.m*) i atropinom (10 mg/kg, *i.m*), neposredno nakon tretmana DDVP-om (75% LD₅₀, *s.c*). Aktivnost eritrocitne AChE je određena *Ellman*-ovom metodom 60 minuta nakon tretmana. *Benchmark* analiza odnosa doza-efekat urađena je u PROAST softveru ver.65.5 (RIVM, Holandija).

Dozno zavisni trend povećanja aktivnosti AChE bio je opisan eksponencijalnim modelom ($y=a[c-(c-1)\exp(-bx^d)]$) sa sledećim vrednostima karakterističnih parametara: $a=0,795$, $b_{K203+A}=0,00047$, $b_{K027+A}=0,0011$, $c=2,724$ i $d=1,536$. Značajna razlika u parametru b pokazuje da je kriva doza-efekat za oksim K203 pomerena udesno u odnosu na krivu oksima K027, ukazujući na razliku u potentnosti oksima u reaktivaciji enzima. Izračunate *Benchmark* doze (BMD) pri kojima oksimi dovode do 100% povećanja efekta (izraženo kao % aktivnosti enzima grupe tretirane samo DDVP-om) su iznosile $BMD_{100-K203+A}=133$ i $BMD_{100-K027+A}=77$ $\mu\text{mol/kg}$, pokazujući da se ista veličina efekta postiže za oko 1,7-puta nižom dozom oksima K027. Kvantitativna *Benchmark* analiza ukazala je na prednost eksperimentalnog oksima K027 u odnosu na oksim K203 zbog mogućnosti primene nižih doza, čineći ga eksperimentalnim oksimom vrednim daljih ispitivanja.

Projekat III46009 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

REACTIVATING POTENCY EVALUATION OF NEWLY SYNTHESIZED ANTIDOTES K203 AND K027 IN ACUTE DICHLORVOS POISONING BY PROAST SOFTWARE

**Evica Antonijević¹, Kamil Musilek², Kamil Kuča², Danijela Đukić-Čosić¹,
Marijana Ćurčić¹, Milena Anđelković¹, Biljana Antonijević¹**

¹Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy (Serbia), ²University of Hradec Kralove, Faculty of Science, Department of Chemistry (Czechia)

In the therapy of acute poisoning with organophosphorus pesticides and nerve agents, pyridinium oximes, as reactivators of inhibited acetylcholinesterase (AChE), are still the only causal antidotes. In the last decade of experimental research in this field, promising *in vitro* and *in vivo* results gave newly synthesized oximes K203 and K027. However, according to our best knowledge, so far they have not been quantitatively evaluated, which would enable a more accurate understanding of the mechanism of action and efficacies comparison. Therefore, in this study, reactivating effect of oxime K203 and K027 was examined by Benchmark methodology for quantitative dose-response analysis in rats acutely exposed to dichlorvos (DDVP).

Male *Wistar* rats (5/group) were treated with oxime (0/1.25/2.5/5/25/50% LD₅₀, *im*) and atropine (10 mg/kg *im*) immediately after DDVP challenge (75% LD₅₀, *sc*). Erythrocyte AChE activity was determined by Ellman's method 60 min after treatment. The Benchmark analysis was done by PROAST software ver.65.5 (RIVM, Netherlands). Dose-response modeling resulted in the exponential curve ($y=a[c-(c-1)\exp(-bxd)]$) with parameters: $a=0,795$, $b_{K203+A}=0,00047$, $b_{K027+A}=0.0011$, $c=2.724$ and $d=1.536$. Significant difference in parameter b , showing the right-shifted position of the K203 curve compared to K027, has indicated the difference in the potency of two oximes in reactivation of an enzyme. Estimated Benchmark dose (BMD) for 100% effect size (%-change in enzyme activity relative to DDVP-treated group) were $BMD_{100-K203+A}=133$ and $BMD_{100-K027+A}=77 \mu\text{mol/kg}$, showing that the same effect size is reached by 1.7 times lower dose of oxime K027.

The quantitative Benchmark analysis indicated the advantage of the experimental oxime K027 compared to oxime K203 because of the possibility of lower doses usage, making it worthy of further testing.

Project III46009 Ministry of Education, Science and Technological Development, Serbia.

EFIKASNOST BIOHEMIJSKIH I pH TEST TRAKA U OTKRIVANJU MANIPULACIJE URINOM TOKOM TESTIRANJA NA PSIHOAKTIVNE SUPSTANCE

**Dragana Javorac¹, Ivana Rajšić², Simona Tatović¹, Katarina Baralić¹,
Danijela Đukić-Ćosić¹, Zorica Bulat¹**

¹Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, ²Ministarstvo unutrašnjih poslova Republike Srbije, Direkcija policije, Uprava kriminalističke policije, Nacionalni kriminalističko-tehnički centar (Srbija)

Zloupotreba psihoaktivnih supstanci predstavlja jedan od najznačajnijih problema javnog zdravlja. Konzumiranje psihoaktivnih supstanci se može lako potvrditi imunohromatografskim test trakama za analizu urina. Iako brz i jednostavan, ovakav vid skrininga je podložan raznim manipulacijama od strane ispitanika, kao što je dodatak adulteransa (npr. kućnih hemikalija), tokom procesa sakupljanja urina. Kako specifične test trake za detekciju adulteranasa nisu prisutne na našem tržištu, ispitali smo efikasnost upotrebe biohemijskih i pH test traka za istu namenu.

Pretragom literature, a na osnovu njihove sposobnosti da utiču na rezultate detekcije psihoaktivnih supstanci, izdvojene su sledeće hemikalije: sok od limuna, limunska kiselina, alkoholno sirće, Asepsol, Cevtok, WC Sanitar, Varikina i Primosept GA. Pre i posle dodatka adulteranasa svaki uzorak urina je testiran pomoću pH traka (pH-Fix; MACHEREY-NAGEL) i biohemijskih test traka za semi-kvantitativno određivanje: leukocita, ketona, nitrita, urobilinogena, bilirubina, proteina, glukoze, specifične težine, krvi i askorbinske kiseline (URIT 11G; MedicalElectronicCo Ltd, China).

Dodatak Cevtoka urinu doveo je do nevažećeg rezultata u slučaju 5 od ukupno 10 ispitivanih biohemijskih parametara. Asepsol je doveo do nevažećeg rezultata prilikom očitavanja prisustva krvi, a WC sanitar za vrednosti proteina u urinu. Dodatak Varikine doveo je do detektovanja prisustva krvi u urinu, a dodatak Primosepta GA do visokih vrednosti ketona. Sledeće hemikalije su dovele do promene fiziološkog pH: limunska kiselina i WC Sanitar (pH 1), sok od limuna (pH3) i Cevtok (pH14). Jedino dodatak alkoholnog sirćeta nije doveo do promene fizioloških parametara urina, što ukazuje da može proći neopaženo tokom kontrole integriteta uzorka.

Upotreba biohemijskih i pH test traka predstavlja brz, jeftin i efikasan metod za detekciju manipulacije urina. U slučaju da rezultati dobijeni ovim trakama ukazuju na manipulaciju ili kontaminaciju urina, potrebno je izvršiti dodatne analize konfirmativnim metodama, ili eventualno ponoviti analizu iz novog uzorka.

EFFICIENCY OF BIOCHEMICAL AND pH TEST STRIPS IN IDENTIFYING OF MANIPULATION IN DRUG URINE ANALYSIS

**Dragana Javorac¹, Ivana Rajšić², Simona Tatović¹, Katarina Baralić¹,
Danijela Đukić-Ćosić¹, Zorica Bulat¹**

¹Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, ²Ministry of Interior of the Republic of Serbia, Police Directorate, Criminalistic Police Department, National Forensic Center (Serbia)

Drug abuse is one of the most important public health problems. Nowadays, urine analysis by immunochromatographic test strips can easily confirm drug consumption. Although quick and easy, these analyses are extremely susceptible to adulterants such as household chemicals, which can be added during the urine collection procedure. Due to the lack of the specific urine adulterants test strips in the market of Serbia, we investigated efficiency of biochemical test strips and pH test strips for the same purpose.

Based on literature search for their efficacy to change results of drug screening analysis, the following household chemicals were selected: lemon juice, citric acid, alcoholic vinegar, Asepsol, Cevtok, WC Sanitar, Varikina and Primosept GA. Before and after adulteration, urine samples were checked by test strips for semi-quantitative measurement of: leukocytes, ketone, nitrite, urobilinogen, bilirubin, protein, glucose, specific gravity, blood and ascorbic acid (URIT 11G; Medical Electronic Co Ltd, China), as well as pH test strips (pH-Fix; MACHEREY-NAGEL).

Addition of Cevtok caused malfunction five of ten investigated biochemical parameters. Also, Asepsol and WC Sanitar produced malfunction of blood and protein measurement respectively. Varikina gave high blood levels, while Primosept GA caused high levels of ketones. Indicative changes in urine pH value was induced by following chemicals: WC Sanitar and citric acid (pH 1), lemon juice (pH 3), and Cevtok (pH 14). Only in case of alcoholic vinegar, known as potent adulterant, physiological properties of urine were not changed, so it could pass specimen validity test and pass unnoticed.

Biochemical test strips and pH test strips proved to be quick, cost-effective, and efficient test for the detection of the most adulterated samples. If the results of these analyses suggest that the sample has been manipulated, altered or otherwise contaminated, sample should be analyzed by confirmative analytical methods, or a new sample should be obtained for further testing.

SOFTVERI ZA PROCENU TOKSIČNOSTI NEČISTOĆA U LEKOVIMA: DEREK NEXUS I OECD QSAR TOOLBOX

**Katarina Baralić, Dragana Javorac, Zorica Bulat, Danijela Đukić-Ćosić,
Marijana Ćurčić, Evica Antonijević, Biljana Antonijević**

Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”, Univerzitet u Beogradu
- Farmaceutski fakultet (Srbija)

Imajući u vidu da je kontrola kvaliteta lekova podjednako značajna kao i ispitivanje njihove efikasnosti, Internacionalna konferencija za harmonizaciju (ICH) donela je veliki broj smernica za ispitivanje nečistoća u lekovima, uključujući i genotoksične nečistoće. Degradacioni proizvodi/nečistoće obično su prisutni u maloj količini, te ih je teško izolovati i kvantifikovati, a podaci o njihovoj bezbednosti često su nedovoljno ispitani. Nedavni razvoj *in silico* metoda omogućio je relativno brz način za procenu toksičnosti, što je korisno kada su konvencionalni podaci o toksičnosti ograničeni ili nedostaju.

Derek Nexus i *OECD QSAR Toolbox*, softveri namenjeni za upotrebu od strane vlade, hemijske industrije i drugih interesnih grupa, predstavljaju alate u koje su ugrađeni kvantitativni modeli odnosa struktura i aktivnosti (QSAR). Ovi modeli služe za predviđanje toksičnosti hemikalija na osnovu hemijske strukture. *Derek Nexus* je komercijalan softver zasnovan na ekspertskom saznanju. Nakon unosa ispitivane hemikalije, ovaj softver prikazuje „strukturne alerte” (upozorenja kategorizovana na osnovu vrste toksičnog efekta). Takođe, daje podatke o toksičnosti za sve strukturne analoge, grafička objašnjenja mehanizama toksičnosti i pregled literature, što zajedno doprinosi predviđanju toksičnosti.

OECD QSAR Toolbox je besplatan softver zasnovan na pristupu grupisanja hemikalija u kategorije na osnovu hemijske strukture. Sadrži *in silico* modele, kao što su *read-across* (prikladan za kvalitativna predviđanja), *trend analysis* (prikladan za kvantitativna predviđanja) i „*QSARmodels*” (koristi se kada ne postoje adekvatni analozi za ciljanu hemikaliju). Treba imati na umu da je pristup zasnovan na formiranju kategorija subjektivan i zavisi od brojnih faktora, kao što su definisanje kategorije i broj jedinjenja koji kategorija sadrži.

Rezultati dobijeni *Derek Nexus* i *OECD QSAR Toolbox* softverima mogu se koristiti za prevazilaženje ograničenja prilikom procene toksičnosti nečistoća u lekovima i služiti kao osnova za dalja ispitivanja, sa ciljem smanjenja potrošnje resursa i broja eksperimentalnih životinja.

COMPUTATIONAL METHODS FOR TOXICITY ASSESSMENT OF PHARMACEUTICAL IMPURITIES: DEREK NEXUS AND OECD QSAR TOOLBOX

Katarina Baralić, Dragana Javorac, Zorica Bulat, Danijela Đukić-Ćosić, Marijana Ćurčić, Evica Antonijević, Biljana Antonijević

Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade
- Faculty of Pharmacy (Serbia)

Having in mind that drug quality control is equally important as verifying its efficacy, various ICH guidance documents on pharmaceutical impurities were published, including Quality Guidelines on Pharmaceutical Impurities and Guideline on the limits of genotoxic impurities. These impurities, consisting of pharmaceutical contaminants and degradants, are usually present at low levels, making them difficult to isolate and measure. Furthermore, the data about their toxicity are obscure. A recent expansion of *in silico* methods offers a relatively quick way to estimate toxicity, which is useful when conventional toxicology data are limited or lacking.

Derek Nexus and OECD QSAR Toolbox, used by governments, chemical industry, and other stake holders, are tools that provide pre-built quantitative structure–activity relationship (QSAR) models. These models predict chemicals’ toxicity based on the molecular descriptors. Derek Nexus is a commercial knowledge-based expert system. After the input of the investigated chemical, it forms alerts (categorized by the endpoint), examples, and rules, all of which contribute to making a toxicity prediction. It also gives a graphical explanation of the QSAR, mechanistic justification, toxicity data of all the structural analogs and key references.

The OECD QSAR Toolbox is a freely available software application based specifically on the chemical category approach. It contains useful *in silico* models, such as read-across (appropriate for qualitative endpoints), trend analysis (appropriate for quantitative endpoints), and „(Q)SAR models” (used when no adequate analogs could be found for the target chemical). However, chemical category approach is subjective and reliant on a number of factors, such as the definition of the category and number of compounds the category contains.

Results obtained from Derek Nexus and OECD QSAR Toolbox could be useful for surpassing limitations of drug impurities toxicity assessment and serve as a base for further examination, in order to reduce the resources and number of test animals.

PROCENA PREVALENCE NOVIH PSIHOAKTIVNIH SUPSTANCI: PROBLEMI I POTENCIJALNA REŠENJA

Ivana Rajšić¹, Nataša Milošević², Zorica Bulat³

¹Ministarstvo unutrašnjih poslova Republike Srbije, Direkcija policije, Uprava kriminalističke policije, Nacionalni kriminalističko-tehnički centar, ²Katedra za farmaciju, Univerzitet u Novom Sadu - Medicinski fakultet, ³Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet (Srbija)

U poslednjih nekoliko godina pojavio se značajan broj novih psihoaktivnih supstanci (NPAS) što je rezultiralo povećanjem konzumacije, posebno među mlađom populacijom. Životna prevalenca upotrebe NPAS među mlađim osobama (15-24 godine) u Evropskoj uniji je bila 8% u 2014. godini, dok je taj broj 2015. godine iznosio 4% za učenike starosne dobi 15 i 16 godina u 24 evropske zemlje. Uprkos ogromnom naporu, raspoloživi podaci o NPAS zlouporebi u opštoj populaciji su i dalje ograničeni.

Objektivan nadzor nad prevalencom NPAS predstavlja izazov, zato što NPAS ne mogu biti detektovane standardnim skrining metodama za detekciju droga. Dalje, promenom hemijske strukture postojećih NPAS stvaraju se nove supstance, što predstavlja prepreku za efikasno funkcionisanje forenzičkih laboratorija i pravnog sistema. Nemogućnost da se proceni upotreba NPAS pomoću standardnih pokazatelja, kao što su anketiranje opšte populacije, broj hospitalizovanih i primljenih u centre za bolesti zavisnosti, dovodi do nesklada između količine zaplenjenih NPAS i prijavljenog stepena zloupotrebe.

Kako bi se dobili podaci o obrascima upotrebe droga u određenom vremenskom periodu, otpadne vode se ispituju na prisustvo metabolita droga uzimanjem uzoraka iz određenog izvora, poput kanalizacionog sistema. Dobijene vrednosti koncentracija metabolita (ng/l) u kombinaciji sa protokom kanalizacije (l/dan) i veličinom populacije (na 1000 stanovnika), omogućavaju poređenje stepena upotrebe droge (mg/dan/1000 ljudi) između različitih lokacija. Pored analize otpadnih voda, sadržaj iz mobilnih toaleta noćnih klubova kao i muzičkih festivala se takođe može analizirati, što predstavlja jedan od načina procene prevalencije NPAS.

Epidemiologija otpadnih voda je naučna disciplina koja se brzo razvija i koja ima potencijal da proširi postojeće epidemiološke alate, omogućavajući relevantnu procenu upotrebe NPAS koja je zasnovana na dokazima.

ESTIMATION OF NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCES PREVALENCE: PROBLEMS AND POTENTIAL SOLUTIONS

Ivana Rajšić¹, Nataša Milošević², Zorica Bulat³

¹Ministry of Interior of the Republic of Serbia, Police Directorate, Criminalistic Police Department, National Forensic Center, ²Department of Pharmacy, University of Novi Sad - Faculty of Medicine, ³Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy (Serbia)

In the past few years, significant number of new psychoactive substances (NPS) emerged thus leading to elevated consumption, especially in young population. Lifetime prevalence of NPS use amongst younger adults (15-24 years) in European Union was 8% in 2014, while that number was 4% for 15- to 16-year school students in 24 European countries in 2015. Despite the huge effort, the available data on the extent NPS use in general population are still limited.

The objective survey of NPS prevalence is challenged since NPS can not be detected by standard screening methods for drugs detection. Furthermore, alteration in chemical structures of existing NPS, lead to new substances production and create an obstacle for effective forensic laboratories and legal system functioning. Inability to estimate NPS use, throughout standard indicators, such as general population surveys, hospital admissions or enrolment in addiction recovery centers, etc., lead to discrepancies between quantity of seizures and the reported levels of use.

In order to achieve almost real-time data on drug use patterns, wastewater is being analyzed for presence of drug metabolites by sampling a known source of wastewater such as sewage system. Gained concentration of drug metabolites expressed by (ng/L) are combined with the corresponding flow of sewage (L/day) and size of population (per 1000 inhabitants), which can enable drug use rate (mg/day/1000 individuals) comparison between different locations. In addition to sewage wastewater analysis, portable toilets content from nightclubs and music festival can also be analyzed, offering a technique in NPS prevalence assessment.

Waste water-based epidemiology is a rapidly developing scientific discipline which has the potential to broaden the existing epidemiological tools, providing more relevant, evidence-based estimates of NPS use.

PRIMENA MULTIPLE FAKTORSKE REGRESIJE U PROCENI INTERAKCIJA KADMIJUMA I BDE-209 NA NIVOU HORMONA ŠTITNE ŽLEZDE

Marijana Ćurčić¹, Saša Janković², Aleksandra Buha¹, Slavica Vučinić³, Zorica Bulat¹, Biljana Antonijević¹

¹Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, ²Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, ³Nacionalni centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd (Srbija)

Ispitivanje toksičnosti smeša je od interesa za naučnu i stručnu javnost jer realnije oslikava efekte koji su posledica ekspozicije iz životne sredine i može značajno doprineti utvrđivanju toksikološki relevantnih efekata kod ljudi. Cilj ovog ispitivanja je bio da se utvrdi tip interakcija kadmijuma (Cd) i dekabromovanog difeniletra (BDE 209) primenom multiple faktorske regresije na nivo hormona štitne žlezde T3 i T4 kod Wistar pacova.

Životinje mase 200-230 g su bile izloženi 28 dana primenom 9 kombinacija doza Cd (2,5, 7,5 i 15 mg/kg/dan) i BDE-209 (1000, 2000 i 4000 mg /kg/dan). Za utvrđivanje tipa interakcija korišćena je multipla faktorska regresija, uz kodiranje nezavisnih varijabli od -1 do +1. Model se izražava: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \dots$ Y je zavisna promenljiva tj. mereni efekat, X nezavisna varijabla tj. skalirana koncentracija, β_0 je odsečak, β_1 i β_2 su regresioni koeficijenti. $\beta_{12} X_1 X_2$ karakteriše tip interakcije i ukoliko je vrednost pozitivna smatra se sinergizmom, a ukoliko je negativan, radi se o antagonizmu $p < 0,05$ (Statistica 7.0).

Dobijeni su sledeći modeli interakcija Cd i BDE209 za efekat utvrđenog smanjena nivoa hormona štitaste žlezde: T3 (nmol/l) = $1,343 - 0,021 X_1 - 0,030 X_2 + 0,063 X_1 X_2$ ($p < 0,01$) i T4 (nmol/l) = $52,224 - 2,725 X_1 - 1,765 X_2 + 1,960 X_1 X_2$ ($p < 0,05$). Primenjena analiza pokazala je sinergistički tip interakcija Cd i BDE-209 kod efekta na koncentraciju T3 i odsustvo interakcija na nivou hormona T4. Multipla faktorska regresiona analiza može biti korišćena u proceni interakcija binarnih smeša.

Projekat III46009 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

MULTIPLE FACTORIAL REGRESSION IN THE ASSESSMENT OF CADMIUM AND BDE-209 INTERACTIONS ON THYROID HORMONE LEVELS

Marijana Ćurčić¹, Saša Janković², Aleksandra Buha¹, Slavica Vučinić³, Zorica Bulat¹, Biljana Antonijević¹

¹Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, ²Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, ³National Poison Control Center, Military Medical Academy, Belgrade (Serbia)

Mixture toxicity assessment is of scientific and professional importance since it reflects more realistically effects that are consequence of environmental exposure. Furthermore, it can contribute to identification of toxicologically relevant effects in humans. The objective of this study was to determine the type of interactions between Cd and BDE-209 using multiple factorial regression analysis on thyroid hormone levels, T4 and T3, in Wistar rats.

Animals weighting 200-230 g have been exposed to combination of Cd doses (2.5, 7.5 or 15 mg/kg/day) and BDE-209 doses (1000, 2000 or 4000 mg/kg/day) during 28 days. Multiple factorial regression analysis was used to determine the type of interaction and independent variables were coded from -1 to +1. Model was expressed as $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_{12}X_1X_2 + \dots$ where Y is dependent variable i.e. effect, X is independent variable i.e. scaled concentration, β_0 is intercept, β_1 and β_2 are regression coefficients. $\beta_{12}X_1X_2$ characterize the type of interaction, positive value suggest synergism, negative suggests antagonism $p < 0.05$ (Statistica 7.0).

Following models of Cd and BDE-209 interactions were derived for the determined T3 and T4 decrease: $T3 \text{ (nmol/l)} = 1.343 - 0.021 X_1 - 0.030 X_2 + 0.063 X_1 X_2$ ($p < 0.01$) i $T4 \text{ (nmol/l)} = 52.224 - 2.725 X_1 - 1.765 X_2 + 1.960 X_1 X_2$ ($p < 0.05$). Applied analysis showed synergistic interaction type of Cd and BDE for the effect on T3 concentration and the absence of interaction on T4 level. Multiple factorial regression analysis could be used in the assessment of interaction in binary mixtures.

Project III46009 Ministry of Education, Science and Technological Development, Serbia.

KOMPARATIVNA TOKSIKOGENOMIČKA BAZA PODATAKA: ANALIZA POVEZANOSTI HEMIKALIJA/GEN/BOLEST

**Katarina Baralić, Dragica Jorgovanović, Biljana Antonijević,
Evica Antonijević, Marijana Ćurčić, Danijela Đukić-Ćosić**

Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”, Univerzitet u Beogradu
- Farmaceutski fakultet (Srbija)

Toksikogenomika predstavlja integraciju „-omičnih” tehnologija (metoda merenja familija ćelijskih molekula), bioinformatike i toksikologije. Ova nauka kombinuje podatke o genima, proteinima i bolestima ljudi sa konvencionalnom toksikologijom, sa ciljem ispitivanja interakcije između gena i bolesti. Takođe obezbeđuje strategije za procenu bezbednosti smeša, dajući uvid u sve interakcije koje mogu biti važne u razmatranju njihove toksičnosti.

The Comparative Toxicogenomics Database (CTD; <http://CTD.mdibl.org>) je javno dostupna baza podataka, konstruisana 2004. godine, koja integriše podatke koji opisuju odnos između hemikalija, gena/proteina i bolesti ljudi. Prema najnovijim informacijama, ova baza sadrži više od 30,5 miliona toksikogenomičkih podataka. CTD koristi zvanične simbole gena i imena iz baze podataka *Entrez-Gene* Nacionalnog centra za biotehnologiju i informatiku (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Što se bolesti tiče, CTD koristi termine preuzete iz dve baze podataka - MeSH (*Medical Subject Headings*) i OMIM (*Online Mendelian Inheritance of Man*). CTD je prvenstveno usmerena ka hemikalijama prisutnim u životnoj sredini i ishodima relevantnim za zdravlje ljudi, ali pruža i podatke iz studija na životinjama ako je u pitanju gen koji je prisutan i kod ljudi.

CTD sadrži 5 korisnih alata za analizu toksikogenomičkih podataka. „*Batch Query*” služi za preuzimanje podataka povezanih sa ispitivanim hemikalijama, bolestima, genima, terminima ontologije gena (GO) ili metaboličkim putevima. „*Set Analyzer*” generiše toksikogenomičke podatke na osnovu unete liste gena ili hemikalija. Alat „*MyGeneVenn*” upoređuje listu genu sa genomom povezanim sa najviše dve hemikalije ili bolesti. Alat „*MyVenn*” istražuje odnose između unete liste hemikalija, bolesti, gena, GO termina ili metaboličkih puteva. „*VennViewer*” upoređuje povezane skupove podataka za do tri hemikalije, bolesti ili gena.

CTD analiza može se primeniti na bilo koju hemikaliju prisutnu u životnoj sredini i, konstruišući mreže povezanosti između hemikalija, gena i bolesti, može poslužiti kao osnova daljeg istraživanja molekularnih mehanizama toksičnosti.

TOXICOGENOMIC DATA MINING: THE COMPARATIVE TOXICOGENOMICS DATABASE

**Katarina Baralić, Dragica Jorgovanović, Biljana Antonijević, Evica
Antonijević, Marijana Ćurčić, Danijela Đukić-Čosić**

Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade
- Faculty of Pharmacy (Serbia)

Toxicogenomics is considered the integration of „-omic” technologies (methods of measuring families of cellular molecules), bioinformatics, and toxicology. It combines genes, protein and diseases profiling with conventional toxicology to investigate the interaction between genes and diseases. It also contributes strategies for safety assessment of mixtures, giving the insight into all the interactions important in considering mixture toxicity.

The Comparative Toxicogenomics Database (CTD;<http://CTD.mdibl.org>) is publicly available database, launched in November 2004, which curates and integrates data describing relationships between chemicals, genes/proteins, and human diseases. According to the latest update, it includes more than 30.5 million toxicogenomic data. CTD uses official gene symbols and names from the National Center for Biotechnology Information's (NCBI) Entrez-Gene database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). The CTD disease vocabulary uses terms from both MeSH (Medical Subject Headings) and OMIM (Online Mendelian Inheritance of Man). While CTD focuses on the environmental chemicals and outcomes relevant to human health, some inferences are based on the information from animal studies if the gene of interest is also present in humans.

CTD contains 5 tools for toxicogenomic data mining analysis. „Batch Query” is used to download custom data associated with a set of chemicals, diseases, genes, Gene Ontology (GO) terms, or pathways. „SetAnalyzer” tool performs analyses such as set-based enrichment for collections of chemicals or genes, and pathway generation for collections of genes. „MyGeneVenn” tool compares the investigated gene list to genes associated with up to two chemicals or diseases. „MyVenn” tool explores the relationships among the lists of CTD chemicals, diseases, genes, GO terms or pathways. „VennViewer” compare associated data sets for up to three chemicals, diseases, or genes.

CTD analysis can be applied to any environmental chemical or therapeutic drug and, by constructing chemical-gene-disease networks, which can serve as a preliminary result for further investigation of the molecular mechanisms of toxicity.

TOKSIKOGENOMIČKI METOD ISPITIVANJA VEZE ŽIVA-GEN-RAZVOJ BOLESTI

**Katarina Baralić, Dragica Jorgovanović, Marijana Ćurčić,
Evica Antonijević, Katarina Živančević, Biljana Antonijević,
Danijela Đukić-Čosić**

Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”, Univerzitet u Beogradu
- Farmaceutski fakultet (Srbija)

Živa (Hg) je toksični metal čija se izloženost može dovesti u vezu sa mnogim bolestima. Široko je rasprostranjena u prirodi i predstavlja jedan od glavnih zagađivača životne sredine. Cilj ovog rada bio je da se ispita povezanost između žive, gena na koje ona deluje i bolesti koristeći toksikogenomički pristup prikupljanja podataka.

Korišćena je toksikogenomička baza podataka Comparative toxicogenomics database (CTD; <http://ctd.mdibl.org>) za dobijanje interakcije između žive i gena, dok je pomoću njenog alata Set Analyser kreirana lista bolesti povezanih sa izloženošću ovom toksičnom metalu.

Dobijena lista toksikogenomičkih podataka ukazuje na to da se Hg može dovesti u vezu sa 73 bolesti. Od ovih bolesti, 15 su bolesti nervnog sistema, uključujući amiotrofičnu lateralnu sklerozu, poremećaje u učenju, intelektualnu onesposobljenost, neurobihejvioralne manifestacije itd; 11 su bolesti imunog sistema, uključujući preosetljivost, astmu, alergijski kontaktni dermatitis itd; 9 su urogenitalne bolesti, kako muškaraca, tako i žena, među kojima su akutna bubrežna insuficijencija, proteinurija, membranski glomerulonefritis, neplodnost, itd. Ostale bolesti uključuju kardiovaskularna oboljenja, poremećaje endokrinog sistema, oboljenja respiratornog trakta itd. Geni sa kojima Hg ispoljava najviše interakcija su CIP1A1, NKO1 (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1), HMOKS1 (Heme Oxygenase 1) (39, 23 i 22 interakcije, redom). CTD pruža dodatne podatke o uticaju jedinjenja žive na gene. Za organska jedinjenja Hg, gen sa najviše interakcija je NOG (4148 interakcija), koji je neophodan za rast i oblikovanje nervne cevi. Za neorganske jedinjenja žive, CTD pruža informacije o živi(II)-hloridu (intereaguje sa 1943 genom) i živi(II)-bromidu (intereaguje sa 1077 gena). Gen sa najviše interakcija za živa(II)-bromid takode je NOG (1011 interakcija), koji se, zajedno sa IL4 i CAT, našao i među genima sa najviše interakcija za živa(II)-hloridom.

CTD olakšava formiranja mreže povezanosti između gena i bolesti indukovanih izloženošću živi, što može činiti osnovu za dalja istraživanja molekularnih mehanizama toksičnosti ovog metala.

MERCURY-GENE-DISEASE ASSOCIATIONS: TOXICOGENOMICS DATA MINING APPROACH

**Katarina Baralić, Dragica Jorgovanović, Marijana Ćurčić,
Evica Antonijević, Katarina Živančević, Biljana Antonijević,
Danijela Đukić-Čosić**

Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade
- Faculty of Pharmacy (Serbia)

Mercury (Hg) is a toxic heavy metal associated with many diseases. It is widely dispersed in nature and thus represents a major global environmental health threat. The aim of this study was to explore the mercury-gene-disease associations using the toxicogenomics data mining approach.

Curated interactions between Hg and genes were downloaded from the Comparative Toxicogenomics Database (CTD; <http://ctd.mdibl.org>), while its Set Analyser tool created a list of diseases connected to Hg exposure.

The obtained list of toxicogenomic data on Hg exposure consisted of 73 curated diseases. Among them, 15 were nervous system diseases, including amyotrophic lateral sclerosis, learning disorders, intellectual disability, neurobehavioral manifestations, etc; there were 11 curated associations with the immune system diseases, including hypersensitivity, asthma, allergic contact dermatitis, etc; 9 curated associations for both male and female urogenital diseases, including acute kidney injury, proteinuria, membranous glomerulonephritis, infertility, etc. Other diseases involved cardiovascular diseases, endocrine system diseases, respiratory tract diseases, etc. The top interacting genes for Hg were CYP1A1, NQO1 (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1), HMOX1 (Heme Oxygenase 1) (39, 23 and 22 interactions, respectively). CTD provided the additional data about mercury compounds: for organic mercury the top interacting gene was NOG (4148 interactions), required for growth and patterning of the neural tube, while for inorganic Hg compounds, CTD provided information on mercuric chloride (interacts with 1943 genes) and mercuric bromide (interacts with 1077 genes). The top interacting gene for mercuric bromide was NOG (1011 interactions), being also among the top interacting genes for mercuric chloride, along with IL4 and CAT.

CTD facilitates construction of mercury-gene-disease networks and provides the basis for further exploring the molecular mechanisms of Hg toxicity.

ODREĐIVANJE TEBAINA I METABOLITA U POSTMORTEM BIOLOŠKIM TEČNOSTIMA: PRIKAZ SLUČAJA

**Gordana Brajković¹, Jasmina Jović Stošić², Snežana Đorđević²,
Vesna Kilibarda², Tanja Stevović¹, Zorica Brajković³, Slavica Vučinić¹**

¹Nacionalni centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd,

²Vojnomedicinska akademija - Medicinski fakultet, Univerzitet odbrane,
Beograd, ³Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet (Srbija)

Tebain je fenantrenski alkaloid u semenu opijumskog maka i koristi se kao marker njegove ingestije. Predominantni efekat tebaina je stimulacija centralnog nervnog sistema. Metabolizam tebaina demetilacijom do morfina može da se desi na najmanje dva načina, što je slično procesima koji se dešavaju u semenu: (I) preko kodeina, tebain → neopinon → kodeinon → kodein → morfin; i (II) preko oripavina, tebain → oripavin → 3-O-demetilovani neopinon → morfinone → morfin. Zbog kratkog poluvremena eliminacije, tebain je teško detektovati 12 h nakon ingestije. Cilj ispitivanja je primena toksikološke analize u utvrđivanju iznenadne smrti.

Analizirani su uzorci bioloških tečnosti nakon obdukcije. Uzorci su ekstrahovani mešavinom hloroform-izopropanol (9:1) pri pH 11. Tebain i njegovi metaboliti identifikovani su primenom tačne hromatografije sa diode-array detektorom na Symmetry® C8 kolonom sa mobilnom fazom acetonitril: 50 mM natrijum dihidrogen fosfat (pH 3,6) u gradijent modu. Rezultati su potvrđeni tačnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (LC-MS) uz korišćenje Xterra C18 kolone i mobilne faze acetonitril: 5 mM amonijum formijat (pH 3.5), u gradijent modu, kao i primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS), uz korišćenje biblioteke masenih spektara za potvrdu identifikacije tebaina.

Tebain i njegovi metaboliti kodein i morfin, detektovani su u post mortem krvi (0,13; 0,15 i 0,23 µg/mL), urinu (2,76; 1,65 i 2,33 µg/mL) i želudačnom sadržaju (0,75; 1,65 i 0,27 µg/mL). Metaboliti tebaina neopinon i morfinon, kao i papaverin i noskapin, identifikovani su u svim analiziranim uzorcima. U uzorka urina detektovan je i salutaridin, alkaloid koji nastaje u morfinanskom putu u semenu opijumskog maka.

Osobe za koje se sumnja da su koristile sredstva zloupotrebe se testiraju na prisustvo opioida i njihovih metabolita. Rezultati toksikološke analize koji potvrđuju prisustvo ovih jedinjenja i njihovih metabolita su od presudnog značaja u potvrđivanju uzroka smrti u tim slučajevima.

DETERMINATION OF THEBAINE AND METABOLITES IN POSTMORTEM BIOLOGICAL FLUIDS: CASE REPORT

**Gordana Brajković¹, Jasmina Jović Stošić², Snežana Đorđević²,
Vesna Kilibarda², Tanja Stevović¹, Zorica Brajković³, Slavica Vučinić¹**

¹National Poison Control Centre, Military Medical Academy, Belgrade, ²Military Medical Academy - Medical Faculty, University of Defence, Belgrade, ³University of Belgrade - School of Medicine (Serbia)

Thebaine is phenanthrene alkaloid from the opium poppy and has been used as a marker of its ingestion. The predominant effect of thebaine is central nervous system stimulation. Metabolism of thebaine by demethylation to morphine can occur by at least two routes, which are similar to those of the poppy: (I) via codeine, thebaine → neopinone → codeinone → codeine → morphine; and (II) via oripavine, thebaine → oripavine → 3-O-demethylated neopinone → morphinone → morphine. Due to its short half-life, it is difficult to detect thebaine more than 12 h after ingestion. Objective of the study was application of toxicological analysis to determine sudden death.

We analyzed samples of biological fluids obtained after autopsy. Samples were extracted by mixture of chloroform-isopropanol (9:1) at pH 11.0. Thebaine and its metabolites were identified by liquid chromatography with diode-array detection on Symmetry[®] C8 column with mobile phase acetonitrile: 50 mM dihydrogen sodium phosphate (pH 3.6) in the gradient mode. Confirmation of results was performed by liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS) using XTerra C18 column and mobile phase acetonitril: 5 mM ammonium formate (pH 3.5), in the gradient mode, and using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), using MS spectral library for confirmation of thebaine.

The thebaine and its metabolites codeine and morphine, were founded in the postmortem blood (0.13; 0.15 and 0.23 µg/mL), urine (2.76; 1.65 and 2.33 µg/mL) and gastric contents (0.75; 1.65 and 0.27 µg/mL). Thebaine metabolites neopinone and morphinone, as well as papaverine and noscapine, were identified in all samples. Salutaridine, alkaloid that is present in the morphinian alkaloid pathway of opium poppy, is also identified in urine sample.

Persons who are suspected that abused drugs are frequently investigated for the presence of opioids and their metabolites. The results of toxicological analyses about presence of drug and their metabolites are essential in developing diagnoses in these cases.

INTERAKCIJE IZMEĐU MAGNEZIJUMA I TOKSIČNIH METALA (KADMIJUMA I OLOVA) NA NIVOU GENA – ANALIZA TOKSIKOGENOMIČKIH PODATAKA

**Dragica Jorgovanović, Katarina Baralić, Milena Anđelković,
Zorica Bulat, Vesna Matović, Danijela Đukić-Ćosić**

Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet (Srbija)

Magnezijum (Mg) je esencijalni mineral koji je neophodan za normalno funkcionisanje brojnih sistema našeg organizma. Takođe, u velikom broju studija primećen je protektivni efekat Mg na štetne efekte toksičnih metala ali su molekularni mehanizmi interakcija Mg i toksičnih metala nepotpuno objašnjeni. In vivo istraživanja pokazala su da Mg može smanjiti oksidativni stres izazvan kadmijumom (Cd) i olovom (Pb). Druga istraživanja ukazuju na mogućnost interakcije Mg sa genima i posledično njegov antagonistički efekat na dejstvo toksičnih metala. Cilj ovog rada je bio analiza toksikogenomičkih podataka o interakcijama Mg i toksičnih metala, Cd i Pb na nivou gena u svrhu pojašnjenja protektivnog dejstva Mg u uslovima izloženosti ovim metalima.

Dostupna toksikogenomička baza podataka CTD (Comparative Toxicogenomics Database) je korišćena za dobijanje informacija o interakcijama između različitih metala i gena, odnosno bolesti kao i o interakcijama između gena i pojave bolesti. Set gena od interesa konstruisan je korišćenjem alata dostupnih u samoj bazi. Ispitivani toksični metali reaguju sa daleko većim brojem gena u odnosu na Mg: Pb utiče na 3051 gen, Cd na 2552 gen, dok Mg intereaguje sa 218 gena.

VennViewer alat je identifikovao 21 gen, na koje deluju sva tri metala zajedno i 8 pridruženih bolesti. Ekspresija BGLAP i SPP1, gena koji kodiraju osteokalcin i osteopontin povećana je u prisustvu Mg. Nasuprot tome, Cd i Pb smanjuju njihovu ekspresiju što može pojasniti pojavu Cd/Pb indukovane osteoporozе. Chemical-Gene Interactions alat pokazuje da Cd i Pb imaju stimulatívni efekat na sintezu proinflatornih citokina kao što su IL1B, TNF i NOS2 dok Mg blokira njihovu sintezu. Osim toga, Mg stimuliše sintezu superokid dismutaze povećavajući ekspresiju gena SOD1 što ide u prilog objašnjenju antioksidativnog potencijala Mg. Ovi rezultati pojašnjavaju protektivni efekat Mg u uslovima izloženosti Cd i Pb i pružaju osnovu za dalja istraživanja antagonističkih efekata između toksičnih metala Cd i Pb i Mg.

INTERACTIONS BETWEEN MAGNESIUM AND TOXIC METALS (CADMIUM AND LEAD) ON THE GENE LEVEL – TOXICOGENOMICS DATA MINING

**Dragica Jorgovanović, Katarina Baralić, Milena Anđelković,
Zorica Bulat, Vesna Matović, Danijela Đukić-Ćosić**

Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”,
University of Belgrade - Faculty of Pharmacy (Serbia)

Magnesium (Mg) is an essential mineral important for normal function of numerous systems in our organism. Many studies demonstrated that magnesium can be protective against toxic metals, but underlying mechanisms of Mg interactions with them are incompletely understood. In vivo studies have shown that Mg can lower oxidative stress induced by cadmium (Cd) and lead (Pb), while other studies suggested that it interacts with genes and acts as an antagonist of toxic metals. The aim of this study was to analyse available data of Cd, Pb and gene interactions and to understand Mg potential preventing against toxic effects of these metals.

Comparative Toxicogenomics Database (CTD) is a publicly available database that provides manually curated information about chemical–gene interactions, chemical–disease and gene–disease relationships. A set of genes was constructed by using query tools from CTD. Investigated toxic metals interact with far greater number of genes than Mg: Pb affects 3051 genes, Cd affects 2552, while Mg interacts with 218 genes. VennViewer query tool identified 21 genes affected by all three substances together and 8 curated diseases. Expression of BGLAP and SPP1, osteocalcin and osteopontin coding genes, is increased in the presence of Mg. Contrary, Cd and Pb lower their expression and that could be the explanation for Cd/Pb induced osteoporosis. Chemical-Gene Interaction tool reveal that Cd and Pb have stimulant effect on pro-inflammatory cytokines such as IL1B, TNF and NOS2 while Mg blocks their synthesis. In addition, Mg stimulates the synthesis of superoxide dismutase by increasing the expression of SOD1 gene that is in agreement with the anti-oxidative potential of Mg. This study gives more information on the protective role of Mg under the conditions of Cd and Pb exposure and presents basics for the further investigations on the antagonism between toxic metals Cd and Pb and Mg.

TOKSIKOGENOMIČKA ANALIZA UTICAJA RAZLIČITIH JEDINJENJA MAGNEZIJUMA NA GENE

**Dragica Jorgovanović, Katarina Baralić, Zorica Bulat,
Aleksandra Buha Đorđević, Vesna Matović, Danijela Đukić-Ćosić**

Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet (Srbija)

Pozitivan efekat suplementacije magnezijumom (Mg) pokazan je kod pacijenata koji boluju od dijabetesa, migrene, depresije, osteoporoze i mnogih drugih hroničnih bolesti. Takođe, eksperimentalne studije ukazuju na protektivni efekat Mg u uslovima izloženosti toksičnim metalima. Cilj ovog rada je bio da se utvrdi efekat različitih jedinjenja Mg na nivou gena korišćenjem toksikogenomičkih podataka.

Razmatrana su najčešće korišćena jedinjenja Mg u suplementima: magnezijum-oksidi (MgO) i magnezijum-hlorid (MgCl₂). Toksikogenomička baza podataka (Comparative Toxicogenomics Database, CTD) je korišćena kao izvor informacija o interakcijama između MgO, MgCl₂ i gena. Dodatno korišćeni alati za proučavanje molekularnih interakcija su: MyVenn i Set Analyzer.

Magnezijum-oksidi pokazuje interakciju sa 16, a MgCl₂ sa 25 gena. Primećeno je da MgO interaguje sa INS, genom koji kodira insulin i stimuliše njegovo oslobađanje, što ukazuje na mogućnost upotrebe ovog hemijskog jedinjenja Mg kod pacijenata sa smanjenom osetljivošću na insulin. S druge strane, MgCl₂ ne stupa u interakciju sa genima koji su uključeni u metabolizam glukoze, niti sintezu insulina. Terapijska uloga MgCl₂ u epileptičkim napadima izazvanim prevelikom aktivnošću nervnih ćelija može se objasniti interakcijom MgCl₂ sa ACHE proteinom. On povećava sintezu acetilholinesteraze, koncentraciju holina u mozgu i time zaustavlja prenošenje nervnog impulsa. Oba ispitivana hemijska jedinjenja Mg utiču na aktivnost 3 gena koji kontrolišu apoptotički proces (BAX, CASP3 i TP53). Rezultati obrade podataka pokazuju da MgO može smanjiti ekspresiju BAX i TP53 gena što dovodi do inhibicije apoptoze i eventualnog nastanka karcinoma. S druge strane, MgCl₂ stimuliše sintezu BAX proteina i apoptozu ćelija, ispoljavajući antitumorski efekat. Ova analiza ukazuje da vrsta Mg jedinjenja determiniše i njihov uticaj na nivou gena, što bi trebalo uzeti u obzir pri odlučivanju koje jedinjenje Mg će se koristiti u suplementima.

TOXICOGENOMIC ANALYSES OF DIFFERENT MAGNESIUM COMPOUNDS EFFECTS ON GENES

**Dragica Jorgovanović, Katarina Baralić, Zorica Bulat,
Aleksandra Buha Đorđević, Vesna Matović, Danijela Đukić-Ćosić**

Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”,
University of Belgrade - Faculty of Pharmacy (Serbia)

Magnesium (Mg) supplementation has shown positive effects in diabetes, migraine, depression, osteoporosis and many other chronic diseases. In addition, experimental studies confirm protective effect of Mg against metal toxicity. The aim of this study was to identify the effects of different magnesium compounds on genes using toxicogenomic analyses.

The most commonly used Mg compounds in supplements, magnesium oxide (MgO) and magnesium chloride (MgCl₂), were considered in this study. Comparative Toxicogenomics Database (CTD), was used as a source of curated interactions between MgO, MgCl₂ and genes. Query tools: MyVenn and Set Analyzer, were used to examine the molecular interactions.

MgO and MgCl₂ interact with 16 and 25 genes, respectively. MgO interacts with INS, insulin coding gene and stimulates the release of insulin. This indicates that MgO can be helpful for people with decreased insulin sensitivity. On the contrary, MgCl₂ does not interact with genes involved in glucose metabolism nor insulin synthesis. Therapeutic role of MgCl₂ in seizures can be explained by MgCl₂ interaction with ACHE protein. It increases the synthesis of acetylcholinesterase, concentration of histamine in brain and thus terminates signal transmission. Both compounds affect the activity of 3 genes which control the apoptotic process (BAX, CASP3 and TP53). The results show that MgO decrease the expression of BAX and TP53 genes, leading to the inhibition of apoptosis and potential carcinogenicity. On the other hand, MgCl₂ stimulates synthesis of BAX protein and apoptotic death of the cells, leading to the anticarcinogenic effect. This study demonstrated that Mg compounds may affect the same genes differently, and implicates that the type of Mg compound used for supplement formulation should be considered as an important factor.

UTICAJ TERAPIJSKE PRIMENE LEKOVA NA POUZDANOST DOKAZIVANJA AMFETAMINA KOMERCIJALNIM TEST TRAKAMA

**Marija Brković, Katarina Baralić, Dragana Javorac, Marijana Ćurčić,
Evica Antonijević, Zorica Bulat, Danijela Đukić-Čosić**

Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet (Srbija)

Amfetamini se danas, kao i druge psihoaktivne supstance, masovno zloupotrebljavaju. Za rano otkrivanje njihove zloupotrebe koriste se komercijalne test trake za brzu detekciju supstanci u urinu. Lake su za korišćenje i veoma brzo se dobija rezultat analize. Međutim, dobijeni rezultat je samo preliminarni i mora se potvrditi konfirmativnom hromatografskom metodom jer litererturni podaci ukazuju da određeni lekovi, kao što su labetalol, hlompromazin, ranitidin, ritodrin, itd. daju lažno pozitivne rezultate na amfetamin, usled slične strukture sa amfetaminom ili interferirajući sa antitelima na traci. Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj terapijske primene lekova iz grupe inhibitora protonske pumpe (omeprazol, pantoprazol), kao i OTC preparata na bazi oksimetazolin-hidrohlorida na pojavu lažno pozitivnih rezultata na amfetamin.

U istraživanje je bilo uključeno osam osoba, 7 ženskog pola i jedna osoba muškog pola, različite starosne dobi i zdravstvenog stanja. Tri osobe su bile na terapiji pantoprazolom duže od tri meseca (*Controloc*[®] i *Nolpaza*[®], 20 mg pantoprazola), dve na terapiji omeprazolom kraćom od tri meseca (*Omepral*[®], 20 mg omeprazola) i tri ispitanika su bila na trodnevnoj terapiji OTC preparatom na bazi oksimetazolin-hidrohlorida (*Operil*[®] kapi za nos, 0,5 mg/ml) prema priloženom režimu doziranja. Sakupljeni su prvi jutarnji urin kod svakog ispitanika. U sakupljenim uzorcima izvršena je imunohromatografska analiza komercijalno dostupnim test trakama za amfetamin (*dBest*[®] *One Step Rapid Test*). Svih 8 ispitivanih uzoraka dalo je negativan rezultat na amfetamin. Međutim kod dva ispitivana uzorka pojavile su se izvesne interferencije na tetrahidrokanabinol (THC).

Dobijeni rezultati ovog rada pokazuju da terapijska primena lekova (pantoprazola, omeprazola), kao i OTC preparata na bazi oksimetazolin-hidrohlorida sa predviđenim režimom doziranja nije dovela do lažno pozitivnih rezultata na amfetamin, ali jeste ukazala na određene interferencije na THC. Ističe se značaj pravilnog izvođenja testa i strogog pridržavanja uputstva prilikom tumačenja dobijenih rezultata.

THE IMPACT OF THERAPEUTIC USE OF DRUGS ON THE RELIABILITY OF AMPHETAMINE COMMERCIAL TEST STRIPS

**Marija Brković, Katarina Baralić, Dragana Javorac, Marijana Ćurčić,
Evica Antonijević, Zorica Bulat, Danijela Đukić-Čosić**

Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”,
University of Belgrade - Faculty of Pharmacy (Serbia)

Amphetamine and other psychoactive substances are widely used as drugs of abuse. Commercial test strips for rapid detection of these substances in urine are used for early detection of amphetamine abuse. They are simple to use, while giving a fast results. However, these results are only preliminary and must be confirmed by confirmatory chromatographic method. Literary data suggest that certain drugs, such as labetalol, chlorpromazine, ranitidine, ritodrine, etc. give false positive results for amphetamine, due to the similar structure, or interfering with the antibodies on the test strip. The aim of this study was to examine the influence of the proton-pump inhibitors (omeprazole, pantoprazole) and oxymetazoline hydrochloride based OTC preparations on the occurrence of false positive results for amphetamine.

The study included eight people (7 female and 1 male) of different ages and health conditions. Three participant were treated with pantoprazole longer than three months (Controloc® and Nolpaza®, 20 mg of pantoprazole), two were treated with omeprazole less than three months (Omepral®, 20 mg omeprazole), while three received a three-day treatment of oxymetazoline hydrochloride based OTC preparation (Operil® nasal drops, 0.5 mg/ml), according to the recommended dosing regimen. The first morning urine samples were collected. Urin analysis was performed by commercially available immunochromatography amphetamine test strips (dBest® One Step Rapid Test). Negative results were obtained for all 8 test samples. However, interference with tetrahydrocannabinol (THC) was noted for two studied samples.

The results of this study show that administration of drugs (pantoprazole, omeprazole and oxymetazoline hydrochloride based OTC preparations) according to the dosing regimen did not lead to the false-positive amphetamine results. However, the results pointed out certain interference with THC. These results highlighted the importance of the proper performance of the screening test and strict adherence to the instructions in the interpretation of results.

UTICAJ OTC PREPARATA NA BAZI IBUPROFENA I PSEUDOEFEDRINA NA POUZDANOST PRELIMINARNE ANALIZE ZLOUPOTREBE PSIHOAKTIVNIH SUPSTANCI

**Milica Marković¹, Katarina Baralić¹, Vera Lukić², Zorica Bulat¹,
Evica Antonijević¹, Marijana Ćurčić¹, Danijela Đukić-Ćosić¹**

¹Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu
– Farmaceutski fakultet, ²Institut za sudsku medicinu „Milovan Milovanović“,
Beograd (Srbija)

Psihoaktivne supstance se često zloupotrebljavaju zbog dejstva na nivou centralnog nervnog sistema i nastanka pozitivnih simptoma poput euforije. Rutinska kontrola njihove zloupotrebe se izvodi testiranjem zaposlenih na radnom mestu, sportista i učenika. U te svrhe se najčešće koristi preliminarna analiza urina lako dostupnim komercijalnim test trakama. Zbog nedovoljne selektivnosti test traka moguće su interferencije sa strukturno sličnim jedinjenjima. Literaturni podaci ukazuju da primena izvesnih lekova, naročito lekova protiv prehlade, može dovesti do lažno pozitivnih rezultata preliminarne analize zloupotebe psihoaktivnih supstanci.

Ispitati uticaj OTC preparata na bazi ibuprofena i pseudoefedrina na pojavu lažno pozitivnih rezultata preliminarne analize sledećih psihoaktivnih supstanci: amfetamine, metamfetamine, opijate, kokain, kanabinoide, barbiturate, benzodiazepine, oksikodon, fenciklidin i metadon.

U istraživanje su bila uključena četiri zdrava dobrovoljca. Svi ispitanici su uzeli po jednu tabletu Defrinol FORTE® (60 mg pseuefedrina + 400 mg ibuprofena) jednog od najčešće korišćenih lekova protiv prehlade. Uzorci urina su sakupljeni nakon 3 h, 6 h i 16 h (prvi jutarnji urin) od primene tablete. Imunohromatografska analiza je izvršena test trakama *DOA 10 Panel Test Strip*® i *dBest® One Step Rapid Test*. Radi provere dobijenih rezultata izvršena je i potvrдна analiza LC-MS/MS.

U ispitivanju dvanaest uzoraka urina desetokomponentnom test trakom dobijeni su pozitivni rezultati na prisustvo amfetamina u osam uzoraka i negativni rezultati na prisustvo drugih psihoaktivnih supstanci u svim ispitivanim uzorcima. Pozitivni rezultati na amfetamin su potvrđenim i ispitivanjem jednokomponentnom test trakom za amfetamine. Međutim, potvrđnom LC-MS/MS analizom u ovim uzorcima urina nije dokazano prisustvo amfetamina već samo prisustvo pseudoefedrina.

Postoji uočena interferencija između često korišćenog OTC preparata protiv prehlade na bazi ibuprofena i pseudoefedrina ili njihovih metabolita i antitela specifičnih samo za amfetamine, dok druge ispitivane psihoaktivne supstance nisu pokazale ukrštenu reaktivnost sa ibuprofenom i pseudoefedrinom. Dobijene rezultate treba imati u vidu prilikom rutinske kontrole zloupotrebe psihoaktivnih supstanci.

EFFECT OF OTC PREPARATIONS WITH IBUPROFEN AND PSEUDOEPHEDRINE ON THE RELIABILITY OF THE PRELIMINARY ANALYSIS OF PSYCHOACTIVE SUBSTANCES ABUSE

Milica Marković¹, Katarina Baralić¹, Vera Lukić², Zorica Bulat¹, Evica Antonijević¹, Marijana Ćurčić¹, Danijela Đukić-Ćosić¹

¹Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, ²Institute of Forensic Medicine „Milovan Milovanović”, Belgrade (Serbia)

The psychoactive substances are often abused. Their effects on central nervous system activate the reward pathway and cause positive symptoms such as euphoria. Routine monitoring of psychoactive substances is common in practice for employees, athletes and students. For these purposes, the most frequently used method is urine screening by the commercial test strips. Due to the low selectivity of strips, interferences with structurally similar compounds are possible. Literature data indicate that usage of certain drugs can lead to false positive results.

The aim of study was to examine the effect of commonly used OTC preparation which contains ibuprofen and pseudoephedrine on the occurrence of false positive results in urine screening for amphetamines, methamphetamines, opiates, cocaine, cannabinoids, barbiturates, benzodiazepines, oxycodone, phencyclidine, and methadone.

The study involved 4 healthy subjects. All subjects have taken Defrinol FORTE® (60 mg pseudoephedrine + 400 mg ibuprofen), one of the most often used anti-cold drugs. Urine samples were taken 3h, 6h and 16h (first morning urine) after the tablet intake. Urine analysis was conducted with immunochromatography test strips *DOA 10 Panel Test Strip*® and *dBest*® *One Step Rapid Test*. LC-MS/MS analysis was used for confirmation of the obtained results.

Positive results on amphetamine obtained in eight urine samples of twelve tested with a ten-component test strip. All the urine samples were negative on other tested psychoactive substances. All amphetamine positive results were further tested and confirmed with one panel amphetamine test strips. However, after the LC-MS/MS analysis, only pseudoephedrine was detected, while there were no amphetamines present in the urine samples.

Interference between OTC preparation with ibuprofen and pseudoephedrine and antibodies in the test strips specific for amphetamines was observed. Other psychoactive substances showed no cross-reactivity with ibuprofen and pseudoephedrine. The obtained results should be taken into account in routine monitoring of the psychoactive substances abuse.

UTICAJ RAZLIČITIH FARMACEUTSKIH OBLIKA OTC PREPARATA SA PSEODOEFEDRINOM NA POJAVU LAŽNO POZITIVNIH REZULTATA KOMERCIJALNIH TEST TRAKA NA AMFETAMIN

**Milica Pavlović, Filip Dimitrijević, Katarina Baralić, Marijana Ćurčić,
Zorica Bulat, Evica Antonijević, Danijela Đukić-Ćosić**

Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet (Srbija)

Preliminarna analiza psihoaktivnih supstanci u urinu pomoću komercijalnih test traka smatra se brzom i jednostavnom metodom za rano otkrivanje zloupotrebe psihoaktivnih supstanci. Nedostatak ove preliminarne analize je unakrsna reaktivnost sa širokim spektrom strukturno sličnih jedinjenja i dobijanje lažno pozitivnih rezultata. Literaturni podaci ukazuju da se najveći broj lažno pozitivnih rezultata dobija za amfetamin. Cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj različitih farmaceutskih oblika OTC preparata sa pseudoefedrinom na pojavu lažno pozitivnih rezultata na amfetamin, kao i da se utvrdi period u toku koga se javlja lažno pozitivan rezultat.

U studiji je učestvovalo 9 ispitanika oba pola, podeljenih u tri grupe. Prva grupa ispitanika je primenjivala *Rinasek*[®] tablete (60 mg pseudoefedrina), druga *Clarinase*[®] tablete sa produženim oslobađanjem (120 mg pseudoefedrina), i treća grupa ispitanika *TyloHot*[®] šumeće granule (60 mg pseudoefedrina). Svi preparati su primenjivani prema režimu doziranja preporučenog od strane proizvođača. Sakupljan je svaki uzorak urina i analizan dok se pojavljivao pozitivan rezultat. Imunohromatografska analiza je izvedena jednodimenzionalnim test trakama za amfetamin (*dBest*[®] *OneStepRapidTest*). Lažno pozitivni rezultati na amfetamin su dobijeni nakon primene sva tri ispitavana OTC preparata sa pseudoefedrinom. Primene šumećih tableta *TyloHot*[®] je dovela do pojave lažno pozitivnih rezultata u periodu od 2 do 8h, dok je pozitivan rezultat zabeležen u periodu od 4 do 8h nakon primena *Rinasek*[®] tableta. Nakon primene *Clarinase*[®] tableta sa modifikovanim oslobađanjem, pojava prvih lažno pozitivnih rezultata zabeležena je nakon 12h, a poslednjih nakon 21h. Razlike u dobijenim rezultatima mogu se objasniti interindividualnim farmakokinetičkim varijacijama ispitanika i razlikama u farmaceutskoj formulaciji preparata.

Ispitivani OTC preparati sa pseudoefedrinom daju lažno pozitivan rezultat preliminarne analize na amfetamin. Vremenski period pojave pozitivnih rezultata varira u zavisnosti od tipa korišćenog preparata, tj. farmaceutskih proizvoda sa različitim vremenom oslobađanja aktivne supstance.

EFFECT OF DIFFERENT PHARMACEUTICAL FORMS OF OTC WITH PSEUDOEPHEDRINE ON POSITIVE RESULTS ON COMMERCIAL TEST PANELS FOR AMPHETAMINE

**Milica Pavlović, Filip Dimitrijević, Katarina Baralić, Marijana Ćurčić,
Zorica Bulat, Evica Antonijević, Danijela Đukić-Ćosić**

Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”,
University of Belgrade - Faculty of Pharmacy (Serbia)

Preliminary analysis of psychoactive substances in urine using commercial test panels is considered a fast and simple method. The disadvantage of this preliminary analysis is cross-reactivity with a broad spectrum of structurally similar compounds. Literature data suggest that the most of false positive results are obtained for amphetamine. The aim of this study was to examine the effects of different pharmaceutical forms of OTC preparations with pseudoephedrine on possible false positive results for amphetamine, as well as the period during which false positive results may occur.

The study involved 9 healthy subjects, divided into three groups. The first group of subjects used Rinasek® tablets (60 mg pseudoephedrine), the second group used Clarinase® tablets with extended release (120 mg pseudoephedrine), and the third group used TylolHot® effervescent granules (60 mg pseudoephedrine). All preparations were administered according to the dosing regimen given by the manufacturer. Each urine sample was collected and analyzed until the positive result was obtained. Immunochromatographic analysis was performed by one-component test strips for amphetamine (dBest® OneStepRapidTest). False positive results were obtained after the consumption of all three OTC preparations with pseudoephedrine. They occurred 2-8 h after the administration of TylolHot® and 4-8 h after the administration of Rinasek®. After the administration of Clarinase® tablets with modified release, the first false positive results were noted after 12h, and the last ones after 21h. Differences in results could be explained by interindividual pharmacokinetic variations and differences in pharmaceuticals formulation of tested preparations.

These results confirmed that false positive results on amphetamine are obtained after the administration of OTC preparations with pseudoephedrine. Time period within which positive results occurred varied depending on the type of used preparation i.e. pharmaceuticals with different active substance release time.

ČAJ OD KANTARIONA (*HYPERICUM PERFORATUM* L.) KAO IZVOR IZLOŽENOSTI KADMIJUMU

**Milica Vasilov¹, Vladimir Berta¹, Sergej Jakimenko¹, Aleksandra Repić²,
Marijana Ćurčić¹, Zorica Bulat¹, Danijela Đukić-Ćosić¹**

¹Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu
- Farmaceutski fakultet, ²Institut za medicinu rada Srbije „Dr Dragomir
Karajović“, Beograd (Srbija)

Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) se od najstarijih vremena koristi u fitoterapiji. Primena proizvoda na bazi njegove herbe može biti izvor unosa kadmijuma (Cd) u organizam jer je kantarion hiperakumulator ovog toksičnog metala. Cilj rada je bio da se odredi sadržaj Cd u komercijalno dostupnim čajevima na bazi herbe kantariona i proceni njegov unos putem pripremljenih infuza.

Sakupljeno je 7 komercijalno dostupnih čajeva na bazi herbe kantariona (6 – rinfuzno pakovanje, 1 – filter kesice). Koncentracija Cd je u ispitivanim uzorcima, nakon mikrotalasne digestije u smeši HNO_3 i H_2O_2 (7:1), određena AAS sa grafitnom kivetom (GF-AAS). Istom metodom, bez prethodne digestije, određen je sadržaj Cd u infuzima koji su pripremljeni prema uputstvima datim na pakovanju proizvoda. Preračun unosa Cd je izvršen prema EPA metodologiji. Koncentracije Cd u svim ispitivanim uzorcima čajeva su u opsegu od 0,42 do 1,34 mg/kg suvog biljnog materijala i prevazilaze preporučene vrednosti Svetske zdravstvene organizacije (0,3 mg/kg) i Evropske farmakopeje (Ph.Eur. 8) (0,5 mg/kg). Izmerene koncentracije Cd u infuzima su od 0,17 do 2,19 $\mu\text{g/L}$, uz procenat ekstrakcije Cd u infuzima od 1,02 do 9,22%. Izračunati nedeljni unos Cd putem infuza je od 0,01 do 0,11 $\mu\text{g/kg t.m.}$ i značajno je ispod tolerišućeg nedeljnog nivoa unosa Cd (5,8 $\mu\text{g Cd/kg t.m.}$ – JECFA/WHO i 2,5 $\mu\text{g Cd/kg t.m.}$ – EFSA). Iako sadržaj Cd u skoro svim uzorcima čaja prevazilazi preporučene vrednosti SZO i Ph.Eur. 8, određene koncentracije ovog toksičnog metala u infuzima su veoma niske i svega nekoliko procenata Cd prisutnog u herbi prelazi u infuz.

Putem infuza na bazi herbe kantariona unose se relativno niske količine Cd, ali budući da ovaj toksični metal ima kumulativno dejstvo i ove vrednosti treba uzeti u obzir pri proceni ukupnog unosa Cd iz različitih izvora.

ST JOHN'S WORT (*HYPERICUM PERFORATUM* L.) TEA AS A SOURCE OF EXPOSURE TO CADMIUM

**Milica Vasilov¹, Vladimir Berta¹, Sergej Jakimenko¹, Aleksandra Repić²,
Marijana Ćurčić¹, Zorica Bulat¹, Danijela Đukić-Ćosić¹**

¹Department of Toxicology „Akademik Danilo Soldatović”, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, ²Serbian Institute of Occupational Health „Dragomir Karajović”, Belgrade (Serbia)

St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) has been used in phytotherapy since the ancient times. The products based on its herb can be a source of cadmium (Cd) exposure since St. John's wort is a hyperaccumulator of this toxic metal. The aim of this study was to determine Cd content in commercially available St John's wort herbs and estimate the Cd intake via infusions.

Seven commercially available samples were collected (6 - bulk packaging, 1 - filter bags). Concentration of Cd in the investigated samples was determined after the microwave digestion (cHNO₃ i H₂O₂ (7:1)) by atomic absorption spectrophotometry with graphite furnace (GF-AAS). Cadmium concentration in infusions was determined by the same method, but without digestion. The tea infusions were prepared according to the instructions given on the packages. The estimation of the Cd intake was performed according to the EPA methodology. Cadmium content in the investigated herbs ranged from 0.42 to 1.34 mg/kg and was above the values suggested by WHO (0.3 mg/kg) and Ph. Eur. 8 (0.5 mg/kg). Cd concentrations in infusions ranged from 0.17 to 2.19 µg/L. Cd extraction from herb into infusion was 1.02 to 9.22%. Weekly intake of Cd via infusions ranged between 0.01 and 0.11 µg/kg b.w. Although Cd content in all the investigated herbs exceeded the values suggested by WHO and Ph. Eur. 8, concentration of Cd in infusions was very low. Only a few percent of Cd present in herb was extracted into the infusion.

This study suggested that Cd intake via St. John's wort herbal infusion is low. However, having in mind the cumulative properties of this toxic metal, the obtained results should be taken into account when assessing the total Cd intake from all the potential sources.