

Opstruktivna apneja u snu i kardiometabolički rizik

**Jelena Vekić*, Zorana Jelić-Ivanović, Aleksandra Zeljković,
Aleksandra Stefanović, Vesna Spasojević-Kalimanovska**

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za medicinsku biohemiju,
Vojvode Stepe 450, 11 221 Beograd, Srbija

* Autor za korespondenciju: Jelena Vekić, Tel. + 381 11 3951 266,
e-mail: jelena.vekic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Opstruktivna apneja u snu (OSA) je hronično progresivno oboljenje sa visokom prevalencom u populaciji koje, bez pravovremene dijagnoze i terapije, može dovesti do značajnih posledica po kvalitet života pacijenata. OSA je čest komorbiditet kod pacijenata sa metaboličkim sindromom (MS) i kardiovaskularnim bolestima (KVB) i predstavlja važan faktor rizika za nastanak ovih oboljenja, a prisustvo nelečenog, teškog oblika OSA povezano je sa porastom ukupnog i mortaliteta usled koronarnih događaja. Brojne studije su ukazale na vezu između MS i OSA, te je ovaj fenomen opisan kao poseban poremećaj - sindrom Z. Istraživanje uzročno-posledične veze između OSA i KVB je u velikoj meri otežano kompleksnom prirodom samog oboljenja. Smatra se da je kardiometabolički rizik u OSA udružen sa arterijskom hipertenzijom, insulinskom rezistencijom, endotelnom disfunkcijom, inflamacijom, dislipidemijom i oksidativnim stresom. Lečenje OSA se danas najefikasnije sprovodi neinvazivnom ventilacijom, pomoću uređaja koji obezbeđuje pozitivan pritisak u gornjim disajnim putevima (eng. *continuous positive airway pressure*, CPAP) i na taj način sprečava pojavu apneja tokom spavanja. Rezultati kliničkih studija su pokazali da CPAP terapija značajno poboljšava hemodinamske parametre, reguliše hipertenziju, povećava osetljivost na insulin i koriguje dislipidemiju. Buduća istraživanja bi trebalo da rasvetle da li je apneja u snu faktor rizika za KVB *per se* ili je ta veza posledica šireg patofiziološkog procesa, čiji je deo i OSA.

Ključne reči: intermitentna hipoksija, gojaznost; dislipidemija; metabolički sindrom

Uvod

Pod pojmom poremećaja disanja tokom spavanja podrazumevaju se kompleksna patofiziološka stanja koja se manifestuju intermitentnom hipoksijom (IH), povećanim respiratornim naporom i fragmentacijom sna. Ovi poremećaji se mogu javiti samostalno, ili mogu biti povezani sa drugim respiratornim, neurološkim, kardiovaskularnim ili endokrinim oboljenjima. Jedan od oblika poremećaja disanja tokom spavanja je i opstruktivna apneja u snu (OSA) za koju su karakteristične rekurentne epizode potpunog ili parcijalnog kolapsa gornjih respiratornih puteva tokom sna, što se manifestuje apnejom ili hipopnejom i učestalim buđenjima (1). Učestalost epizoda apneje kod pacijenata sa OSA može dostići i do sto ponavljanja u toku jednog sata, a razvoj respiratornog kolapsa pokreće aktivaciju simpatičkog nervnog sistema i sledstvenu vazokonstrukciju, što omogućava razvoj hipertenzije i poremećaja srčanog rada. Osim toga, loš kvalitet sna uzrokuje pospanost i umor u toku dana, što slabi psihomotorne sposobnosti (1). Prema savremenim procenama, oko 25% muškaraca i 10% žena u srednjem životnom dobu razvije neki od oblika poremećaja disanja u snu. Populaciona istraživanja pokazuju da je učestalost OSA kod žena 2%, a kod muškaraca 4% (2), dok je petogodišnja incidenca OSA 7,5% za tešku, odnosno 16% za blagu do umerenu formu bolesti (3). Međutim, realna učestalost ove bolesti u velikoj meri prevazilazi procenju, budući da se OSA često javlja udružena sa oboljenjima kao što su hipertenzija, dijabetes ili kongestivna srčana insuficijencija, te usled fokusa na ostala patofiziološka stanja, sama OSA u većini slučajeva ($\geq 85\%$) ostaje neprepoznata (1). Za razliku od situacije u razvijenim zemljama zapadne Evrope i SAD u kojima je ovaj zdravstveni problem prepoznat pre više od dve decenije, dijagnostika i lečenje OSA je relativna novina u našoj zemlji. Raspoloživi podaci govore da se u Srbiji od OSA leči oko 800 pacijenata, dok se broj obolelih procenjuje na više od 350 000 (4).

Iako je povezanost OSA sa rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB) prvi put uočena pre više od trideset godina, njeni mehanizmi još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (5). Poznato je da je učestalost OSA veća kod osoba sa metaboličkim i kardiovaskularnim poremećajima, te da OSA predstavlja važan faktor rizika za nastanak ovih oboljenja (6, 7). Osim toga, utvrđeno je i da je prisustvo teške, nelečene forme OSA povezano sa porastom ukupnog, kao i mortaliteta usled koronarnih događaja (8). Konačno, Američko udruženje kardiologa (eng. *American College of Cardiology*, ACC) i Američko udruženje za srce (eng. *American Heart Association*, AHA) prepoznali su važnost OSA u nastanku i progresiji KVB, te dali smernice za smanjenje kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta kod pacijenata sa OSA (7).

Gojaznost i OSA

Iako bi se moglo očekivati da anatomske abnormalnosti gornjih disajnih puteva igraju ulogu u nastanku respiratornog kolapsa u patogenezi OSA, opsežna istraživanja

sprovedena u tom pravcu dala su oprečne rezultate. Naime, kod najvećeg broja pacijenata nisu uočene nikakve karakteristične anatomske promene koje bi se mogle dovesti u vezu sa razvojem respiratornog kolapsa (9). Nasuprot tome, raspoloživi podaci su čvrsto i konzistentno upućivali na vezu između obima vrata, indeksa telesne mase (ITM) i obima struka s jedne strane, i stepena težine OSA s druge (9), sugerišući na taj način značajnu ulogu gojaznosti u nastanku ove bolesti. U prilog ovoj tvrdnji govore i rezultati ispitivanja u grupi gojaznih muškaraca (ITM=30 kg/m², bez drugih komorbiditeta) koji su demonstrirali da je kod 60% ispitanika prisutan neki od vidova poremećaja disanja u snu, dok su kriterijumi za dijagnozu OSA bili ispunjeni kod 27% učesnika u ovoj studiji (10). Raspoloživi podaci pokazuju da je čak 60-90% pacijenata sa OSA gojazno. Takođe, utvrđeno je da se rizik za nastanak OSA povećava 6 puta ukoliko se telesna težina poveća za 10% (11). Imajući u vidu dobro poznatu ulogu gojaznosti u razvoju KVB i OSA, postavljena je hipoteza da je nastanak oba oboljenja posredovan zajedničkim metaboličkim procesima, koji su inicirani prisustvom visceralne gojaznosti. Naime, smatra se da gojaznost kod pacijenata sa OSA dodatno dovodi do razvoja rezistencije na leptin (adipocitokin koji kontroliše apetit i utrošak energije, pa time reguliše telesnu masu), usled čega pacijent ulazi u začarani krug daljeg povećanja telesne mase (11), progresije OSA i povećanja rizika za razvoj KVB (12).

Još su najranija istraživanja ukazivala na složenu prirodu odnosa između OSA i KVB, ali je tek pre deset godina po prvi put utvrđeno da je metabolički sindrom (MS) poremećaj koji je zajednički za oba oboljenja. Kao što je poznato, MS obuhvata niz međusobno povezanih patofizioloških činilaca koji, dejstvujući udruženo, u velikoj meri povećavaju verovatnoću nastanka dijabetesa i KVB. Osim karakterističnih poremećaja metabolizma, koji uključuju smanjenu toleranciju na glukozu, prisustvo abdominalne gojaznosti i dislipidemiju, pacijenti sa MS se istovremeno nalaze i u prokoagulantnom i proinflatornom stanju, što dodatno uvećava rizik za nastanak komplikacija (13). Prethodne studije su jasno ukazale na povezanost pojedinačnih komponenti MS i OSA, zbog čega je istovremeno prisustvo oba stanja okarakterisano kao poseban poremećaj koji se naziva sindrom Z. Prisustvo ovog sindroma podrazumeva karakteristike MS (gojaznost centralnog tipa, hipertenzija, dijabetes i dislipidemija) udružene se apnejom u snu, a u medicini spavanja se povezuje sa povišenim rizikom za razvoj KVB (14).

Biohemijska osnova povišenog kardiometaboličkog rizika u OSA

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da je rizik za nastanak i progresiju ateroskleroze kod pacijenata sa OSA udružen sa prisustvom arterijske hipertenzije (15), metaboličkog sindroma (MS) (16), endotelne disfunkcije, dislipidemije, inflamacije i oksidativnog stresa (17) (Slika 1). Predloženi mehanizmi podrazumevaju niz međusobno povezanih procesa, čiji uzajamni odnosi još uvek nisu u potpunosti jasni.



Slika 1. Faktori rizika za razvoj ateroskleroze u OSA
Figure 1. Risk factors for the development of atherosclerosis in OSA

Endogeni činioci koji povezuju OSA sa razvojem ateroskleroze obuhvataju aktivaciju simpatikusa, IH, oksidativni stres i vaskularnu inflamaciju, koji nastaju kao posledica ponavljajućih ciklusa hipoksije i reoksigenacije (12). Aktivacija simpatikusa nastaje kao rezultat rekurentnih epizoda apneje/hipopneje, usled kojih dolazi do sniženja nivoa oksigenacije i razvoja hiperkapnije, a ovakvo učestalo pokretanje adrenalinskog odgovora dugoročno uslovljava pojavu hipertenzije. Poznato je da je oko 40% OSA pacijenata hipertenzivno, ali i da 30% hipertenzivnih osoba ima neprepoznatu OSA (12). Nadalje je utvrđeno da je OSA nezavisan faktor rizika za razvoj hipertenzije (18), dok je s druge strane hipertenzija važan prediktor neželjenih kardiopulmonarnih komplikacija kod pacijenata sa OSA (19). Značaj IH kao posledice rekurentnih apneja detaljno je ispitivan u studijama na animalnim modelima, dok je znatno manje podataka dobijeno u kliničkim istraživanjima. Rezultati dobijeni u studijama na eksperimentalnim životinjama pokazali su da su efekti IH na vaskulaturu u velikoj meri pojačani ukoliko

su prisutni i drugi faktora rizika za razvoj ateroskleroze, što se najčešće i dešava u realnim kliničkim situacijama (20).

Rezultati dobijeni analizom biomarkera oksidativnog stresa u serumu (21) i izdahnutom vazduhu (22) pacijenata sa OSA uticali su na generisanje novije hipoteze o ulozi oksidativnog stresa u nastanku kardiovaskularnih komplikacija u OSA. Istraživanja su pokazala da IH indukuje produkciju slobodnih radikala, koji zatim aktiviraju hipoksijom-inducibilne transkripcione faktore (HIF-1), što je naročito izraženo u fazi reoksigenacije (23). Ovim mehanizmom se reaktivna jedinjenja kiseonika uključuju u regulaciju aktivacije esencijalnih transkripcionih faktora, što rezultuje povećanjem ekspresije gena koji kodiraju proteine značajne za adaptaciju na uslove hipoksije (24). Sledeća značajna posledica hipoksijom posredovanog oksidativnog stresa u OSA je lipidna peroksidacija (25). Ovaj proces omogućava formiranje oksidovanih čestica lipoproteina niske gustine (LDL), koje su osnovni supstrat u procesu aterogeneze (5). U korist ove hipoteze govore rezultati *in vitro* studija koje su pokazale da IH povećava brzinu akumulacije lipida u makrofagama (26). Prisustvo viših koncentracija serumskih biomarkera lipidne peroksidacije i oksidovanih LDL čestica je potvrđeno i u kliničkim istraživanjima kod pacijenata sa OSA (27). Na kraju, pokazano je da su IH i slobodni kiseonični radikali u stanju da aktiviraju transkripcioni faktor NF- κ B (28), koji reguliše ekspresiju proinflammatoryh gena povezanih sa razvojem ateroskleroze (29). Proinflammatory stimuli aktiviraju endotelne ćelije, leukocite i trombocite koji ekspimiraju adhezione molekule i povećavaju produkciju citokina, a sve ovo zajedno dalje vodi ka oštećenju i disfunkciji endotela (5). Podaci kliničkih studija koji pokazuju da pacijenti sa OSA imaju značajno više koncentracije cirkulišućeg TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 i C-reaktivnog proteina (CRP) u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika (30, 31) potvrđuju eksperimentalne rezultate *in vitro* istraživanja. Nadalje, pokazano je da su serumske koncentracije intercelularnih i vaskularnih adhezivnih molekula (ICAM-1 i VCAM-1), te selektina L, E i P povišene kod pacijenata sa OSA (32). Pod uticajem svih prethodno navedenih činilaca, a uz sadejstvo vazokonstrikcije i prokoagulantnih faktora (12) razvija se oštećenje i sledstvena disfunkcija endotela, na šta ukazuju povišene koncentracija endotelina-1, a sniženi nivoi NO kod pacijenata sa OSA (33). Opisana kaskada događaja smatra se jednim od ključnih argumenata u prilog hipoteze da aterogeneza počinje istovremeno kad i OSA (24).

Brojna istraživanja su pokazala da su kod pacijenata sa OSA prisutne povišena koncentracija glukoze i rezistencija na insulin (34). Ponuđeno je nekoliko mogućih objašnjenja za uočeni razvoj insulinske rezistencije i smanjene sekrecije insulina usled IH u OSA. Najpre, rekurentne epizode apneje/hipopneje u OSA dovode, kao što je već objašnjeno, do aktivacije simpatikusa što snažno stimuliše lipolizu. Pretpostavlja se da slobodne masne kiseline posreduju u nastanku postreptorskog poremećaja prenosa

signala, što se manifestuje smanjenim preuzimanjem glukoze u ćelije skeletnih mišića i posledičnim razvojem insulinske rezistencije u OSA (35). Dodatno, kateholamini direktno stimulišu glikogenolizu u mišićima, kao i sekreciju glukagona, uz istovremenu supresiju sekrecije insulina (36). Osim toga, IH aktivira osovinu hipotalamus-hipofizakora nadbubrega, čime se povećava produkcija kortikosteroida, čiji efekti uključuju pojačan intenzitet lipolize, inhibiciju translokacije GLUT4 transportera na površinu mišićnih ćelija, supresiju sinteze glikogena i stimulaciju glukoneogeneze (36), što posreduje u nastanku insulinske rezistencije. Na kraju, IH uzrokuje promene u nivou adipocitokina, pre svega hiperleptinemiju, kao i sniženje koncentracije adiponektina (37).

Naredna značajna karika koja povezuje OSA i KVB odnosi se na patofiziološke promene u metabolizmu lipoproteina. Ako se ima u vidu da je najveći deo dokaza o prisustvu dislipidemije u OSA dobijen iz retrospektivnih opservacionih studija, teško je govoriti o direktnoj uzročno-posledičnoj vezi između promena u metabolizmu lipida i razvoja OSA. Većina pacijenata sa OSA ima povišene koncentracije ukupnog holesterola, LDL-holesterola i triglicerida (TG), a snižene koncentracije HDL-holesterola, iako neka istraživanja nisu pokazala prisustvo dislipidemije (36). Kao mogući uzrok ovako nekonzistentnih rezultata uzima se okolnost da ispitivanje lipidnog statusa nije bio specifičan cilj dosadašnjih istraživanja, tako da ove studije nisu bile adekvatno kontrolisane u smislu uticaja gojaznosti, načina ishrane i stepena fizičke aktivnosti ispitanika. Međutim, nasuprot kliničkim studijama, istraživanja na eksperimentalnim životinjama nedvosmisleno su pokazala da IH može direktno dovesti do razvoja dislipidemije. Sem toga, pokazano je da je stepen dislipidemije proporcionalan stepenu hipoksije (36).

Značajan faktor u razvoju dislipidemije kod eksperimentalno indukovane IH je pojačana sinteza i sekrecija lipoproteina vrlo niske gustine (VLDL) (5). Naime, pokazano je da pod dejstvom IH dolazi do aktivacije transkripcionog faktora SREBP-1c, te posledične aktivacije stearoil-KoA-desaturaze-1 (Δ^9 desaturaza) i konverzije zasićenih u mononezasićene masne kiseline, što će kasnije stimulisati esterifikaciju holesterola i TG, te formiranje VLDL čestica (38). Smatra se da je aktivnost desaturaze dodatno pojačana pod uticajem HIF-1 (23). Međutim, iako je utvrđeno da IH stimuliše sintezu VLDL čestica, dosadašnja istraživanja nisu dokazala da ishemija indukuje *de novo* sintezu masnih kiselina u jetri. Ranije je spomenuto da se pod uticajem IH aktivira simpatički nervni sistem, što može da uzrokuje stimulaciju lipolize u masnom tkivu (35). Pojačan priliv masnih kiselina, uz paralelnu inhibiciju β -oksidacije, dovodi do akumulacije lipida u jetri i posledične steatoze (36). Naredni mehanizam kojim se objašnjava nastanak dislipidemije u OSA je vezan za snižen klirens hilomikrona i VLDL čestica, koji nastaje kao rezultat inhibicije sinteze i aktivnosti enzima lipoproteinske lipaze (LPL) u uslovima IH (39). U ovako indukovanoj

hipertrigliceridemiji pojačana je razmena TG i estara holesterola između VLDL, LDL i HDL čestica, pod uticajem holesterol-estar transfernog proteina (CETP), te kao rezultat nastaju LDL i HDL čestice obogaćene TG. One su supstrat za hepatičnu lipazu (HL), što dovodi do pojačanog formiranja malih, gustih LDL (40), odnosno malih, disfunkcionalnih HDL čestica (41).

U ovom kontekstu važno je napomenuti da su male, guste LDL čestice jedna od ključnih komponenti MS. Iako prema nekim istraživačima OSA podstiče razvoj aterosogenog lipoproteinskog fenotipa nezavisno od MS, studije sprovedene u tom pravcu nisu dale konzistentne rezultate. U istraživanju Sopkove i saradnika (42) utvrđeno je da je prisustvo MS jedini značajan faktor uticaja na veličinu i raspodelu LDL subfrakcija. Nasuprot tome, studija Luyster-a i saradnika (43) je demonstrirala da je stepen težine OSA značajna determinanta proaterogenog LDL fenotipa. Pored toga, rezultati naše nedavne studije su pokazali da i genotip apolipoproteina E značajno utiče na veličinu i raspodelu LDL subfrakcija kod pacijenata sa OSA (44). Kada su u pitanju HDL čestice, plazmatski profil HDL subfrakcija i njihov funkcionalni kapacitet u OSA još uvek nisu dovoljno ispitani. Ipak, preliminarna istraživanja koje su objavili Tan i saradnici (45) ukazuju na kompromitovan antioksidativni kapacitet HDL čestica kod pacijenata sa OSA. Pretpostavlja se da je ovakva smanjena funkcionalnost HDL subfrakcija u OSA rezultat izmenjene strukture HDL čestica, koja se ogleda u smanjenom sadržaju antioksidanasa, kao i posledica inhibicije antioksidativnih enzima usled hipoksijom-indukovanog oksidativnog stresa (45). Važno je napomenuti da je do danas publikovana samo jedna studija koja je pokazala da preraspodela HDL subfrakcija ka manjim česticama u OSA nastaje kao rezultat prisustva insulinske rezistencije, a ne stepena hipoksije i težine oboljenja (46). Rezultati našeg nedavnog istraživanja su pokazali da veličina i raspodela HDL subfrakcija kod pacijenata sa OSA ne zavise od stepena težine bolesti, kao ni od genotipa apolipoproteina E (44).

Efekat terapije OSA na kardiometaboličke faktore rizika

Analiza povezanosti OSA i KVB u svakom slučaju treba da obuhvati i omogućiti efekat terapije ovog poremećaja na sve pomenute metaboličke faktore rizika. Savremeni tretman OSA se zasniva na neinvazivnoj ventilaciji pomoću uređaja koji obezbeđuje pozitivan pritisak u gornjim respiratornim putevima (eng. *continuous positive airway pressure*, CPAP), čime se sprečava apneja tokom spavanja. Dosadašnja istraživanja upućuju na zaključak da kod primene CPAP terapije treba imati u vidu i dugoročnu kardiovaskularnu prevenciju. Klinička ispitivanja efekata CPAP terapije su ukazala na značajno poboljšanje hemodinamskih parametara, bolju regulaciju hipertenzije, poboljšanje osetljivosti na insulin i korekciju dislipidemije (5, 12). Naime, redovna primena CPAP terapije sprečava kolaps gornjih disajnih puteva tokom sna i posledično dovodi do smanjenja učestalosti epizoda apneja i aktivacije simpatičkog nervnog

sistema, što se manifestuje smanjenjem krvnog pritiska i povećanjem osetljivosti na insulin. Takođe, manja učestalost aneja se povoljno odražava na stepen hipoksije, čime se smanjuje nivo oksidativnog stresa, a posledično i stepen inflamacije. Konačno, poboljšana osetljivost na insulin ostvaruje i pozitivan učinak na lipidni profil (16). Međutim, prijavljeni su i sporadični slučajevi neadekvatnog odgovora na terapiju, najverovatnije usled nedovoljne komplijanse, ili usled uticaja male veličine uzorka na primenjene metode statističke analize.

Zaključak

OSA je hronično progresivno oboljenje čija stvarna prevalenca u populaciji prevazilazi postojeće projekcije. Ukoliko se pravovremeno ne prepozna i ne leči, OSA može dovesti do značajnih zdravstvenih komplikacija i smanjenja kvaliteta života. Ipak, OSA još uvek nije adekvatno tretirana kao važan zdravstveni problem. Do sada akumulirano znanje, dobijeno kako u kliničkim, tako i u epidemiološkim istraživanjima, upućuje na to da bi skrining OSA trebalo sprovesti među gojaznim osobama, kao i pacijentima sa hipertenzijom, dislipidemijom i dijabetesom. Budući da je jedan od glavnih ciljeva preventivne medicine prepoznavanje pacijenata sa visokim rizikom za razvoj ateroskleroze, očigledno je da pravovremena identifikacija pacijenata sa OSA, nije važna samo u kontekstu ove bolesti, već i ukupnog metaboličkog i kardiovaskularnog zdravlja. Međutim, iako je izvesno da pacijenti sa OSA imaju povišen rizik za KVB, procena veličine i značaja uticaja izolovane bolesti na razvoj ateroskleroze otežana je zbog prisutnih komorbiditeta. Buduća istraživanja trebalo bi da razjasne da li je sama OSA faktor rizika za KVB, ili se njen uticaj ostvaruje posredstvom istovremeno prisutnog MS. Na kraju, buduće prospektivne studije trebalo bi da odgovore na pitanje da li terapija OSA ostvaruje efekat na progresiju ateroskleroze, te da li se na taj način može uticati na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet kod ovih pacijenata.

Zahvalnica

Autori su finansijski podržani sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Projekat br. 175035).

Literatura

1. Patil SP, Schneider H, Schwartz AR, Smith PL. Adult obstructive sleep apnea: pathophysiology and diagnosis. *Chest* 2007; 132: 325-37.
2. Lee W, Nagubadi S, Kryger MH, Mokhlesi B. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population-based perspective. *Expert Rev Respir Med* 2008; 2: 349-64.
3. Tishler PV, Larkin EK, Schluchter MD, Redline S. Incidence of sleep-disordered breathing in an urban adult population: the relative importance of risk factors in the development of sleep-disordered breathing. *JAMA* 2003; 289: 2230-37.
4. Popević M, Milovanović A. Sindrom opstruktivne apneje u spavanju – uticaj na prekomernu pospanost u vožnji i saobraćajni traumatizam. *Engrami* 2014; 36: 77-90.
5. Drager LF, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest* 2011; 140: 534-42.
6. Pamidi S, Aronsohn RS, Tasali E. Obstructive sleep apnea: role in the risk and severity of diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24: 703-15.
7. Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing. *Circulation* 2008; 118: 1080-111.
8. Kendzerska T, Gershon A, Hawker G, Leung RS, Tomlinson G. Obstructive sleep apnea and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: a decade-long historical cohort study. *PloS Med* 2014; 11: e1001599.
9. Vgontzas A, Bixler E, Chrousos G. Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome. *Sleep Medicine Reviews* 2005; 9: 211-24.
10. Punjabi NM, Sorkin JD, Katzell LI, Goldberg AP, Schwartz AR, Smith PL. Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 677-82.
11. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 2000; 284: 3015-21.
12. Jean-Louis G, Zizi F, Clark LT, Brown CD, McFarlane SI. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease: role of the metabolic syndrome and its components. *J Clin Sleep Med* 2008; 4: 261-72.
13. Grundy SM. Metabolic syndrome scientific statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2243-4.
14. Wilcox I, McNamara SG, Collins FL, Grunstein RR, Sullivan CE. Syndrome Z: the interaction of sleep apnoea, vascular risk factors and heart disease. *Thorax* 1998; 53: S25-8.
15. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *New Engl J Med* 2000; 342: 1378-84.

16. Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Wilding JP, Calverley PM. Cardiovascular and metabolic effects of CPAP in obese males with OSA. *Eur Respir J* 2007; 29: 720-7.
17. Lavie L. Oxidative stress – a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities. *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 51:303-12.
18. Young T, Peppard P, Palta M, Hla KM, Finn L, Morgan B, et al. Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1746-52.
19. Lavie P, Herer P, Hoffstein V. Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study. *BMJ* 2000; 320: 479-82.
20. Jun J, Reinke C, Bedja D, Berkowitz D, Bevens-Fonti S, et al. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010; 209: 381-6.
21. Barcelo A, Barbe F, de la Pena M, Vila M, Pérez G, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J* 2006; 27: 756–60.
22. Petrosyan M, Perraki E, Simoes D, Koutsourelakis I, Vagiakis E, et al. Exhaled breath markers in patients with obstructive sleep apnoea. *Sleep Breath* 2008; 12: 207-15.
23. Semenza GL, Prabhakar NR. HIF-1-dependent respiratory, cardiovascular, and redox responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1391-6.
24. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 2003; 7: 35-51.
25. Jun J, Savransky V, Nanayakkara A, Bevens S, Li J, Smith PL, Polotsky VY. Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295: R1274-81.
26. Lattimore JD, Wilcox I, Nakhla S, Langenfeld M, Jessup W, Celermajer DS. Repetitive hypoxia increases lipid loading in human macrophages - a potentially atherogenic effect. *Atherosclerosis* 2005; 179: 255-9.
27. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2004; 27: 123-8.
28. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2660-7.
29. de Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 904-14.
30. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, et al. The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One* 2010; 5: e12065.
31. Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Lanfranchi P, Wolk R, Kara T, et al. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2002; 105: 2462-4.
32. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecule expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 934-9.

33. Ip MS, Lam B, Chan LY, et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2166-71.
34. Punjabi NM, Polotsky VY. Disorders of glucose metabolism in sleep apnea. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1998-2007.
35. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 142-8.
36. Drager LF, Jun JC, Polotsky VY. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24: 843-51.
37. Magalang UJ, Cruff JP, Rajappan R, Hunter MG, Patel T, et al. Intermittent hypoxia suppresses adiponectin secretion by adipocytes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009; 117: 129-34.
38. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 91-104.
39. Drager LF, Li J, Shin MK, Reinke C, Aggarwal NR. Intermittent hypoxia inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins and inactivates adipose lipoprotein lipase in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Heart J* 2012; 33: 783-90.
40. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002 ;43: 1363-179.
41. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011; 17: 594-603.
42. Sopkova Z, Berneis K, Rizzo M, Spinass GA, Dorkova Z, et al. Size and subclasses of low-density lipoproteins in patients with obstructive sleep apnea. *Angiology* 2012; 63: 617-21.
43. Luyster FS, Kip KE, Drumheller OJ, Rice TB, Edmundowicz D, et al. Sleep apnea is related to the atherogenic phenotype, lipoprotein subclass B. *J Clin Sleep Med* 2012; 8: 155-61.
44. Vekic J, Joppa P, Habalova V, Tisko R, Zeljkovic A, Pobeha P, et al. Relationship between the apolipoprotein E genotype and LDL particle size in patients with obstructive sleep apnea. *Angiology* 2016; 67: 937-44.
45. Tan KC, Chow WS, Lam JC, Lam B, Wong W, et al. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis* 2006; 184: 377-82.
46. Liu A, Cardell J, Ariel D, Lamendola C, Abbasi F, et al. Abnormalities of lipoprotein concentrations in obstructive sleep apnea are related to insulin resistance. *Sleep* 2015; 38: 793-9.

Obstructive sleep apnea and cardiometabolic risk

Jelena Vekić*, Zorana Jelić-Ivanović, Aleksandra Zeljković,
Aleksandra Stefanović, Vesna Spasojević-Kalimanovska

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

* Corresponding author: Jelena Vekić, Tel. + 381 11 3951 266,
e-mail: jelena.vekic@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Obstructive sleep apnea (OSA) is a chronic, progressive disorder with a high prevalence in the population. Without timely diagnosis and therapy OSA can significantly affect the quality of life of the patients. OSA is a common co-morbidity in patients with metabolic syndrome (MS) and cardiovascular disease (CVD) and is an important risk factor for their development. The presence of untreated, severe OSA is associated with an increase in total and cardiovascular mortality. Numerous studies have pointed to the relationship between MS and OSA, and this phenomenon was described as syndrome Z. Investigation of the causal relationship between OSA and CVD has been greatly confounded by the complex nature of the disease itself. Cardiometabolic risk in OSA is associated with arterial hypertension, insulin resistance, endothelial dysfunction, inflammation, dyslipidemia, and oxidative stress. The treatment of OSA is now most effectively performed by continuous positive airway pressure (CPAP), a type of non-invasive ventilation which prevents the onset of sleep apnea. The results of clinical studies have shown that CPAP therapy significantly improves haemodynamic parameters, regulates hypertension, increases insulin sensitivity, and corrects dyslipidemia. Future investigations should clarify whether sleep apnea is a risk factor for CVD *per se* or is a consequence of a broader pathophysiological process, of which OSA is part.

Keywords: intermittent hypoxia, obesity; dyslipidemia; metabolic syndrome.

Evaluation of safety profile of the essential oils of eight *Heracleum* taxa (Apiaceae) related to determined furanocoumarin content

Ljuboš Ušjak^{1*}, Milica Drobac¹, Marjan Niketić², Silvana Petrović¹

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

²Natural History Museum, Njegoševa 51, 11000 Belgrade, Serbia

*Corresponding author. Ljuboš Ušjak, Tel.: +381 11 395 13 22,
e-mail: ljubos@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

For essential oils of roots, leaves, flowers and fruits of eight *Heracleum* taxa (*H. sphondylium*, *H. sibiricum*, *H. montanum*, *H. ternatum*, *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum*, *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii*, *H. verticillatum* and *H. orphanidis*), we previously demonstrated antimicrobial, cytotoxic (selective to cancer cells) and/or antioxidant activities. In this work, for these essential oils maximum daily intake related to total furanocoumarins (FCs) content was estimated, according to Committee on Herbal Medicinal Products of European Medicines Agency (EMA/HMPC) recommendations. FCs were quantified using gas chromatography, and their sum equivalent to xanthotoxin (8-methoxypsoralen, 8-MOP) was calculated. It was shown that daily intake, not contributing significantly to overall risk (equivalent to intake of 1.5 mg FCs) for root essential oils was in the range of 1.94-5.23 mL, for fruit oils of 5.23-15.68 mL and for leaf or flower oils of 2.90-15.68 mL. Daily intake, not posing any unacceptable risk (equivalent to intake of 15 µg FCs) for root oils was in the range of 0.02-0.05 mL, for fruit oils of 0.05-0.16 mL and for leaf or flower oils of 0.03-0.16 mL. This work demonstrates the application of current EMA/HMPC recommendations, in order to establish safety profile of herbal preparations containing FCs.

Keywords: *Heracleum*, essential oils, furanocoumarins, 8-MOP, safety profile

Introduction

The genus *Heracleum* L. is among the largest ones in the Apiaceae family, with more than 120 taxa distributed mainly in Eurasia, where these plants are occasionally used in traditional medicine and/or as food (1). In the Balkan Peninsula, the infusion prepared from roots, leaves or fruits, powdered roots or leaf juice from common cow parsnip („mečja šapa” in Serbian), *H. sphondylium* L. and related species were traditionally used to treat digestive disorders, epilepsy, hypertension, respiratory infections and inflammations, skin infections, sexual weakness etc. (2). In addition, the consumption of the roots, and young leaves and stems of *H. sphondylium*, *H. sibiricum* L. and *H. pyrenaicum* Lam. is suggested in some survival handbooks (3).

In the focus of this study are eight representatives of the type section of the genus (*H. sect. Heracleum*), seven belonging to the *H. sphondylium* group (*H. sphondylium*, *H. sibiricum*, *H. montanum* Schleich. ex Gaudin, *H. ternatum* Velen., *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (Bertol.) F. Pedrotti & Pignatti, *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* (Guss.) F. Pedrotti & Pignatti and *H. verticillatum* Pančić), as well as *H. orphanidis* Boiss. For the purpose of our research, the plants were collected in Southeastern Europe (Serbia, Montenegro, North Macedonia and Slovenia), however, most of them are also native in some other parts of Europe, except *H. verticillatum* and *H. orphanidis*, which are endemic species of central Balkan (4,5). In previous researches, we analyzed the chemical composition of essential oils of different organs of these plants by GC-FID and GC-MS, and demonstrated their antimicrobial, cytotoxic (selective to cancer cell lines) and/or antioxidant activities (6-12).

Furanocoumarins (FCs) are present in certain amounts in many Apiaceae plants, including some vegetables (e.g. parsnip, *Pastinaca sativa* L., celery, *Apium graveolens* L., and parsley, *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss), as well as in the fruits from the Rutaceae family (e.g. lime, *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle and grapefruit, *Citrus paradisi* Macfad.) (13,14). FCs are known as photosensibilizing agents. Some of them, e.g. xanthotoxin (8-methoxypsoralen, 8-MOP) and bergapten (5-methoxypsoralen, 5-MOP), are used in combination with UVA radiation, in PUVA therapy of severe vitiligo and psoriasis. In higher concentrations, FCs can cause acute skin reactions (photodermatitis), mainly manifested as pigmentation, erythema, itching and blisters (1,15). Also, several cohort and case-control studies led to conclusion that PUVA therapy can cause squamous cell skin cancer in a dose- and time-dependent manner (15). For example, in a study of Hannuksela-Svahn et al. (16), the number of patients needed to be treated with PUVA to result in one extra case of this type of skin cancer was 3030. Therefore, the Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) of the European Medicines Agency (EMA) issued the document on the risks associated with FCs contained in preparations of angelica, *Angelica archangelica* L. (Apiaceae), in which maximum daily intake of FCs through herbal medicinal products is given. Daily

exposure of 1.5 mg FCs expressed as 8-MOP through herbal medicinal products is not considered to contribute significantly to overall risk, and the intake of 15 µg is not considered to pose any unacceptable risk to consumers (15).

Thus, the aim of this work was to quantify FCs in *Heracleum* essential oils using external standard method, to calculate total FCs equivalent to 8-MOP and estimate maximum daily intake of investigated oils, according to current EMA/HMPC recommendations.

Experimental

Furanocoumarin (FC) standards

Commercial standards of xanthotoxin (8-MOP, purity $\geq 98\%$), bergapten (5-MOP, $\geq 99\%$) and isopimpinellin ($\geq 95\%$) were obtained from Sigma-Aldrich (USA).

Heracleum essential oils

From roots, leaves, flowers and fruits of eight investigated *Heracleum* taxa (localities and years of collection are integrated in **Table II**), essential oils were isolated by hydrodistillation in Clevenger-type apparatus for 2.5 h. The essential oil yields, as well as the relative percentages of essential oils compounds, determined by GC-FID and GC-MS, were previously published. Besides different monoterpenes, sesquiterpenes, phenylpropanoids and/or aliphatic esters, in 32 out of 56 analyzed essential oils, small amounts (up to 0.8%) of FCs were detected (6-12). In this work, the quantities of FCs were determined by the external standard method.

Quantifications of FCs by external standard method and calculation of the sum of FCs equivalent to 8-MOP

FCs in *Heracleum* essential oils were analyzed on an Agilent 6890N Gas Chromatograph equipped with a split/splitless injector (200 °C), a FID detector and an Agilent HP-5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 µm film thickness), and coupled with an Agilent 5975C mass selective detector (MSD), operating in the EI mode at 70 eV. The FID and MSD transfer line temperatures were 300 and 250 °C, respectively. The carrier gas was He, flow 1.0 mL/min. The oven temperature was programmed linearly, increasing from 60 to 280 °C at 3 °C/min. Split ratio was 1:10. For quantification of bergapten and isobergapten, the calibration curve of bergapten standard was prepared, and in the case of isopimpinellin and pimpinellin, the calibration curve of isopimpinellin standard was used. As proposed by EMA/HMPC (15), the sum of FCs equivalent to 8-MOP was calculated, using the calibration curve of 8-MOP standard. Regression equations, r^2 , linear ranges, and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the FCs are given in **Table I**. LODs and LOQs were

determined using the standard deviations of the intercepts (SD_b), and the slopes (a), in the following way (17):

$$LOD = 3.3 \times SD_b/a$$

$$LOQ = 10 \times SD_b/a$$

In calculation of the sum of FCs equivalent to 8-MOP, LOQ value of 8-MOP (0.096 mg/mL) was used for those FCs, which content was bellow LOQ of 8-MOP.

Table I Regression equations, r^2 , linear ranges, and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of bergapten (5-MOP), isopimpinellin and xanthotoxin (8-MOP)

Compound	Regression equation	Linear range (mg/mL)	r^2	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
5-MOP	$y = 886362.4975x - 11498.5262$	0.025-2.0	0.9998	0.022	0.066
Isopimpinellin	$y = 901889.1029x - 24658.5002$	0.04-1.6	0.9991	0.041	0.124
8-MOP	$y = 931332.3162x - 17221.4947$	0.02625-2.1	0.9996	0.032	0.096

Results

In this work, maximum daily intake related to determined FCs content of 32 samples of essential oils of different plant organs of eight *Heracleum* taxa (*H. sphondylium*, *H. sibiricum*, *H. montanum*, *H. ternatum*, *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum*, *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii*, *H. verticillatum* and *H. orphanidis*) was estimated. In **Table II**, quantities of individual FCs, the sum of FCs equivalent to 8-MOP, and daily intakes that are not considered to contribute significantly to overall risk, as well as to pose any unacceptable risk, according to EMA/HMPC recommendations (15), for investigated essential oil are presented.

Table II Quantities of individual furanocoumarins (FCs) in investigated *Heracleum* essential oils (mg/mL), the sum of FCs equivalent to 8-MOP (mg/mL), and daily intakes of the oils (V_{EO} , mL) that are not considered to contribute significantly to overall risk (equivalent to intake of 1.5 mg FCs) and to pose any unacceptable risk (equivalent to intake of 15 μ g FCs)

Essential oil (EO)	Furanocoumarins (FCs) ^a				Sum of FCs eq. to 8-MOP	V_{EO} (mL) eq. to 1.5 mg FCs	V_{EO} (mL) eq. to 15 μ g FCs
	1	2	3	4			
Roots							
<i>H. sphondylium</i> /Litija, Krško (SVN)/2015	0.10	<LOQ ^b	0.12	<LOQ	0.42	3.54	0.04
<i>H. sibiricum</i> /Niš (SRB)/2011	0.24	0.11	0.31	<LOQ	0.77	1.94	0.02
<i>H. sibiricum</i> /Niš (SRB)/2013	0.15	0.09	0.17	<LOQ	0.53	2.85	0.03
<i>H. sibiricum</i> /Žarkova Čuka, Mts Stara Planina (SRB)/2012	0.08	<LOQ	0.12	<LOQ	0.41	3.62	0.04
<i>H. sibiricum</i> /Arbinje, Mts Stara Planina (SRB)/2014	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d. ^c	0.29	5.23	0.05
<i>H. montanum</i> /Kamnik-Savinja Alps (SVN)/2015	0.14	<LOQ	0.17	<LOQ	0.50	2.99	0.03
<i>H. ternatum</i> /Mt Durmitor (MNE)/2013	0.08	<LOQ	0.14	<LOQ	0.43	3.46	0.03
<i>H. pyrenaicum</i> subsp. <i>pollinianum</i> /Mt Bistra (MKD)/2010	0.10	<LOQ	0.14	<LOQ	0.44	3.38	0.03
<i>H. p.</i> subsp. <i>pollinianum</i> /Mt Galičica (MKD)/2012	0.17	0.18	0.20	<LOQ	0.66	2.29	0.02
<i>H. p.</i> subsp. <i>pollinianum</i> /Mt Jablanica (MKD)/2015	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.38	3.92	0.04
<i>H. p.</i> subsp. <i>orsinii</i> /Mt Durmitor (MNE)/2013	0.09	<LOQ	0.16	<LOQ	0.45	3.31	0.03
<i>H. verticillatum</i> /Vražja Glava, Mts St. Planina (SRB)/2010	0.16	0.10	0.38	<LOQ	0.76	1.99	0.02
<i>H. verticillatum</i> /Arbinje, Mts Stara Planina (SRB)/2012	0.08	<LOQ	0.15	<LOQ	0.44	3.38	0.03
<i>H. verticillatum</i> /Arbinje, Mts Stara Planina (SRB)/2014	0.10	<LOQ	0.19	<LOQ	0.49	3.07	0.03
<i>H. orphanidis</i> /Mt Baba Planina (MKD)/2012	n.d.	n.d.	0.40	<LOQ	0.53	2.83	0.03

Essential oil (EO)	Furanocoumarins (FCs) ^a				Sum of FCs eq. to 8-MOP	V _{EO} (mL) eq. to 1.5 mg FCs	V _{EO} (mL) eq. to 15 µg FCs
	1	2	3	4			
Fruits							
<i>H. sphondylium</i> /Litija and Krško (SVN)/2015	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	0.10	15.68	0.16
<i>H. sibiricum</i> /Niš (SRB)/2011	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.19	7.84	0.08
<i>H. sibiricum</i> /Niš (SRB)/2014	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	0.10	15.68	0.16
<i>H. sibiricum</i> /Žarkova Čuka, Mts Stara Planina (SRB)/2012	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.19	7.84	0.08
<i>H. sibiricum</i> /Arbinje, Mts Stara Planina (SRB)/2014	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.19	7.84	0.08
<i>H. montanum</i> /Kamnik-Savinja Alps (SVN)/2015	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	0.10	15.68	0.16
<i>H. ternatum</i> /Mt Durmitor (MNE)/2013	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	0.10	15.68	0.16
<i>H. ternatum</i> /Mt Durmitor (MNE)/2014	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	0.10	15.68	0.16
<i>H. pyrenaicum</i> subsp. <i>pollinianum</i> /Mt Galičica (MKD)/2012	< LOQ	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.29	5.23	0.05
<i>H. p.</i> subsp. <i>orsinii</i> /Mt Durmitor (MNE)/2011	< LOQ	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.29	5.23	0.05
<i>H. p.</i> subsp. <i>orsinii</i> /Mt Durmitor (MNE)/2013	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	0.10	15.68	0.16
<i>H. verticillatum</i> /Vražja Glava, Mts St. Planina (SRB)/2010	< LOQ	n.d.	0.16	n.d.	0.26	5.76	0.06
<i>H. verticillatum</i> /Arbinje, Mts Stara Planina (SRB)/2012	< LOQ	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.29	5.23	0.05
<i>H. verticillatum</i> /Arbinje, Mts Stara Planina (SRB)/2013	< LOQ	< LOQ	< LOQ	n.d.	0.29	5.23	0.05
Leaves							
<i>H. pyrenaicum</i> subsp. <i>pollinianum</i> /Mt Galičica (MKD)/2012	n.d.	0.07	n.d.	n.d.	0.10	15.68	0.16
<i>H. verticillatum</i> /Arbinje, Mts Stara Planina (SRB)/2014	< LOQ	< LOQ	0.30	n.d.	0.52	2.90	0.03
Flowers							
<i>H. montanum</i> /Kamnik-Savinja Alps (SVN)/2015	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	0.10	15.68	0.16

^a FCs: 1 - isobergapten, 2 - bergapten, 3 - pimpinellin, 4 - isopimpinellin. ^b LOQ - limit of quantification: bergapten, isobergapten < 0.07 mg/mL; isopimpinellin, pimpinellin < 0.12 mg/mL. ^c n.d. - not detected. SVN - Slovenia, SRB - Serbia, MNE - Montenegro, MKD - North Macedonia.

Root essential oils

Pimpinellin was detected in all 15 investigated root oils, and it was the dominant FC in 13 of them (0.12-0.40 mg/mL), while in remaining two, all detected FCs were present in quantities bellow LOQ. Isobergapten, bergapten and isopimpinellin were detected in 14 root oils. Isobergapten was the second most abundant FC in 12 root oils (0.08-0.24 mg/mL), and bergapten in *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (from Mt Galičica) root oil (0.18 mg/mL). Isopimpinellin was always present in quantity bellow LOQ. Among all investigated *Heracleum* essential oils, those of the roots contained the highest amounts of total FCs equivalent to 8-MOP (0.29-0.77 mg/mL). According to current recommendations, daily intake of these essential oils, not considered to contribute significantly to overall risk, ranged from 1.94 mL to 5.23 mL, and daily intake, not considered to pose any unacceptable risk, ranged from 0.02 to 0.05 mL.

Fruit essential oils

Except in one sample of *H. verticillatum* fruit essential oil (which contained 0.16 mg/mL of pimpinellin), in remaining 13 analyzed fruit oils FCs were present in quantities bellow LOQ. Bergapten was not detected only in one of the 14 fruit oils, and in six of them it was the only detected FC. The sum of FCs equivalent to 8-MOP in fruit oils was in the range 0.10-0.29 mg/mL, and consequently, their daily intakes not considered to contribute significantly to overall risk (5.23-15.68 mL) and to pose any unacceptable risk (0.05-0.16 mL), were higher compared to root essential oils.

Leaf and flower essential oils

Heracleum montanum flower oil contained only pimpinellin (< LOQ), and *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* leaf oil only bergapten (0.07 mg/mL). On the other hand, *H. verticillatum* leaf oil, besides these two FCs also contained isobergapten, and had 0.52 mg/mL of total FCs equivalent to 8-MOP. Daily intakes of *H. verticillatum* leaf oil not considered to contribute significantly to overall risk and to pose any unacceptable risk were 2.90 and 0.03 mL, and of both *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* leaf and *H. montanum* flower oils were 15.68 and 0.16 mL.

Discussion

Despite widespread opinion that medicinal products originating from plants are safe, some of them can contain various constituents of toxicological concern. Such substances include e.g. estragole in basil herb, *Basilici herba*, bitter/sweet fennel, *Foeniculi amari/dulcis fructus* and aniseed, *Anisi fructus*, thujone in sage leaf, *Salviae officinalis folium* and wormwood herb, *Absinthii herba*, and pyrrolizidine alkaloids in comfrey root, *Symphyti radix*, as well as FCs in angelica root, *Angelicae archangelicae*

radix. For these compounds, EMA/HMPC established maximum daily intakes (15,18-20).

In reflection paper on the risks associated with FCs contained in preparations of angelica, limits of daily intake of FCs (through herbal medicinal products) based on two different approaches were suggested. The first approach is based on average dietary exposure to FCs, which is 1.45 mg (as mentioned before, FCs are normally present in certain quantities in some vegetables from the Apiaceae family and fruits from the Rutaceae family). An additional daily intake of 1.5 mg through herbal medicinal products is not considered to contribute significantly to overall risk, since phototoxic reactions can be expected after intake of more than 14-15 mg FCs, in the presence of UV irradiation. This scenario can occur for example after consumption of some wild plants, because cultivated vegetables and fruits usually contain lower amounts of FCs (13,15,21). The second approach is based on the thresholds for toxicological concern (TTC) concept, originally intended for potentially genotoxic and carcinogenic impurities of pharmaceuticals, which implies thresholds of maximally 120 µg (for exposure lasting one month and less) and 1.5 µg (for life-time exposure). However, based on current trends of use of herbal medicinal products and the doses of 8-MOP used in PUVA treatment, EMA/HMPC defined the daily intake margin of 15 µg FCs through herbal medicinal products as the one not considered to pose any unacceptable risk. It was also suggested to express FC limits in 8-MOP equivalents, and stressed out that the calculation of the sum of FCs to be equivalent to 8-MOP may present the worst-case scenario, i.e. an extra margin of safety would be provided (15).

Since different pharmacological activities for investigated *Heracleum* essential oils were previously demonstrated, determination of maximum daily intake related to FCs content was necessary as the precondition for their further investigations as potential new medicinal herbal raw materials, and in general, is an example of evaluation of safety profile of herbal preparations containing FCs according to current EMA/HMPC recommendations.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (grant number 173021).

References

1. Skalicka-Woźniak K, Grzegorzczak A, Świątek Ł, Walasek M, Widelski J, Rajtar B, et al. Biological activity and safety profile of the essential oil from fruits of *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae). *Food Chem Toxicol.* 2017 Nov;109:820-6.
2. Lesinger I. Kućna biljna ljekarna. Rijeka: Adamić; 2006. 315 p.
3. Vračarić B, Bakić J, Čolić D, Lintner V, Micković M, Rajšić R, et al. Ishrana u prirodi. Belgrade: Vojnoizdavački zavod; 1977. 64 p.
4. Mandenova IP. *Heracleum* L. In: Schischkin BK, editor. Flora of the U.S.S.R., Vol. 17. Moscow, Leningrad: Botanical Institute of the Academy of Sciences of the USSR; 1951. p. 222-60.
5. Brummitt RK. *Heracleum* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, editors. Flora Europaea, Vol. 2. London: Cambridge University Press; 1968. p. 364-6.
6. Ušjak L, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Ćirić A, Niketić M. Chemical composition and bioactivity of the essential oils of *Heracleum pyrenaicum* subsp. *pollinianum* and *Heracleum orphanidis*. *Nat Prod Commun.* 2016 Apr;11(4):529-34.
7. Ušjak L, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Ćirić A, et al. Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activity of *Heracleum verticillatum* Pančić and *H. ternatum* Velen. (Apiaceae) essential oils. *Chem Biodiversity.* 2016 Mar;13(4):466-76.
8. Ušjak L, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Ćirić A, Niketić M. Essential oils of three cow parsnips – composition and activity against nosocomial and foodborne pathogens and food contaminants. *Food Funct.* 2017;8(1):278-90.
9. Ušjak L, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Ćirić A, Niketić M. Edible wild plant *Heracleum pyrenaicum* subsp. *orsinii* as a potential new source of bioactive essential oils. *J Food Sci Technol.* 2017 Jul;54(8):2193-202.
10. Ušjak L, Petrović S, Drobac M, Niketić M. DPPH scavenging activity of the fruit essential oils of six *Heracleum* L. taxa (Apiaceae). *Book of Abstracts of 2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2015); 2015 Oct 14-17; Plovdiv, Bulgaria; 314 p.*
11. Ušjak L, Drobac M, Niketić M, Petrović S. DPPH radical scavenging potential of the root essential oils of five *Heracleum* L. taxa. *Book of Abstracts of 7th Balkan Botanical Congress (7BBC 2018); 2018 Sep 10-14; Novi Sad, Serbia; 131 p. (Botanica Serbica; Vol. 42, suppl. 1).*
12. Ušjak L, Drobac M, Niketić M, Petrović S. Chemosystematic significance of essential oil constituents and furanocoumarins of underground parts and fruits of nine *Heracleum* L. taxa from Southeastern Europe. *Chem Biodiversity.* 2018 Dec;15(12):e1800412.
13. Peroutka R, Schulzová V, Botek P, Hajšlová J. Analysis of furanocoumarins in vegetables (Apiaceae) and citrus fruits (Rutaceae). *J Sci Food Agric.* 2007 Jun;87(11):2152-63.
14. Vogl S, Zehl M, Picker P, Urban E, Wawrosch C, Reznicek G, et al. Identification and quantification of coumarins in *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS. *J Agric Food Chem.* 2011 Mar;59(9):4371-7.

15. European Medicines Agency. EMA/HMPC/317913/2006. Reflection paper on the risks associated with furocoumarins contained in preparations of *Angelica archangelica* L. London: 31 October 2007.
16. Hannuksela-Svahn A, Pukkala E, Läärä E, Poikolainen K, Karvonen J. Psoriasis, its treatment, and cancer in a cohort of Finnish patients. *J Invest Dermatol.* 2000 Mar;114(3):587-90.
17. International Conference on Harmonisation (ICH). ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Geneva: ICH, 2005.
18. European Medicines Agency. EMEA/HMPC/137212/2005. Public statement on the use of herbal medicinal products containing estragole. London: 23 November 2005.
19. European Medicines Agency. EMA/HMPC/732886/2010 Rev.1. Public statement on the use of herbal medicinal products containing thujone. London: 22 May 2012.
20. European Medicines Agency. EMA/HMPC/893108/2011. Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs). London: 24 November 2014.
21. DFG-SKLM. Toxikologische Beurteilung von Furocumarinen in Lebensmitteln. In: Eisenbrand G, editor. *Lebensmittel und Gesundheit II. Sammlung der Beschlüsse und Stellungnahmen/Opinions (1997-2004)*. Weinheim: Wiley-VCH; 2005. p. 55-87.

Procena bezbednosnog profila etarskih ulja osam taksona roda *Heracleum* (Apiaceae) u odnosu na utvrđeni sadržaj furanokumarina

Ljuboš Ušjak^{1*}, Milica Drobac¹, Marjan Niketić², Silvana Petrović¹

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

²Prirodnjački muzej, Njegoševa 51, 11000 Beograd, Srbija

*Autor za korespondenciju: Ljuboš Ušjak Tel.: +381 11 395 13 22;
e-mail: ljubos@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Za etarska ulja korena, listova, cvasti i plodova osam taksona roda *Heracleum* (*H. sphondylium*, *H. sibiricum*, *H. montanum*, *H. ternatum*, *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum*, *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii*, *H. verticillatum* i *H. orphanidis*) prethodno su pokazane antimikrobna, citotoksična (selektivna prema tumorskim ćelijama) i/ili antioksidantna aktivnost. Cilj ovog rada bio je da se ustanovi maksimalni dozvoljeni dnevni unos etarskih ulja u odnosu na utvrđeni sadržaj ukupnih furanokumarina, u skladu sa preporukama Komiteta za biljne lekovite proizvode Evropske agencije za lekove (EMA/HMPC). Furanokumarini su kvantifikovani gasnom hromatografijom i njihov ukupni sadržaj izražen je kao ksantotoksin (8-metoksipsoralen, 8-MOP). Dnevni unos ispitivanih etarskih ulja koji ne doprinosi značajno ukupnom riziku (ekvivalentan unosu 1,5 mg furanokumarina izraženih kao 8-MOP), kreće se u opsegu 1,94-5,23 mL za etarska ulja korena, 5,23-15,68 mL za ulja plodova i 2,90-15,68 mL za ulja listova ili cvasti. Dnevni unos etarskih ulja koji ne predstavlja nikakav rizik (ekvivalentan unosu 15 µg furanokumarina izraženih kao 8-MOP), kreće se u opsegu 0,02-0,05 mL za etarska ulja korena, 0,05-0,16 mL za ulja plodova i 0,03-0,16 mL za ulja listova ili cvasti. Ovaj rad demonstrira primenu aktuelnih EMA/HMPC preporuka u cilju utvrđivanja bezbednosnog profila biljnih preparata u kojima su detektovani furanokumarini.

Ključne reči: *Heracleum*, etarska ulja, furanokumarini, 8-MOP, bezbednosni profil

Izazovi *in vitro* karakterizacije nebioloških kompleksnih lekova - primer parenteralnih preparata sa liposomskim nosačima lekovitih supstanci

Danina Krajišnik*, Jela Milić, Snežana Savić

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

*Autor za korespondenciju: Danina Krajišnik

e-mail: danina.krajisnik@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Parenteralnim putem se primenjuju različiti tipovi farmaceutskih preparata čiji sastav može biti jednostavan (vodeni rastvori) i manje ili više kompleksan (emulzije, suspenzije, liposomi kao nosači lekovitih supstanci, čestični sistemi, čvrsti implanti/implantati). Napredak u bio- i nanotehnologiji omogućio je razvoj nove klase kompleksnih lekova, bioloških i tzv. nebioloških kompleksnih lekova (i njihovih „similarna“- sličnih lekova), čiji dalji razvoj se očekuje u bliskoj budućnosti, a koji se, u velikom broju slučajeva, primenjuju parenteralnim putem.

Parenteralni preparati koji u svom sastavu sadrže lekovite supstance koje su inkapsulirane u nosače tipa liposoma predstavljaju nebiološke kompleksne lekove koji su do sada najduže u upotrebi i čije su osobine i definisana svojstva kvaliteta najviše ispitivana. U radu je dat pregled obaveznih i dodatnih (specifičnih) *in vitro ispitivanja* liposomskih nosača lekovitih supstanci za primenu parenteralnim putem. Činjenica da postupci izvođenja ovih ispitivanja u osnovi nisu propisani u relevantnim farmakopejama (Ph. Eur., USP i JP) i da se mogu značajno razlikovati između laboratorija, doprinosi velikoj varijabilnosti dobijenih rezultata i ograničenjima u njihovom međusobnom poređenju. Regulatorna tela EMA i FDA učestvovala su u pripremi određenih dokumenata i razvoju odgovarajućih standarda i smernica u pogledu ispitivanja kvaliteta farmaceutskih oblika sa liposomskim nosačima lekovitih supstanci za parenteralnu primenu.

Ključne reči: parenteralni preparati; nebiološki kompleksni lekovi; liposomi;
in vitro karakterizacija

Uvod

Parenteralni put primene lekova je najprihvatljiviji i najpraktičniji kada (per)oralna primena nije moguća i najčešći je put primene lekova u bolničkim uslovima. Pored toga, ovaj put primene je primarni za peptide, lekove proteinske prirode (biološke lekove) i mnoge hemoterapeutike, kao i određene lekove u terapiji urgentnih stanja (1, 2). Poslednjih godina sa razvojem nanotehnologije, omogućen je dizajn raznovrsnih nanomaterijala koji u sastavu odgovarajućih nanoterapeutika mogu da, između ostalog, obezbede ciljanu isporuku lekova, poboljšaju rastvorljivost lekovitih supstanci, produže poluvreme eliminacije leka, smanje imunogenost leka, odnosno doprinesu značajnom unapređenju terapije mnogih bolesti (3, 4). Najveći broj nanoterapeutika, koji su dobili dozvolu za stavljanje u promet/„registrovani lekovi” sadrži liposome, nanokristale, virosome, nanoemulzije, polimer-protein konjugate, polimerne lekove, nanokomplekse i nanočestice i najveći broj se primenjuje upravo parenteralnim putem. Pomenuti predstavnici nanoterapeutika svrstavaju se i u grupu nebioloških kompleksnih lekova (engl. *Non-Biological Complex Drugs, NBCDs*), koji su veoma aktuelni u poslednjih nekoliko godina (5).

Poznato je da parenteralni preparati moraju ispuniti stroge zahteve za kvalitet. Uporedo sa razvojem tehnologija za proizvodnju savremenih farmaceutskih oblika sa specifičnim nosačima lekovitih supstanci za parenteralnu primenu, razvijale su se i metode za njihovu karakterizaciju. Pored fizičko-hemijskih, mikrobioloških i farmaceutsko-tehnoloških ispitivanja koja su uobičajena za konvencionalne farmaceutske oblike za parenteralnu primenu, u literaturi se navodi veći broj ispitivanja predviđenih za ispitivanje farmaceutskih oblika sa specifičnim nosačima lekovitih supstanci. Postupci izvođenja ovih ispitivanja često nisu oficijalni i mogu se značajno razlikovati između laboratorija, što doprinosi velikoj varijabilnosti dobijenih rezultata i ograničenjima u njihovom međusobnom poređenju.

Potreba za usaglašenim i odgovarajućim standardima neophodnim u postupku podnošenja zahteva za dobijanje dozvole, nadzorom nad tržištem i slobodnim kretanjem i prometom lekova u što većem broju zemalja, prepoznata je u harmonizaciji između Evropske farmakopeje (Ph. Eur.), Američke farmakopeje (USP) i Japanske farmakopeje (JP) kao važan i izazovan zadatak. Takođe, regulatorna tela Evropska agencija za lekove (EMA) i Američka uprava za hranu i lekove (FDA) su učestvovala u pripremi određenih dokumenata i razvoju odgovarajućih standarda i smernica u pogledu ispitivanja kvaliteta savremenih farmaceutskih oblika/„nosača” koji se primenjuju parenteralnim putem (6).

Nebiološki kompleksni lekovi

Nebiološki kompleksni lekovi su lekovi nebiološkog porekla (u potpunosti su sintetski materijali), koji se sastoje iz većeg broja blisko povezanih, najčešće nanočestičnih jedinica. U sastavu nebioloških kompleksnih lekova ne postoji aktivna

supstanca u konvencionalnom smislu (homomolekularne strukture), koja može biti izolovana, kvantifikovana i u potpunosti okarakterisana i/ili opisana primenom savremenih fizičko-hemijskih i analitičkih tehnika i nije poznato koji deo u strukturi je odgovoran za terapijsko dejstvo, tako da se čitav kompleks posmatra kao aktivna supstanca (10-12). Nebiološki kompleksni lekovi ne ostvaruju svoje dejstvo direktno, vezivanjem za receptore, kao većina aktivnih supstanci male molekulske mase. Oni sadrže nanočestice iz kojih se aktivna supstanca oslobađa ili formira, prenosi na mesto dejstva i tek onda ostvaruje terapijski efekat. Čak i male razlike u isporuci aktivne supstance, npr. usled razlika u strukturi ili uređenosti nebiološkog kompleksnog leka, mogu da izmene njihovu efikasnost i bezbednost. Kao i u slučaju bioloških lekova, sastav, kvalitet i *in vivo* osobine nebioloških kompleksnih lekova u velikoj meri zavise od proizvodnog procesa za dobijanje aktivne supstance, kao i (u većini slučajeva) sastava formulacije (5, 12). Pokazano je da neznatne varijacije u proizvodnom procesu mogu značajno promeniti sastav finalnih proizvoda, što dalje može uticati na bezbednost i efikasnost ovih lekova (13).

U radu Cromellin i sar. (7)¹, navodi se da ova grupa lekova obuhvata različite predstavnike (engl. „*medicine-families*”) kao što su: glatiramoidi za supkutanu primenu, kompleksi gvožđa i ugljenih hidrata za *i.v.* primenu, liposomi, polimerne micelle, kompleksi albumina sa citostaticima i drugi nanoterapeutici. Takođe, među nebiološke kompleksne lekove svrstavaju se i niskomolekularni heparini (FDA), praškovi za inhalaciju, emulzije za oftalmološku i intravensku primenu, kao i transdermalni flasteri (5). Iako termin *Non-Biological Complex Drugs* nije zvanično priznat od strane EMA i FDA, smatra se da sve više dobija na značaju u naučnim krugovima (9).

Ispitivanja nebioloških kompleksnih lekova

Definisanje i procena kritičnih svojstava kvaliteta je od izuzetnog značaja za nebiološke kompleksne lekove, kako bi se osigurala njihova bezbednost i terapijska efikasnost. Procena kvaliteta ovih lekova zahteva multidisciplinarni pristup, kako bi se utvrdile njihove fizičko-hemijske karakteristike, *in vitro* i *in vivo* ponašanje, uz dodatna intenzivna istraživanja na razvoju novih metoda koje bi dodatno doprinele karakterizaciji ovih lekova (7, 9, 14, 15).

¹ Rad predstavlja osvrt na predstavljene prezentacije i panel diskusije tokom *The International Symposium on the Scientific and Regulatory Advances in Complex Drugs*, Budimpešta, Mađarska, 27-28. oktobra, 2014. Konferenciju je organizovala Katedra za farmaceutike (Department of Pharmaceutics of Semmelweis University) Zemeljavs Univerzita u Budimpešti u saradnji sa ostalim mađarskim naučnim organizacijama i pod pokroviteljstvom AAPS-a, FIP –a i EUFEPS-a.

Primena odgovarajućih metoda karakterizacije od posebnog je značaja prilikom podnošenja zahteva za registraciju inovativnih nebioloških kompleksnih i njima sličnih lekova (tzv. „nanosimilara”), odnosno lekova za koje se tvdi da su slični referentim (originatorskim/inovativnim) nanolekovima kojima je istekla patentna zaštita (15). Naime, klinička iskustva su pokazala da dokazivanje farmaceutske ekvivalencije ili klinički značajnih razlika između referentnog preparata i nanosimilara nije moguće, jer nebiološke kompleksne lekove nije moguće u potpunosti okarakterisati savremenim analitičkim metodama. Takođe, studije bioekvivalencije na zdravim dobrovoljcima ne mogu uvek da oslikaju terapijski odgovor na nebiološki kompleksni lek kao što je pokazano na primeru kompleksa gvožđa i ugljenih hidrata (11). Činjenica da se ovi lekovi koriste u okviru hronične terapije pacijenata koji su ozbiljno narušenog zdravstvenog stanja (npr. kompleksi gvožđa i ugljenih hidrata se primenjuju kod pacijenata na hemodijalizi, citostatici sa liposomima kao nosačima se primenjuju kod različitih oblika kancera, glatiramoidi se koriste u lečenju multiple skleroze) (16-18) zahteva dodatni oprez, jer primena lekova koji ispoljavaju i najmanje kliničke razlike može uticati na ishod lečenja, a samim tim i na mogućnost zamene referentnih preparata i nanosimilara (11).

Poznato je da se, generalno, nanočestice veličine između 150 i 300 nm raspodeljuju prevashodno u slezini i jetri, dok manje čestice mogu doći do kostne srži (19). Čestice koje su veće od 5 nm deponuju se u jetri, a izlučivanju preko glomerularne filtracije podležu čestice hidrodinamičkog prečnika između 5 i 10 nm (20). Ova saznanja iskorišćena su za dizajniranje lekova koji se ciljano deponuju na mestu dejstva, međutim, predviđanje raspodele sa visokom tačnošću nije moguće i raspodela u tkiva razlikuje se od slučaja do slučaja (15). Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno na koji način su fizičko-hemijske osobine nanolekova, uključujući i površinske karakteristike kao rezultat proizvodnog procesa u vezi sa konačnim farmakokinetičkim profilom (19).

Kinetika oslobađanja aktivne supstance iz nosača *in vivo* je značajan aspekt koji može uticati na kliničku primenu leka (9). Zbog toga je važno ispitati svojstva slobodne i frakcije aktivne supstance koja je vezana za nosač (21, 22). Tako se u smernici FDA pri praćenju farmakokinetičkog profila liposomskog doksorubicina zahteva procena frakcije slobodnog i inkapsuliranog leka (23).

Poseban izazov predstavljaju novi predstavnici nebioloških kompleksnih lekova specifičnih osobina koje utiču na njihovu biološku distribuciju, efikasnost i toksičnost, što dodatno ukazuje na značaj sagledavanja bioloških interakcija kod ove grupe lekova (15, 24). EMA je izradila nekoliko dokumenata vezanih za liposome (25) i nano-preparate za i.v. primenu gvožđa (26) u kojima se navodi da trenutna generička paradigma sa ustanovljenim testovima ispitivanja ekvivalencije ne važi za ove kompleksne lekove (19).

Jedan od često diskutovanih slučajeva koji ukazuje koliko je karakterizacija nebioloških kompleksnih lekova složena i još uvek nedefinisana prilikom registracije inovativnih (originatorskih) i njima sličnih lekova je preparat doksorubicin-hidrohlorida sa liposomima kao nosačima aktivne supstance (zaštićeni naziv Doxil[®], proizvođač: Johnson & Johnson, SAD). Ovaj preparat formulisan je kao koncentrat za rastvor za infuziju i indikovani su u terapiji kancera ovarijuma, Kapošijevog sarkoma koji je uzrokovan HIV-om i multiplog mijeloma. Efekti Doxil[®]-a, kao složenog nanoterapeutika, zavise od niza međusobno povezanih fizičko-hemijskih osobina, kao što su: sastav lipida, veličina i raspodela liposoma, morfologija i površinske karakteristike liposoma, okruženje liposoma (vehikulum), tj. sastav preparata (npr. pH, zapremina vehikuluma, koncentracija sulfata, koncentracija amonijum-jona, itd.) (27). Tokom 2013. godine proizvođač koji je ugovorno proizvodio ovaj lek (Ben Venue Laboratories, Bedford, Ohajo, SAD) prekinuo je proizvodnju (28). U februaru 2013. godine FDA je odobrila registraciju leka Lipodox[®] (proizvođač: Sun Pharmaceuticals Industry, Mumbaj, Indija), nanosimilarna Doxil[®]-a, pre svega zbog nestašice originatorskog preparata na tržištu. Lipodox[®] se na američkom tržištu zadržao relativno kratko, zbog sumnje da uslovi proizvodnje u Indiji nisu bili usklađeni sa Dobrom proizvođačkom praksom (19). U Evropi lek Caelyx[®] prvi put je registrovan 1996. godine (nosilac dozvole Janssen-Cilag International NV, Belgija) (Tabela I), kao koncentrat za rastvor za infuziju koji je i dalje jedini dostupan parenteralni preparat doksorubicin-hidrohlorida inkapsuliranog u PEG-ilovane liposome prisutan na evropskom tržištu.

Prema nacrtu smernice koji je FDA objavila prvi put 2010. godine² (23), preparat sličan originatorskom preparatu doksorubicina sa liposomima kao nosačima mora pokazati ista fizičko-hemijska svojstva i profil brzine rastvaranja doksorubicina kao i originatorski preparat. Smernica upućuje na sajt FDA- *Recommended Dissolution Methods* (29) za preporučene uslove ispitivanja. Za disperziju liposoma za injekciju ne navodi se konkretna aparatura (prema USP), a za uslove ispitivanja navodi se da je potrebno razviti *in vitro* metodu, počevši od pH vrednosti $6,00 \pm 0,05$ na temperaturi $47 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$. Ispitivanje je potrebno izvesti na 12 bočica svake jačine ispitivanog preparata. Dodatno, zahteva se izvođenje ispitivanja distribucije veličine čestice i oslobađanje doksorubicina u različitim medijumima, kao i ispitivanja bioekvivalencije slobodnog i inkapsuliranog leka. U smernici koju je izdala EMA (25) takođe se zahteva fizičko-hemijsko poređenje i studija bioekvivalencije za originatorski i njemu sličan preparat doksorubicina, kao i studije bioekvivalencije slobodnog i inkapsuliranog leka. Potreba za kliničkim ispitivanjima efikasnosti se procenjuje od slučaja do slučaja.

Farmaceutski preparati koji pripadaju grupi nebioloških kompleksnih lekova, a koji se primenjuju parenteralnim putem, moraju da odgovaraju opštim zahtevima za

² Poslednja revizija navedene smernice bila je u septembru 2018. godine

parenteralne preparate navedenim u Ph. Eur. i USP, kao i dodatnim specifičnim ispitivanjima u okviru kontrole kvaliteta. Pored toga, regulatorna tela (EMA i FDA), donela su i dodatne smernice za određene grupe nebioloških kompleksnih lekova (25, 26, 30-33).

Liposomi/Liposomski nosači aktivnih supstanci za parenteralnu primenu

Liposomi predstavljaju sferične vezikule koje se sastoje od vodenoj jezgra okruženog jednom ili sa više dvoslojnih membrana (lamela) koje se naizmenično smenjuju sa vodenim odeljcima (4). Razlikuju se po veličini, broju dvoslojeva, njihovoj rigidnosti i naelektrisanju. Fosfatidilholin, fosfatidilglicerol, fosfatidildietilamin, fosfatidilserin i sfingomijelin su fosfolipidi koji najčešće ulaze u sastav liposomskih vezikula i obično se kombinuju sa holesterolom, katjonskim lipidima i/ili liso-fosfatidilholinom u cilju obezbeđivanja specifičnih osobina kao što su: stabilizacija dvoslojeva, pozitivno naelektrisanje ili osetljivost na stimulse (npr. promenu pH vrednosti sredine, prisustvo određenih enzima, promenu redoks potencijala ili dejstvo svetlosti) (34, 35). Površinskom modifikacijom liposoma koja se postiže oblaganjem hidrofilnim polimerima kao što su polietilenglikoli, linearni dekstrani, polivinilpirolidon i polivinilalkohol, postiže se sterno ometanje za opsonizaciju i obezbeđuje njihovo produženo zadržavanje u sistemskej cirkulaciji (3, 34, 36, 37).

Morfologija liposoma i njihove fizičko-hemijske karakteristike zavise od izbora lipida i postupka dobijanja, a ove karakteristike kasnije utiču na vreme zadržavanja u cirkulaciji, distribuciju u određena tkiva i brzinu oslobađanja lekovite supstance *in vivo* (34). Liposomi kao nosači lekovitih supstanci predstavljaju nebiološke kompleksne lekove koji su do sada najduže u upotrebi u Evropi i SAD (Tabela I) i čije su osobine i definisana svojstva kvaliteta najviše ispitivana.

Tabela I Primeri registrovanih lekova sa aktivnom supstancom inkapsuliranom u nosače tipa liposoma (34, 36-42)

Table I Examples of the marketed products with an active substance encapsulated in liposomal carriers (34, 36-42)

Ime leka (nosilac dozvole/proizvođač)	Aktivna supstanca	Nosač lekovite supstance (veličina)	Farmaceutski oblik	Sastav lipida*	Način primene	Kliničke indikacije	Godina registracije
AmBisome® (Astellas/Gilead Sciences)	Amfotericin B	Konvencionalni bilamelarni liposomi (< 100 nm)	Prašak za koncentrat za disperziju za infuziju	HSPC, DSPG, HOL, Amfotericin B; molarni odnos: 2:0,8:1:0,4	i.v.	Sistemske gljivične infekcije	Evropa (1990), SAD (1997)
DaunoXome® (Galen/Gilead Sciences)	Daunorubicin-hidrohlorid	Mali unilamelarni liposomi (45–80 nm)	Koncentrat za rastvor za infuziju	DSPC, HOL (molarni odnos 2:1)	i.v.	<i>Kapoši</i> sarkom kod bolesnika sa AIDS-om	Evropa (1997), SAD (1997)
DepoCyt® (Sigma-Tau Pharmaceuticals/Pacira)	Citarabin	DepoFoam® multivezikularni liposomi (20 µm)	Suspencija za injekciju	DOPC, DPPG, HOL, triolein	intratekalno	Intratekalna terapija limfomatoznog meningitisa	SAD (1999)
DepoDur® (Flynn Pharma Ltd/Almac Pharma Services Ltd)	Morfín-sulfat, pentahidrat	DepoFoam® multivezikularni liposomi (17-23 µm)	Suspencija za injekciju	DOPC, DPPG, HOL, triolein	epiduralno	Postoperativna terapija bola. Primenuje se kao jednodozna epiduralna injekcija	Evropa (2006), SAD (2004)
Doxil®/Caelyx® (Ortho Biotech, Johnson & Johnson/Janssen-Cilag)	Doksorubicin-hidrohlorid	PEG-ilovani liposomi (80 – 100 nm)	Koncentrat za rastvor za infuziju	HSPC, HOL, PEG-2000-DSPE; molarni odnos: 56:39:5	i.v.	Metastazirani kancer dojke Multipli mijelom <i>Kapoši</i> sarkom kod bolesnika sa AIDS-om	SAD (1995), Evropa (1996)
Exparel® (Pacira Pharmaceuticals Inc.)	Bupivakain-hidrohlorid	DepoFoam® multivezikularni liposomi (24-31 µm)	Suspencija za injekciju	DOPC, DPPG, HOL, trikaprilin	lokalna i regionalna infiltracija	Postoperativna terapija bola	SAD (2011)

Tabela I (nastavak)							
Table I (continued)							
Ime leka (nosilac dozvole/proizvođač)	Aktivna supstanca	Nosač lekovite supstance (veličina)	Farmaceutski oblik	Sastav lipida*	Način primene	Kliničke indikacije	Godina registracije
Lipodox® (Sun Pharma)	Dokсорubicin-hidrohlорid	PEG-ilovani liposomi (100 nm)	Koncentrat za infuziju	HSPC, HOL, PEG-2000-DSPE; molarni odnos: 56:39:5	i.v.	Metastazirani kancer ovarijuma Metastazirani kancer dojke Kapoši sarkom kod bolesnika sa AIDS-om	SAD (2013)
Marquibo® (Talon Therapeutics)	Vinkristin-sulfat	Liposomi (100 nm)	Dispersija liposoma za injekciju	SPD, HOL; molarni odnos 60:40	i.v.	Akutna limfoblastna leukemija	SAD (2012)
Mepact® (Takeda Pharmaceutical Limited)	Mifamurtid	Multilamelarni liposomi (< 100 nm)	Prašak za koncentrat za disperziju za infuziju	DOPC, DOPS; molarni odnos 3:7	i.v.	Terapija nemetastatskog osteosarkoma kod dece, adolescenata i mladih osoba	Evropa (2004)
Myocet® (TEVA/Elan Pharmaceuticals)	Dokсорubicin-hidrohlорid	Mali unilamelarni liposomi (80–90 nm)	Prašak, disperzija i rastvarač za koncentrat za disperziju za infuziju	EPC, HOL; molarni odnos 55:45	i.v.	Metastazirani kancer dojke	Evropa (2000)
Visudyne® (Novartis)	Verterporfin	Liposomi	Prašak za rastvor za infuziju	EPG, DMPC	i.v.	Fotodinamska terapija senilne degeneracije makule	SAD (2000), Japan (2003)

* HSPC (engl. *hydrogenated soy phosphatidylcholine*); PEG (polietilenglikol); DSPE (engl. *distearoyl-sn-glycerophosphoethanolamine*); DSPC (engl. *distearoylphosphatidylcholine*); DOPC (engl. *dioleoylphosphatidylcholine*); DPPG (engl. *dipalmitoylphosphatidylglycerol*); EPC (engl. *egg phosphatidylcholine*); DOPS (engl. *dioleoylphosphatidylserine*); POPC (engl. *palmitoyloleoylphosphatidylcholine*); SM (sfingomijelin); MPEG (engl. *methoxy polyethylene glycol*); DMPC (engl. *dimyristoyl phosphatidylcholine*); DMPG (engl. *dimyristoyl phosphatidylglycerol*); DSPG (engl. *distearoylphosphatidylglycerol*); DEPC (engl. *dierucoylphosphatidylcholine*); DOPE (engl. *dioleoyl-sn-glycero-phosphoethanolamine*); HOL (holesterol).

Prema Ph. Eur. 9.0 (43), opšta ispitivanja parenteralnih preparata (*Parenteralia*) obuhvataju ispitivanja *Mehanička onečišćenja: čestice ispod granice vidljivosti (2.9.19)* i *Sterilnost (2.6.1)*, dok su kod pojedinih vrsta parenteralnih preparata predviđena i dodatna ispitivanja (Tabela II), koja se mogu primeniti na odgovarajuće farmaceutske oblike sa inkapsuliranom aktivnom supstancom u nosače tipa liposoma (Tabela I).

Za navedeno ispitivanje *Mehanička onečišćenja: čestice ispod granice vidljivosti (2.9.19)*, propisane su: Metoda 1 - Metoda zasnovana na blokiranju svetlosti (engl. *Light Obscuration Particle Count Test*) i Metoda 2 – Mikroskopska metoda brojanja čestica (engl. *Microscopic Particle Count Test*). Svi parenteralni preparati ne mogu se ispitati na prisustvo čestica ispod granice vidljivosti primenom jedne ili obe navedene metode. Kada Metoda 1 nije primenjiva, npr. u slučaju preparata koji nisu bistri ili su viskozni, treba primeniti Metodu 2, na primer za emulzije, preparate koloidne prirode i preparate koji sadrže liposome. Tako se u okviru ovog ispitivanja navodi da parenteralni preparati mogu da sadrže liposome, iako to nije navedeno u opštoj monografiji *Parenteralia*.

Tabela II Ispitivanja navedena u opštim monografijama (Ph. Eur. 9.0) pojedinih vrsta parenteralnih preparata (6)

Tabela II The tests listed in the general monographs (Ph. Eur. 9.0) of specific parenteral preparations (6)

Parenteralni preparat	Ispitivanje
Injekcije	<p>Ujednačenost doze (dozne jedinice)*. Jednodozne suspenzije za injekciju odgovaraju zahtevima ispitivanja za ujednačenost doziranog oblika (2.9.40) ili, ako je drugačije propisano i odobreno, testu za ujednačenost sadržaja, navedenom ispod. Biljne droge i aktivne supstance biljnog porekla u ovim farmaceutskim oblicima ne podležu zahtevima ovog paragrafa.</p> <p>Ujednačenost sadržaja (2.9.6) Ukoliko nije drugačije propisano i odobreno, jednodozne suspenzije za injekcije kod kojih je količina lekovite supstance manja od 2 mg, ili koja čini manje od 2% u odnosu na ukupnu masu, moraju da odgovaraju zahtevima testa A za Ujednačenost sadržaja lekovite supstance u jednodoznim preparatima. Ukoliko preparat sadrži više od jedne lekovite supstance, ispitivanje se odnosi samo na supstance koje ispunjavaju gore navedene uslove.</p> <p>Bakterijski endotoksini – pirogeni. Izvodi se ispitivanje na bakterijske endotoksine (2.6.14), ili ako je drugačije propisano i odobreno test na pirogene (2.6.8). Preporuke za granice sadržaja bakterijskih endotoksina navedene su u opštem poglavlju 5.1.10.</p>
Infuzije	<p>Bakterijski endotoksini – pirogeni. Izvodi se ispitivanje na bakterijske endotoksine (2.6.14), ili ako je drugačije propisano i odobreno test na pirogene (2.6.8). Za pirogeni test injicira se 10 ml/kg mase u svakoga zeca, ukoliko nije drugačije propisano i odobreno.</p>

Tabela II (nastavak)
Table II (continued)

Parenteralni preparat	Ispitivanje
Koncentrati za injekcije i infuzije	Bakterijski endotoksini – pirogeni. Posle razblaživanja do određene zapremine, odgovaraju zahtevima propisanim za injekcije ili infuzije.
Praškovi za injekcije i infuzije	<p>Ujednačenost doze (dozne jedinice)*. Praškovi za injekcije i infuzije odgovaraju zahtevima ispitivanja za ujednačenost doziranog oblika (2.9.40) ili, ako je drugačije propisano i odobreno, testu za ujednačenost sadržaja/variranja mase navedenim ispod. Biljne droge i aktivne supstance biljnog porekla u ovim farmaceutskim oblicima ne podležu zahtevima ovog paragrafa.</p> <p>Ujednačenost sadržaja (2.9.6). Ukoliko nije drugačije propisano i odobreno, praškovi za injekcije i intravenske infuzije kod kojih je količina lekovite supstance manja od 2 mg, ili koja čini manje od 2% u odnosu na ukupnu masu, ili kod kojih je pojedinačna masa jednaka ili manja od 40 mg, moraju da odgovaraju zahtevima testa A za <i>Ujednačenost sadržaja lekovite supstance u jednodoznim preparatima</i>. Ukoliko preparat sadrži više od jedne lekovite supstance, ispitivanje se odnosi samo na supstance koje ispunjavaju gore navedene uslove.</p> <p>Variranje mase (2.9.5) Praškovi za injekcije i intravenske infuzije moraju da odgovaraju zahtevima ispitivanja variranja mase jednodoznih preparata. Ispitivanje variranja mase se ne izvodi ukoliko se za sve lekovite supstance vrši ispitivanje ujednačenosti sadržaja.</p> <p>Bakterijski endotoksini – pirogeni. Posle rastvaranja ili suspendovanja u određenoj zapremini vehikuluma, odgovaraju zahtevima propisanim za injekcije ili infuzije.</p>

* Poglavlje je prošlo farmakopejsku harmonizaciju. Pogledati 5.8. *Pharmacopoeial Harmonisation* (Ph. Eur. 9.0)

Prema USP 40/NF 35 (44) farmaceutski oblici za parenteralnu primenu obuhvataju rastvore, suspenzije, sterilne praškove za rastvore i suspenzije (uključujući liposome), implante (uključujući mikročestice), kao i proizvode koji se sastoje od lekovite supstance i odgovarajućeg sredstva/uređaja kao što su stentovi obloženi lekom. Za razliku od Ph. Eur. 9.0, u delu poglavlja <1> (USP 40) koji se odnosi na liposome navodi se da je kod parenteralnih preparata koji sadrže ove nosače potrebno izvođenje *Univerzalnih i Specifičnih ispitivanja*. Univerzalna ispitivanja obuhvataju fizičko-hemijska, biološka i farmaceutsko-tehnološka koja se uobičajeno izvode kod parenteralnih preparata. U okviru specifičnih ispitivanja navode se ispitivanja:

- Lipida i sastav masnih kiselina, uključujući stepen nezasićenosti ili specifičnosti u lancu masnih kiselina i kritične proizvode degradacije kao što su lizolipidi;
- Veličine čestica;
- Distribucije veličine liposomskih vezikula;
- Lamelarnosti;

- Sastava fosfolipida;
- Procenta slobodnih vs. Procenta inkapsuliranih lipida;
- Slobodnog lek vs. Inkapsuliranog leka;
- Jonske jačine i Osmotske jačine.

Za navedena specifična ispitivanja navodi se da ne postoji farmakopejsko (oficinalno) ispitivanje, kao i da je potrebno koristiti validiranu metodu sa granicama prihvatljivosti.

U smernicama (25), kao kritični atributi kvaliteta koji mogu imati značajan uticaj na *in vivo* farmakokinetičke i *in vitro* farmakodinamske osobine navedeni su:

- brzina oslobađanja lekovite supstance iz liposoma, jer može uticati na farmakokinetičke i farmakodinamičke osobine aktivne supstance, odnosno efikasnost i bezbednost leka;
- sadržaj inkapsulirane lekovite supstance u liposomu izražen u odnosu na masu liposoma (engl. *drug loading*), a koja može biti zaštićena od metaboličke razgradnje, kao i razgradnje aktivne supstance koja je inkorporirana;
- fizičko-hemijska svojstva liposoma i inkapsulirane lekovite supstance, kao i ponašanje liposoma u organizmu, koji utiču na farmakokinetiku aktivne supstance;
- sastav preparata, koji može uticati na distribuciju lekovite supstance u tkivima.

U Tabeli III dat je prikaz preporučenih ispitivanja za karakterizaciju preparata sa liposomima kao nosačima lekovitih supstanci za parenteralni put primene (25, 33).

Tabela III Pregled ispitivanja preporučenih za karakterizaciju farmaceutskih preparata sa liposomima za parenteralnu primenu

Table III Overview of the tests recommended for characterization of liposomal drug products for parenteral application

Prilagodeno iz reference 25	Prilagodeno iz reference 33
<ul style="list-style-type: none"> • Karakteristike lipidnih ekscipijenas: opis, poreklo i karakterizacija, proces proizvodnje, prisustvo nečistoća i izomera, stabilnost; • Kvalitet, čistoća i stabilnost ostalih kritičnih ekscipijenas; • Identifikacija i kontrola ključnih faza u procesu proizvodnje; • Odnos lekovita supstanca/lipidne komponente koji treba da bude u prihvatljivom opsegu koji će obezbediti konzistentne osobine formulacije; • Morfologija, veličina i distribucija veličine liposoma, prisustvo agregata; • Udeo inkapsulirane lekovite supstance (odnos slobodne/inkapsulirane); • Stabilnost lekovite supstance, lipida i funkcionalnih ekscipijenas u konačnom proizvodu, uključujući kvantifikaciju kritičnih degradacionih proizvoda (npr. fosfatidilholina, oksidovanih i hidrolizovanih supstanci); • Ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz nosača tipa liposoma, ispitano pod fiziološki relevantnim uslovima³; • Praćenje stabilnosti u toku čuvanja i obezbeđivanje konzistentnosti između serija proizvoda; • Ispitivanje stabilnosti u okviru <i>in-use</i> testova; • Robustnost procesa rekonstitucije i/ili izrade preparata. <p>U zavisnosti od specifičnih zahteva za liposomsku formulaciju, moguće je razmatranje dodatnih parametara:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Očuvanje integriteta liposoma u plazmi; • Karakterizacija faznog ponašanja lipidnog dvosloja (određivanje temperature faznog prelaza ili entalpije faznog prelaza); • Površinsko naelektrisanje liposoma; • pH liposomskog jezgra kod inkapsulacije zasnovane na pH-gradijentu • Karakterizacija fizičkog stanja supstance unutar liposoma (npr. precipitacija u slučaju doksorubicina). 	<ul style="list-style-type: none"> • Sastav i karakteristike lipidnih ekscipijenas; • Sastav i karakteristike nelipidnih ekscipijenas; • Hemijski sastav liposoma; • Odnos aktivne supstance i lipida (engl. <i>drug-to-lipid ratio</i>) i količina aktivne supstance u liposomu (engl. <i>drug loading</i>); • Efikasnost inkapsulacije aktivne supstance; • Morfologija, uključujući određivanje lamelarne faze i površinske karakteristike liposoma; • Površinske karakteristike, ukoliko je primenjivo; • Veličina i raspodela veličina liposoma, ukoliko je moguće definisano za konstantnu masu ili zapreminu, ako je gustina čestica poznata; • Površinsko naelektrisanje liposoma, uobičajeno određeno merenjem zeta potencijala; • Određivanje temperature faznog prelaza; • Ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz nosača tipa liposoma, ispitano pri definisanim, fiziološki relevantnim uslovima; • Brzina „curenja“ lekovite supstance iz liposoma tokom čuvanja preparata • Promene integriteta liposoma (npr. brzina rastvaranja lekovite supstance, veličina, efikasnost) u zavisnosti od primenjene koncentracije soli; • Spektroskopska analiza u cilju potvrde pretpostavljene strukture liposoma (npr. <i>phosphorus nuclear magnetic resonance</i>); • Ispitivanje prisustva rezidualnih rastvarača upotrebljenih u procesu proizvodnje; • Sterilnost, prisustvo pirogena ili bakterijskih endotoksina • Ispitivanje fizičke, hemijske i mikrobiološke stabilnosti.

³ Potrebno je pratiti oslobađanje lekovite supstance iz liposoma u fiziološki/klinički relevantnim medijumima. Ukoliko je odobren, *in vitro* test „curenja“ (engl. *leakage*) pod različitim uslovima (npr. promene temperature i pH) može biti pogodan.

Dodatno, za preparate sa konjugovanim (tj. PEG-ilovanim) liposomima, prema smernici EMA (25) navodi se da je potrebno sprovesti ispitivanja:

- kvaliteta i čistoća početnog PEG materijala koji su od velikog značaja za kvalitet konačnog proizvoda;
- hemijski način vezivanja (npr. PEG-lipid ili sličnih veza sa ili bez PEG-a);
- molekulske mase konjugovanih lipida i njihove distribucije po veličini;
- raspodele PEG-a na površini liposoma;
- stabilnosti konjugata.

U literaturi se navode primeri primene različitih metoda u cilju karakterizacije liposomskih nosača lekovitih supstanci:

- hemijski sastav liposoma: spektroskopske metode (nuklearna magnetna rezonancija (npr. ^{31}P -NMR), infracrvena spektroskopija, UV-VIS spektroskopija, transmisiona elektronska mikroskopija sa energetsom disperzivnom spektroskopijom (engl. *Transmission Electron Microscopy Energy Dispersive Spectroscopy*, TEM EDS), masena spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass-Spectroscopy*, ICP-MS) (7, 25);
- morfologija i površinske karakteristike liposoma: skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM), TEM (45);
- karakterizacija lamelarne faze: nuklearna magnetna rezonancija (^{31}P -NMR) (46) i rasipanje X-zraka na malim uglovima (engl. *Small Angle X-ray Scattering*) (47);
- veličina i raspodela veličine liposoma, prisustvo agregata: dinamičko rasipanje svetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS), SEM, TEM, mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM) (7, 48-50);
- površinsko naelektrisanje liposoma: određivanje zeta potencijala (33, 50);
- lipofilnost/particioni koeficijent aktivne supstance između liposoma i pufera: kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis Frontal Analysis*, CE-FA) (51, 52);
- ponašanje lipidnog dvosloja u međufazi: diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) (53);
- separacija frakcije slobodne od inkapsulirane aktivne supstance u liposomima: kapilarna elektroforeza-masena spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (engl. *Capillary Electrophoresis-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, CE-ICP-MS) (54, 55)
- brzina rastvaranja lekovite supstance iz liposomskih nosača: metoda sa dijaliznom kesicom/vrećicom i modifikovanim protočnom ćelijom (44, 56-61).

Ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance

S obzirom na predstavljenu heterogenost i kompleksnost sastava savremenih nosača lekovitih supstanci koje se primenjuju parenteralnim putem, još uvek ne postoji

jedinstvena metoda za ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iako su navedena istraživanja veoma aktuelna i podržana su od strane različitih stručnih tela i istraživačkih grupa. Posebno je naglašena potreba za standardizacijom *in vitro* metoda ispitivanja i izradom vodiča koji su neophodni za uspostavljanje *in vitro* – *in vivo* korelacije.

Za ispitivanje preparata sa liposomima (liposomskih preparata) uobičajeno se koriste metode dijalizne kesice ili reverzne dijalizne kesice, kao i metoda modifikovane protočne ćelije. Ove metode su pogodne jer omogućavaju separaciju liposoma od medijuma. S obzirom da se radi o nestandardnim metodama, to otežava poređenje dobijenih rezultata između laboratorija. U Tabeli IV navedene su prednosti i nedostaci metoda koje su korišćene za ispitivanje liposomskih formulacija. Zbog složenog sastava ovih formulacija, pri izboru odgovarajuće metode ispitivanja čest je pristup od slučaja do slučaja u zavisnosti od vrste liposomskog nosača (59).

Tabela IV Poređenje različitih metoda za analizu kinetike oslobađanja lekovite supstance iz liposomskih formulacija (prilagođeno iz reference 59)

Table IV Comparison of different drug dissolution analysis methods for liposomal formulations (adapted from the reference 59)

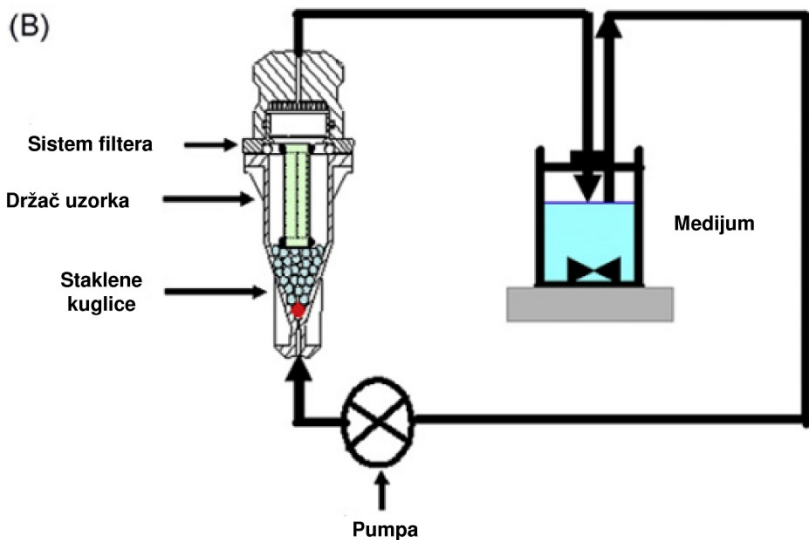
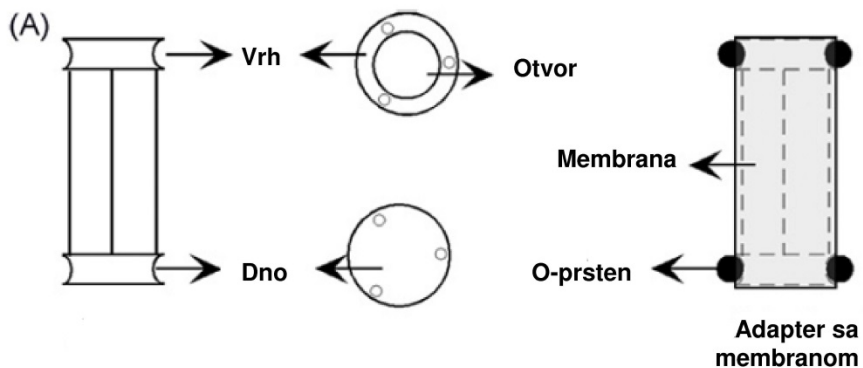
Metoda	Oslobađanje lekovite supstance	Oštećenje liposoma	Kontinuirano uzorkovanje	Prednosti	Nedostaci
Dijaliza	Trenutno i produženo	Ne	Da	Jednostavna/ekonomična	Sink uslovi/zavisi od membrane
Reverzna dijaliza	Trenutno i produženo	Ne	Da/više kesica	Jednostavna/dugo vreme uzorkovanja/ekonomična	Membrana kontroliše brzinu rastvaranja
Frakciona dijaliza	Trenutno i produženo	Ne	Da	Idealni <i>sink</i> uslovi	Potrebna je dodatna validacija
Mikrodijaliza	Trenutno i produženo	Ne	Da	Minimalna manuelna manipulacija	Nezavisno od lekovite supstance
Ultracentrifugiranje	Produženo	Da	Ne	Nezavisno od lekovite supstance	Sedimentacija sastojaka
Centrifugalno ultracentrifugiranje	Produženo	Da	Ne	Male centrifugalne sile	Zapušavanje filtera/deformacija čestica
Ultrafiltracija pod pritiskom	Trenutno i produženo	Da	Ne	Fina filtracija pri niskim pritiscima	Zapušavanje filtera/deformacija čestica

Tabela IV (nastavak)
Table IV (continued)

Metoda	Oslobađanje lekovite supstance	Oštećenje liposoma	Kontinuirano uzorkovanje	Prednosti	Nedostaci
Hromatografija zasnovana na veličini molekula	Trenutno i produženo	Ne	Da	Mogućnost izbora stacionarne faze različitog promera pora	Neophodno je kondicioniranje kolone
<i>In situ</i> metode	Trenutno i produženo	Ne	Da	Direktno određivanje	Ograničena na polarografiju i UV/VIS spektroskopiju
Kontinuirane metode proticanja	Trenutno i produženo	Ne	Ne/da	Praćenje trenutnog oslobađanja	Zapušavanje filtera/fizička ograničenja
USP (aparatura 4)	Trenutno i produženo	Ne	Da	Dugo vreme uzorkovanja	Velika zapremina medijuma za oslobađanje
USP (aparatura 1)	Trenutno i produženo	Ne	Da	Konstantna površina za uzorkovanje	Difuzija u dve faze

Metoda modifikovane protočne ćelije uz primenu odgovarajućeg adaptera predložena je kao alternativna metoda za analizu preparata sa liposomima deksametazona pripremljenih različitim metodama (sa i bez ekstruzije) i upotrebom različitih fosfolipida: DPPC (engl. *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), DMPC (engl. *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) i DSPC (engl. *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) (56).

Dijalizni adapter predstavlja šuplji cilindar koji na dnu i vrhu ima teflonske "O" prstenove na mestima za pričvršćivanje (Slika 1). Kroz donji i gornji teflonski deo prolaze žice koje predstavljaju okvir adaptera. Otvor gornjeg teflonskog dela se može zatvoriti zavrtnjem. Membrana za dijalizu se postavlja preko adaptera i pričvršćuje pomoću "O" prstenova na dnu i vrhu. Ovako pripremljeni adapter se postavlja u uspravnom položaju u protočnu ćeliju. Ispitivani uzorak se unosi u dijalizni adapter koji se zatvara zavrtnjem.



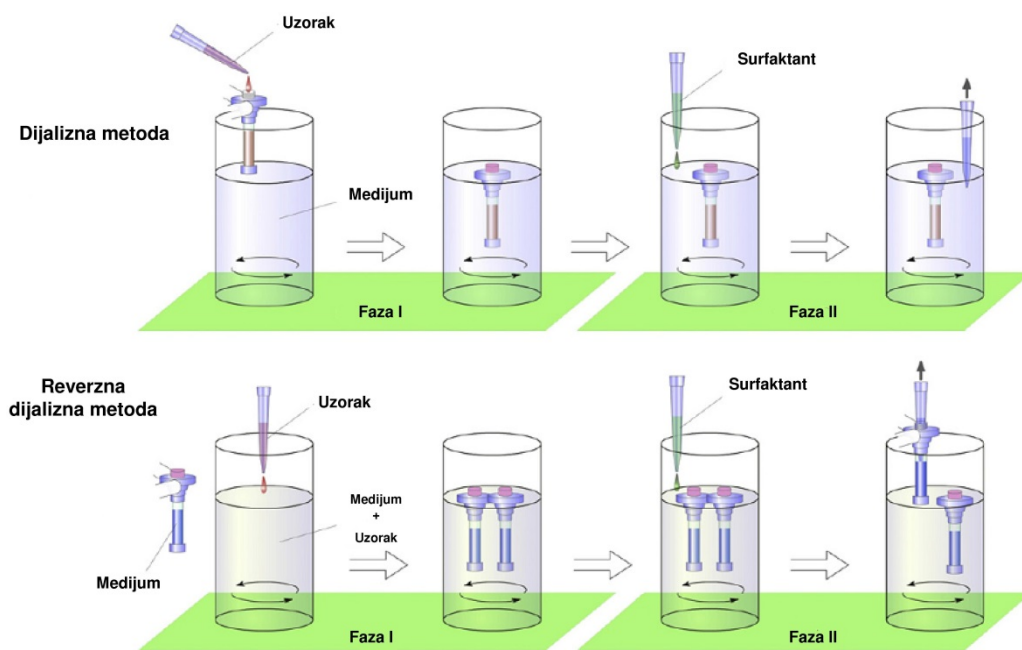
Slika 1. (A) Shematski prikaz dijaliznog adaptera: (levo) prednji deo adaptera, (sredina) dno i gornji deo, (desno) adapter sa dijaliznom membranom pričvršćenom pomoću O-prstenova. (B) Postavljanje adaptera u aparaturu sa protočnom ćelijom (prilagođeno iz reference 56)

Figure 1. (A) Schematic of the dialysis adapter design: (left) the front of the dialysis adapter, (middle) top and bottom parts, (right) adapter with dialysis membrane sealed with O-rings. (B) The placement of the adapter in USP apparatus 4 (adapted from the reference 56)

Metoda je predložena kao naprednija u odnosu na metodu sa dijaliznom i reverznom dijaliznom kesicom jer omogućava: ravnomerno i adekvatno mešanje izvan dijalizne kesice, postizanje ujednačene temperature unutar uzorka i male varijacije između uzoraka u toku ispitivanja.

Modifikovane metode sa protočnom ćelijom korišćene su za analizu brzine oslobađanja doksorubicin-hidroklorida (60) i amfotericina B (61) iz različitih liposomskih formulacija za parenteralnu primenu. Kao prednosti primene opisanih metoda navodi se njihova diskriminatorsnost u uspostavljanja razlika između generičkih i inovativnih lekova koji sadrže navedene lekovite supstance u sastavu liposomskih nosača.

Interesantan pristup u ispitivanju brzine oslobađanja predstavlja i dvostepena metoda reverzne dijalize koja je razvijena za liposomske preparate sa pasivnim ciljnim karakteristikama (58). Prva faza testa odgovara cirkulaciji liposoma u telu, dok druga faza odgovara oslobađanju lekovite supstance (tenovira) na ciljnom mestu isporuke. Na Slici 2 shematski su prikazane obe metode i faze u toku ispitivanja.



Slika 2. Shematski prikaz dijalizne (a) i reverzne dijalizne metode (b). Kao dijalizator korišćen je Float-A-Lyzer® (1 ml, 50 kDa MWCO celulozni estar) (Spectrum Laboratories, SAD) (prilagođeno iz reference 58)

Figure 2. Schematic representation of dialysis (a) and reverse dialysis method (b) Float-A-Lyzer® (1 ml, 50 kDa MWCO cellulose ester) (Spectrum Laboratories, USA) as dialysis tube was used (adapted from the reference 58)

U *in vitro* uslovima prva faza (faza cirkulacije) odvijala se u 10 mM natrijum-4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonat rastvoru pH 7,4 (HEPES pufer), dok je u drugoj fazi u medijum dodat Triton X-100 (oktoksinol-9) u koncentraciji od 1% (m/V). Pokazano je da je varijabilnost rezultata brzine oslobađanja između uzoraka bila znatno manja u odnosu na rezultate dobijene uobičajenom dijaliznom metodom. S obzirom na potvrđenu mogućnost diskriminatornosti uzoraka različitog sastava, autori predlažu primenu navedene metode u okviru ispitivanja kvaliteta proizvoda za različite parenteralne preparate kompleksnog sastava (58).

Zaključak

Parenteralni preparati moraju ispuniti brojne zahteve koji se odnose na procenu njihovog kvaliteta. Pored fizičko-hemijskih, mikrobioloških i farmaceutsko-tehnoloških ispitivanja koja su uobičajena za konvencionalne farmaceutske oblike za parenteralnu primenu, u literaturi se navodi veći broj ispitivanja predviđenih za ispitivanje farmaceutskih oblika sa specifičnim nosačima lekovitih supstanci, kao i nove klase kompleksnih lekova, bioloških i tzv. nebioloških kompleksnih lekova (i njihovih „similara“- sličnih lekova), čiji dalji razvoj se očekuje u bliskoj budućnosti, a koji se, u velikom broju slučajeva, primenjuju parenteralnim putem.

Parenteralni preparati sa liposomskim nosačima lekovitih supstanci, kao predstavnici nebioloških kompleksnih lekova primenjuju se u terapiji već duže od dve decenije. Uporedo sa intenzivnim istraživanjima navedenih nosača lekovitih supstanci za parenteralni put primene, razvijale su se i metode njihove *in vitro* karakterizacije. Upravo činjenica da ova ispitivanja u osnovi nisu propisana u najznačajnijim svetskim farmakopejama (Ph. Eur., USP i JP), kao i da se postupci njihovog izvođenja mogu značajno razlikovati između laboratorija, doprinosi velikoj varijabilnosti dobijenih rezultata i ograničenjima u njihovom međusobnom poređenju.

Regulatorna tela EMA i FDA su učestvovala u pripremi određenih dokumenata i razvoju odgovarajućih standarda i smernica u pogledu ispitivanja kvaliteta liposomskih nosača lekovitih supstanci za parenteralnu primenu. S obzirom na aktuelni razvoj savremenih farmaceutskih oblika i nosača lekovitih supstanci za parenteralni put primene očekuje se i uporedno usavršavanje metoda za sveobuhvatna ispitivanja njihovog kvaliteta, što će doprineti bezbednoj i efikasnoj primeni ovog vida terapije.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na podršci posredstvom projekata TR34031 i OI172018.

Literatura

1. Broadhead J, Gibson M. Parenteral Dosage Forms. In: Gibson M, editor. Pharmaceutical preformulation and formulation: A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. 2nd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2009. p. 325-47.
2. Ludwig JD. Parenteral dosage forms: introduction and historical perspective. In: Nema S, Ludwig JD, editors. Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications. 3rd ed. Volume 1: Formulation and Packaging. London, New York: Informa Healthcare; 2010. p.1-6.
3. Lowe R. Parenteral drug delivery. In: Aulton ME, Taylor KMG, editors. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2018. p.638-52.
4. Perrie Y. Pharmaceutical nanotechnology and nanomedicines In: Aulton ME, Taylor KMG, editors. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2018. p.784-803.
5. Crommelin DJA, de Vlieger JSB, Mühlebach S. Introduction: Defining the Position of Non-Biological Complex Drugs. In: Crommelin, DJA, de Vlieger, JSB, editors. Non-Biological Complex Drugs: The Science and the Regulatory Landscape. Heidelberg: Springer. 2015. p.1-8.
6. Krajišnik D. Metode ispitivanja konvencionalnih i savremenih farmaceutskih oblika za parenteralnu primenu. Specijalistički rad. Beograd: Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2017.
7. Crommelin DJ, Shah VP, Klebovich I, McNeil SE, Weinstein V, Flühmann B *et al.* The similarity question for biologicals and non-biological complex drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2015;76:10-7.
8. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res.* 2016;33:2373-87.
9. Husaarts L, Mühlebach S, Shah VP, McNeil S, Borchard G, Flühmann B *et al.* Equivalence of complex drug products: advances in and challenges for current regulatory frameworks. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1407(1):39-49.
10. Crommelin DJ, de Vlieger JS, Weinstein V, Mühlebach S, Shah VP, Schellekens H. Different pharmaceutical products need similar terminology. *AAPS J.* 2014;16(1):11-4.
11. Mühlebach S, Vulto A, de Vlieger J, Weinstein V, Flühmann B, Shah VP. The authorization of non-biological complex drugs (NBCDs) follow-on versions: specific regulatory and interchangeability rules ahead. *GaBI Journal.* 2013;2(4):204-7.
12. Schellekens H, Stegemann S, Weinstein V, de Vlieger JS, Flühmann B, Mühlebach S *et al.* How to regulate nonbiological complex drugs (NBCD) and their follow-on versions: points to consider. *AAPS J.* 2014;16(1):15-21.
13. Borchard G, Crommelin DJA. Equivalence of glatiramer acetate products: challenges in assessing pharmaceutical equivalence and critical clinical performance attributes. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15(3):247-59.
14. Grossman, JH, Crist RM, Clogston JD. Early Development Challenges for Drug Products Containing Nanomaterials. *AAPS J.* 2017; 19(1):92-102.

15. Ehmann F, Sakai-Kato K, Duncan R, Hernán Pérez de la Ossa D, Pita R, Vidal JM *et al.* Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine*. 2013;8(5):849-56.
16. Borchard G, Flühmann B, Mühlebach 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.
17. Bakshi S, Chalifa-Caspi V, Plaschkes I, Perevozkin I, Gurevich M, Schwartz R. Gene expression analysis reveals functional pathways of glatiramer acetate activation. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(4):351-62.
18. Varkony H, Weinstein V, Klinger E, Sterling J, Cooperman H, Komlosch T *et al.* The glatiramoid class of immunomodulator drugs. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2009;10(4):657-68.
19. Mühlebach S, Borchard G, Yildiz S. Regulatory challenges and approaches to characterize nanomedicines and their follow-on similars. *Nanomedicine*. 2015;10(4): 659-74.
20. Kettiger H, Schipanski A, Wick P, Huwyler J. Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *Int J Nanomed*. 2013;8:3255-69.
21. Ambardekar VV, Stern ST. NBCD pharmacokinetics and bioanalytical methods to measure drug release. 2015. In: Crommelin, DJA, de Vlieger, JSB, editors. *Non-Biological Complex Drugs: The Science and the Regulatory Landscape*. Heidelberg: Springer. 2015. p.261-87.
22. Skoczen S, McNeil SE, Stern ST. Stable isotope method to measure drug release from nanomedicines. *J Control Release*. 2015;220:169-74.
23. Draft guidance on doxorubicin hydrochloride [Internet] FDA [cited 2019 May 1] Available from: <https://wayback.archive-it.org/7993/20190208133123/https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM199635.pdf>
24. Tinkle S, McNeil SE, Mühlebach S, Bawa R, Borchard G, Barenholz YC *et al.* Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann NY Acad Sci*. 2014;1313:35-56.
25. Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal products, 2013. [Internet] EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02 [cited 2019 May 1] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140351.pdf
26. Reflection paper on nonclinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications, 2011. [Internet] EMA/CHMP/SWP/100094/2011 [cited 2019 May 1] Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105048.pdf
27. Barenholz YC. Doxil[®]—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012;160(2):117-34.
28. Moghimi SM, Farhangrazi ZS. Defining and characterizing non-biological complex drugs (NBCDs)—Is size enough? The case for liposomal doxorubicin generics ('liposomal nanosimilars') for injection. *GaBI Journal*. 2014;3:56-7.

29. Dissolution Methods [Internet] FDA [cited 2019 May 1] Available from: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm
30. Draft reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product, 2015 [Internet] EMA/CHMP/SWP/620008/2012 [cited 2019 May 1] Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-data-requirements-intravenous-iron-based-nano-colloidal-products-developed_en.pdf
31. Draft Guidance on Iron Sucrose [Internet] FDA [cited 2019 May 1] Available from: <https://wayback.archive-it.org/7993/20170406171330/https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM297630.pdf>
32. Draft Guidance on Glatiramer Acetate Injection [Internet] FDA [cited 2019 May 1] Available from: <https://wayback.archive-it.org/7993/20180908115552/https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM495029.pdf>
33. Guidance for Industry - Liposome Drug Products, 2018. [Internet] FDA/CDER [cited 2019 May 1] Available from: <http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/UCM070570.PDF>
34. Crommelin DJA, Metselaar JM, Storm G. Liposomes: The Science and the Regulatory Landscape. In: Crommelin, DJA, de Vlieger, JSB, editors. *Non-Biological Complex Drugs: The Science and the Regulatory Landscape*. Heidelberg: Springer. 2015. p.77-106.
35. Lee Y, Thompson DH. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2017; 9(5). e1450
36. Đekić Lj. *Nanomaterijali u farmaceutskim preparatima: karakteristike i primena*. Specijalistički rad. Beograd: Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2013.
37. Đekić L. Liposomes: Properties and Therapeutic Applications. In: Keservani RK, Sharma AK, Kesharwani RK, editors. *Novel Approaches for Drug Delivery*. Hershey: IGI Global; 2017. p. 27-51.
38. DailyMed [Internet] NIH U.S. National Library of Medicine [cited 2019 May 1] Available from: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/>
39. Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, Ho RJ. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci*. 2014;103(1):29-52.
40. Zylberberg C, Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv*. 2016; 23(9):3319-29.
41. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*. 2017;9(2). pii: E12.
42. EMC, 2019. [Internet] The electronic Medicines Compendium (eMC) [cited 2019 May 1] Available from: <https://www.medicines.org.uk/emc/>
43. *European Pharmacopoeia*, 9th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2016.
44. *The United States Pharmacopoeia 40, The National Formulary 35*. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2017.

45. Yang T, Cui FD, Choi MK, Cho JW, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2007; 338(1):317-26.
46. Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv.* 2007; 4(4):297-305.
47. Boyd BJ, Rades T. Applications of small angle X-ray scattering in pharmaceutical science. In: Müllertz A, Perrie Y, Rades T, editors. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences.* Springer-Verlag New York Inc., 2016; p. 339-60.
48. Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E *et al.* Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *Int J Pharm.* 2011;417(1-2):138-50.
49. Almgren M, Edwards K, Karlsson G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Coll Surf A* 2000;174:3-21.
50. Onyesom I, Lamprou DA, Sygellou L, Owusu-Ware SK, Antonijevic M, Chowdhry BZ *et al.* Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. *Mol Pharm.* 2013;10(11):4281-93.
51. Ostergaard J, Jorgensen L, Engelbrecht Thomsen A, Weng Larsen S, Larsen C, Jensen H. Drug-liposome distribution phenomena studied by capillary electrophoresis-frontal analysis. *Electrophoresis.* 2008;29(16):3320-4.
52. Franzen U, Jorgensen L, Larsen C, Heegaard NHH, Østergaard J. Determination of liposome-buffer distribution coefficients of charged drugs by capillary electrophoresis frontal analysis. *Electrophoresis* 2009;30:2711-19.
53. Pentak D. Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC. *Thermochim Acta.* 2014;584:36-44.
54. Nguyen TT1, Østergaard J, Stürup S, Gammelgaard B. Investigation of a liposomal oxaliplatin drug formulation by capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry (CE-ICP-MS). *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(6):2131-9.
55. Nguyen TT1, Ostergaard J, Stürup S, Gammelgaard B. Determination of platinum drug release and liposome stability in human plasma by CE-ICP-MS. *Int J Pharm.* 2013;449(1-2):95-102.
56. Bhardwaj U, Burgess DJ. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *Int J Pharm.* 2010;388(1-2):287-94.
57. Panwar P, Pandey B, Lakhera PC, Singh KP. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. *Int J Nanomed.* 2010;5:101-8.
58. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for targeted liposomes. *Int J Pharm.* 2012;426(1-2):211-8.
59. Solomon D, Gupta N, Mulla NS, Shukla S, Guerrero YA, Gupta V. Role of in vitro release methods in liposomal formulation development: challenges and regulatory perspective. *AAPS J.* 2017;19(6):1669-81.
60. Yuan W, Kuai R, Dai Z, Yuan Y, Zheng N, Jiang W *et al.* Development of a flow-through USP-4 apparatus drug release assay to evaluate doxorubicin liposomes. *AAPS J.* 2017;19(1):150-160.

61. Tang J, Srinivasan S, Yuan W, Ming R, Liu Y, Dai Z *et al.* Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;134:107-116.

Challenges of *in vitro* characterization of non-biological complex drugs - example of parenteral preparations with liposomal drug carriers

Danina Krajišnik*, Jela Milić, Snežana Savić

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

*Corresponding author: Danina Krajišnik

e-mail: danina.krajisnik@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

A greater variety of pharmaceutical preparations can be administered by the parenteral route, the composition of which can be simple (aqueous solutions) and more or less complex (emulsions, suspensions, liposomes as carriers of active pharmaceutical ingredients, particle systems, solid implants/implants). In addition, advances in bio- and nano- technology have enabled the development of new classes of complex drugs, so-called non-biological complex drugs (and their similars) whose further development is expected in the near future, and which are in many cases applied by parenteral route.

Parenteral preparations containing active substances encapsulated in the liposome-type carriers represent a class of non-biological complex drugs which have the longest use so far and whose properties and defined quality characteristics are being most examined. In this paper, an overview of mandatory and additional (specific) *in vitro* tests for parenteral liposomal drug carriers is presented. The fact that standard testing procedures are often not available in relevant pharmacopoeias (Ph. Eur., USP and JP), so that they can vary significantly between laboratories, contributes to the great variability of the results obtained and constraints in their mutual comparison. EMA and FDA, as regulatory agencies, have also participated in the preparation of certain documents and development of appropriate standards and guidelines for quality control of liposomal drug carriers for parenteral application.

Keywords: parenteral preparations, non-biological complex drugs, liposomes;
in vitro characterization

Kozmetički proizvodi i neinvazivne estetske procedure: bezbednost primene i preporuke za izbor tokom trudnoće i laktacije

Mila Filipović^{1*}, Milica Lukić², Snežana Savić²

¹Visoka zdravstvena škola strukovnih studija u Beogradu, Cara Dušana 254,
11080 Beograd, Srbija

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

*Autor za korespondenciju: Dr sc. med. Mila Filipović,
e-mail: millatrbovic@hotmail.com

Kratak sadržaj

Promene na koži i njenim adneksima, do kojih dolazi tokom trudnoće, često su uzrok nezadovoljstva i razlog zbog koga trudnice i dojilje svakodnevno koriste brojne kozmetičke proizvode i pokazuju interesovanje za različite estetske procedure. Premda bezbednost kozmetičkih proizvoda mora biti potvrđena pre pojavljivanja na tržištu, činjenica je da se njihova bezbednost, kao ni bezbednost estetskih procedura, ne procenjuje na trudnicama i dojiljama. Izbor odgovarajućih proizvoda dodatno komplikuje odsustvo zvanične liste sastojaka koje bi trebalo uzeti u razmatranje tokom trudnoće i laktacije, poput poznatih ili potencijalnih endokrinih disruptora/ometača ili jedinjenja (potencijalno) toksičnih po reprodukciju. Dodatno, ne postoje zvanične preporuke regulatornih tela i udruženja zdravstvenih profesionalaca, koje bi olakšale izbor kozmetičkih proizvoda koje trudnice i dojilje mogu da koriste, ali i otklonile eventualni strah od izlaganja ploda/bebe nebezbednim supstancama.

U ovom radu dat je pregled podataka vezanih za bezbednost određenih kozmetičkih sastojaka, kao i različitih kategorija kozmetičkih proizvoda i neinvazivnih estetskih procedura, uz pokušaj konsolidovanja podataka u konkretne preporuke vezane za izbor i njihovu primenu tokom trudnoće i laktacije.

Ključne reči: kozmetički proizvodi, neinvazivne estetske procedure, bezbednost, trudnoća, laktacija, preporuke

Uvod

Trudnoća je fiziološko stanje koje se karakteriše značajnim endokrinim, imunološkim, metaboličkim i vaskularnim promenama na nivou različitih organa i sistema organa (1). Ipak, najočiglednije promene u ovom periodu javljaju se na koži i njenim adneksima (2,3).

Promene kože i adneksa, najveći i najčešći estetski problem u trudnoći, čest su uzrok nezadovoljstva i razlog primene različitih kozmetičkih proizvoda (KP), ali i estetskih procedura (EP), kako u ovom periodu, tako i tokom laktacije (2-4).

Rezultati brojnih studija idu u prilog činjenici da potreba za lepim, negovanim izgledom, bez vidljivih estetskih nedostataka, ne prestaje u trudnoći i pokazuju da se potrošnja različitih KP tokom ovog perioda čak uvećava (5-8). Tako su, na primer, Ficheux i sar. (2015. god), ispitujući učestalost korišćenja i broj različitih KP koji se koriste na dnevnom nivou, utvrdili da trudnice u Francuskoj svakodnevno koriste čak osamnaest, dok Francuskinje koje nisu trudne, šesnaest različitih KP (5). U studiji u kojoj je vršena procena dnevne izloženosti trudnica KP, pokazano je da trudnice generalno intenzivnije koriste određene vrste proizvoda (losione/mleka i micelarne vode za skidanje šminke, proizvode za mehanički piling kože, kreme za noćnu negu, serume, stikove za negu usana i proizvode dekorativne kozmetike) u odnosu na osobe ženskog pola koje nisu trudne (6). Marie i sar. (2016. god) su, ispitujući da li se upotreba KP menja tokom trudnoće, utvrdili da trudnice uglavnom izbegavaju upotrebu lakova za nokte, proizvoda za skidanje laka i farbi za kosu, ali mnogo intenzivnije koriste emulzije losione za negu tela u odnosu na period pre trudnoće (7).

Pomenuti rezultati otvaraju određena pitanja u vezi sa primenom KP tokom trudnoće i laktacije od kojih su najvažnija dva: prvo – na osnovu kojih kriterijuma se vrši izbor proizvoda i drugo – da li se u dovoljnoj meri u razmatranje uzima i aspekt bezbednosti ploda/bebe?

Činjenica je da se bezbednost KP i EP, ne procenjuje/ispituje na trudnicama i dojiljama i da objektivno nedostaju istraživačke *in vivo* i kliničke studije koje bi se bavile ovom problematikom. Takođe, ne postoje ni publikovani podaci o tome koje preporuke trudnicama daju zdravstveni radnici različitih profila, ako ih daju, u vezi izbora i primene KP i EP tokom perioda trudnoće i laktacije.

Cilj ovog stručnog rada bio je da se na osnovu dostupnih podataka iz relevantnih literaturnih izvora, kritički sagleda upotreba različitih KP i bezbednost njihovih sastojaka, kao i primena neinvazivnih EP, tokom perioda trudnoće i laktacije, uz pokušaj konsolidovanja tih podataka u konkretne preporuke za izbor i primenu.

Primena kozmetičkih proizvoda tokom perioda trudnoće i laktacije

Zbog svakodnevne upotrebe velikog broja KP (5-8), trudnice su, različitim putevima ekspozicije, shodno kategoriji i vrsti proizvoda koje koriste, izložene brojnim sastojcima. Ti sastojci KP, pored očekivanih i poželjnih kozmetičkih efekata, mogu imati i potencijal za ispoljavanje onih neželjenih (6,7). Pomenuti neželjeni efekti su, kod trudnica, većinom lokalnog karaktera (iritativni, fototoksični i (foto) alergijski kontaktni dermatitis) i uglavnom prolaze bez medicinske intervencije (2,6,9). Međutim, njihovom ispoljavanju u trudnoći mogu doprineti fiziološke promene celog organizma, karakteristične za ovaj period (1-3), posebno ako kod trudnice postoji i individualna predispozicija (2). Tako, proizvodi zbog čije primene u trudnoći, upravo zbog navedenih razloga, treba biti obazriv, jesu npr. proizvodi za hemijski tretman kose, hemijski depilatori i proizvodi za ulepšavanje/negu noktiju (10-14).

Prilikom primene KP tokom trudnoće, pored bezbednosti trudnice, u obzir treba uzeti i bezbednost ploda. Sa tim u vezi, da bi se kozmetički sastojak nekog KP uopšte mogao smatrati potencijalno štetnim/nebezbednim za plod, trebalo bi da ima mogućnost da stigne do njega, odnosno da nakon nanošenja na kožu (najčešći put ekspozicije) penetrira i permeira kroz različite slojeve kože, sistemski se apsorbuje (15) i na kraju prođe kroz placentu do ploda.

Kada je u pitanju primena KP tokom perioda laktacije, poseban aspekt bezbedne primene predstavlja razmatranje eventualne sistemske apsorpcije kozmetičkih sastojaka i njihov naknadni prelazak u majčino mleko, što može uticati na rast i razvoj bebe (4).

Iz navedenog sledi da bi izbor KP tokom trudnoće/laktacije trebalo vršiti na osnovu njihovog sastava. Međutim, postavlja se pitanje, da li i na koje to KP, odnosno kozmetičke sastojke u proizvodima, treba obratiti pažnju?

Da bi se KP uopšte našao na tržištu, mora biti bezbedan za ljudsko zdravlje pod normalnim i razumno predvidivim uslovima upotrebe (16-18), što podrazumeva procenu bezbednosti kako njegovih sastojaka, tako i gotovog proizvoda (16). Sa aspekta problematike kojom se ovaj stručni rad bavi, potrebno je istaći da je u osnovi procene bezbednosti svih kozmetičkih sastojaka toksikološka procena rizika upotrebe sastojaka koji ulaze u sastav KP, odnosno procenjivanje rizika za ispoljavanje akutnih lokalnih i sistemskih neželjenih efekata (verovatnoća pojave neželjenog efekta i određivanje njegove težine) na osnovu toksičnosti sastojaka i nivoa izloženosti (15,18). Dodatno, treba naglasiti da se u okviru toksikološke procene izloženost kozmetičkom sastojku, po potrebi, može posebno procenjivati i kod osetljivijih populacija, odnosno trudnica i dece (15).

Iz prethodnog se može zaključiti da samo sastojci sa bezbednim toksikološkim profilom mogu biti odobreni i naći se u primeni. Međutim, kod primene KP tokom trudnoće i dojenja, u obzir se mora uzeti da se procena bezbednosti gotovog KP ipak ne

vrši na trudnicama i dojiljama (nema podataka o uticaju upotrebljenog nosača KP na penetraciju i eventualnu apsorpciju sastojaka proizvoda, što je npr. jedan od razloga podeljenog mišljenja kada je u pitanju primena retinola i njegovih derivata tokom trudnoće i laktacije (19,20), kao i to da nije potpuno isključena mogućnost pojave (novih) neželjenih efekata (NE) prouzrokovanih upotrebom KP i nakon stavljanja proizvoda u promet. Takođe, evidentno je da su na tržištu još uvek prisutne stare sirovine čija bezbednosna procena nije rađena u skorije vreme, kao i da trenutno nema validiranih alternativnih metoda za procenu određenih aspekata bezbednosti u okviru toksikološke procene, poput reproduktivne toksičnosti, što je ograničavajući faktor u slučaju pojave novih pitanja vezanih za bezbednost sastojaka koji se već duže koriste (21,22), ali i novih jedinjenja koja bi se koristila isključivo kao kozmetičke sirovine (23).

S obzirom na navedeno, kao i činjenice da nema *in vivo* studija koje bi se bavile procenom bezbednosti KP na trudnicama, opšti konsenzus među zdravstvenim radnicima različitih profila (ginekolozi, farmaceuti, dermatolozi) jeste da u prvom trimestru trudnoće, u toku intenzivne organogeneze ploda, upotrebu svih proizvoda treba svesti na minimum, odnosno ograničiti samo na neophodne, poput onih za održavanje lične higijene, kao i KP koji se nanose na manju površinu kože (npr. za zaštitu i negu kože lica).

Kada se postavi pitanje konkretnih kozmetičkih sastojaka čija bi upotreba trebalo da bude predmet razmatranja, ističu se sastojci koji jesu (potencijalni) endokrini disruptori (ED)/ometači (engl. *potential endocrine disruptor*) – egzogena jedinjenja koja bi mogla dovesti do endokrinog poremećaja u intaktnom organizmu ili njegovom potomstvu (7,23-26). Treba istaći da su savremene margine bezbednosti za sistemsku izloženost novih supstanci takve, da se samo one sa bezbednim toksikološkim profilom mogu koristiti. Međutim, u pitanje se dovodi bezbednost sirovina koje su dugo u upotrebi i čija bezbednosna procena nije rađena u skorije vreme, posebno ako su u pitanju endokrini disruptori sa pokazanim negativnim uticajem na endokrini sistem na životinjskim modelima (21). Sa druge strane, iako se zakonski propisi prilagođavaju novo-identifikovanim endokrinim ometačima, činjenica je da često postoji dug vremenski period između identifikovanja ED i preduzimanja mera za ograničavanje upotrebe tih jedinjenja. Evidentno je i da trenutno ne postoji zvanična lista poznatih ili potencijalnih ED (15), kao i to da je zbog zabrane ispitivanja kozmetičkih sastojaka na životinjama, izuzetno teško razlikovati potencijalne ED i one koji to zaista jesu, naročito ako je supstanca namenjena isključivo za upotrebu u KP (23).

Kozmetičke sirovine/materijali – potencijalni endokrini ometači za koje je svojevremeno vršena bezbednosna procena jesu: parabeni (2013. god), triklozan (2011. god), homosalat (2007. god), benzofenoni (2001. god), 4-metilbenziliden kamfor (2006. god) i 3-benziliden kamfor (2013. god), melatonin (2010. god), rezorcinol (2009. god),

ciklometikon (2010. god) i ciklopentilsiloksan (2015. god), uz naknadno ograničenje njihove upotrebe (npr. prelazak 3-benziliden kamfora i pojedinih parabena na listu zabranjenih sastojaka za upotrebu u KP ili smanjenje maksimalnih dozvoljenih koncentracija pojedinih procenjivanih sirovina itd) (15).

Imajući u vidu prethodno navedene činjenice, tokom perioda trudnoće i laktacije treba smanjiti upotrebu proizvoda koji sadrže navedene potencijalne ED (npr. proizvode za zaštitu kože od sunca koji sadrže homosalat i benzofenone; paste za zube sa triklozanom; proizvode za negu kože tela koji sadrže parabene itd). U Tabelama I-III dat je pregled različitih vrsta KP, podaci o bezbednosti pojedinih sastojaka tih proizvoda (sa akcentom na podacima o reproduktivnoj toksičnosti) i preporuke vezane za njihovu primenu tokom trudnoće i/ili laktacije.

Tabela I Pregled KP za pranje i čišćenje i KP posebne namene; podaci o bezbednosti i preporuke za primenu tokom trudnoće i laktacije

Table I Overview of cleansing cosmetic products and products for specific purposes; safety data and recommendations for usage during pregnancy and lactation

Kozmetički proizvod (KP)	Dostupni podaci o bezbednosti KP i njihovih sastojaka i preporuke za korišćenje tokom perioda trudnoće i laktacije
KP za čišćenje zuba i negu usne duplje	Tokom perioda trudnoće bezbedna je primena proizvoda (paste za zube i vode za usta) koji sadrže fluoride , a ne sadrže alkohol i triklozan ; preporučuje se upotreba 2 puta dnevno (ujutru i uveče), od početka trudnoće (i u prvom trimestru) (27,28).
KP za prevenciju i tretman strija	Kozmetički (aktivni) sastojci, za koje postoje podaci o bezbednosti i smatraju se bezbednim: alfa hidrokiseline, tokoferol i derivati, hijaluronska kiselina, njene soli i fargmenti, pantenol, allantoin, elastin, kolagen, lipidi (ulja prirodnog i sintetskog porekla, biljne masti, masni alkoholi, masne kiseline, voskovi), fosfolipidi, holesterol, glicerol, propilenglikol, sorbitol (29). Podaci o bezbednosti primene pojedinih biljnih ekstrakata, poput ekstrakta biljke <i>Centella asiatica</i> , tokom trudnoće nisu potpuno jasni (30).
KP za samopotamnjivanje kože	Proizvodi koji se duže zadržavaju na koži (engl. <i>leave-on</i>) sa dihidroksiacetonom (DHA) u konc. do 10% smatraju se bezbednim (31) i mogu se koristiti tokom perioda trudnoće i laktacije. Penetracija DHA je ograničena (10-13% primenjene doze), apsorpcija zanemarljiva, jer se DHA zadržava uglavnom na nivou epidermisa (31).
KP za negu bradavica	Lanolin se smatra bezbednim i može se koristiti za negu bradavica tokom laktacije (32). Neželjeni efekat lanolina je lokalnog karaktera – može prouzrokovati alergijski kontaktni dermatitis (AKD).
(Dermo)KP za čišćenje i negu nečiste kože sklonе aknama	Mlečna kiselina ima zanemarljivu dermalnu penetraciju, smatra se bezbednom (4) i može se koristiti. Glikolna kiselina u sastavu KP koji se spiraju (<i>rinse-off</i>) i zadržavaju na koži (<i>leave-on</i>) je bezbedna (1,33) i može se koristiti. Salicilna kiselina : ima podataka koji ukazuju da bi mogla izazvati razvojne poremećaje kod ploda (toksična po reprodukciju, kategorija 2), zbog čega ne treba koristiti <i>leave-on</i> proizvode sa salicilnom kiselinom. Salicilna kiselina u sastavu <i>rinse-off</i> proizvoda je bezbedna za primenu tokom trudnoće i laktacije (33-36). Nikotinamid (niacinamid) je bezbedan (29) i može se koristiti tokom trudnoće i laktacije.

Tabela II Pregled (dermo)kozmetičkih proizvoda za negu i zaštitu kože, podataka o bezbednosti i preporuke za primenu tokom trudnoće i laktacije

Table II Overview of (dermo)cosmetic products for personal care and skin protection, safety data and recommendations for usage during pregnancy and lactation

Kozmetički proizvod (KP)	Dostupni podaci o bezbednosti određenih sastojaka i preporuke za korišćenje ovih proizvoda tokom perioda trudnoće i laktacije
(Dermo)KP za zaštitu kože od sunca	Proizvodi sa neorganskim česticama (titan-dioksid i cink oksid) su bezbedni i mogu se koristiti tokom trudnoće i laktacije. Maksimalan SPF (faktor zaštite od sunca/UVB zračenja, engl. <i>sun protection factor</i>) u letnjem periodu preporučen za trudnice jeste 30 uz pravilno nanošenje i korišćenje proizvoda. Minimalan SPF tokom ostalih meseci u godini treba da bude 15 (29).
(Dermo)KP za umanjenje znakova prevremenog starenja kože (engl. <i>anti-age</i>)	<p>Prema izveštaju <i>SCCS</i>*-a upotreba retinola, retinil palmitata ili retinil acetata (retinaldehid i retinil linoleat nisu obuhvaćeni navedenim izveštajem) u konc. do 0,3% u kremovima za ruke, kremovima za lice i <i>rinse-off</i> proizvodima je bezbedna <i>per se</i>. Međutim, naglašeno je da bi pri najgorem scenariju, nanošenjem ovih proizvoda na kožu količina apsorbovanog retinola bila čak 97% UL (maksimalna tolerabilna doza, engl. <i>tolerable upper intake level, UL</i>), ne uzimajući u obzir glavni izvor ekspozicije (hrana). Navedeno je da je teratogenost najkritičniji toksikološki ishod do koga dolazi usled povećanog plazmatskog nivoa biološki aktivnih metabolita retinola (retinolna kiselina) (19). Autor prve studije u kojoj je ispitivano potencijalno embriotoksično delovanje retinola nakon nanošenja na kožu tokom trudnoće, izrazio je neslaganje sa pomenutim izveštajem, ukazao na određene propuste prilikom određivanja nivoa penetracije retinola, kao i na činjenicu da nijedna studija sprovedena na ljudima ili životinjama ne upućuje da retinoidi naneti na kožu utiču na plazmatski nivo retinolne kiseline (20). S obzirom na neslaganje, odnosno podeljena mišljenja (19,20), retinol i derivate retinola ipak ne treba koristiti tokom trudnoće i laktacije.</p> <p>Alfa hidroksi kiseline (AHA) su bezbedne (1,29) i mogu se koristiti tokom trudnoće i laktacije.</p> <p>Hijaluronska kiselina, njene soli i fragmenti, tokoferol i derivati, askorbinska kiselina i derivati, ubihinon (koenzim Q₁₀), lipoinjska kiselina su bezbedni sastojci (29) i mogu se koristiti tokom trudnoće i laktacije.</p> <p>Kozmetički aktivne supstance za izbeljivanje/posvetljivanje ograničenih hiperpigmentacija na koži uglavnom nisu bezbedne i nisu efikasne za tretman hiperpigmentacija (najčešće melazme) (37) i ne treba ih koristiti tokom perioda trudnoće i laktacije.</p>

**SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety)* - Naučni odbor za bezbednost potrošača

Tabela III Pregled KP za hemijski tretman kose i negu noktiju, podataka o bezbednosti i preporuke za primenu tokom trudnoće i laktacije

Table III Overview of cosmetic products for chemical treatment of hair and nail care, safety data and recommendations for usage during pregnancy and lactation

Kozmetički proizvod (KP)	Dostupni podaci o bezbednosti određenih vrsta KP i njihovih sastojaka i preporuke za korišćenje tokom perioda trudnoće i laktacije
KP za hemijski tretman kose	<p>Iako se može očekivati minimalna sistemska apsorpcija pojedinih sastojaka, nije utvrđena veza između povremenog korišćenja ovih proizvoda tokom trudnoće i reproduktivne toksičnosti, bilo kod korisnika proizvoda (37,38) ili profesionalne izloženosti trudnica (frizeri, kozmetičari) (10,37,38). Pojedine studije ukazuju da kod profesionalne izloženosti postoji povećan rizik od pojave reproduktivnih poremećaja, ali nije dokazana veza između konkretnih KP/sastojaka i reproduktivnih poremećaja (39). Reevaluacija pitanja bezbednosti boja za kosu (2010. god) nije pokazala vezu između primene boja za kosu i reproduktivne toksičnosti (40). Parafenildiamin (PPD), sastojak trajnih (oksidativnih), tamnijih boja za kosu, ima zanemarljivu sistemska apsorpciju, uz formiranje netoksičnog metabolita (N-N-diacetil-PPD) koji se izlučuje putem urina i ne predstavlja opasnost po ljudsko zdravlje (10,41).</p> <p>Hemijski tretman kose 3 do 4 puta u toku trudnoće (nakon prvog trimestra) i laktacije, odnosno maksimalno na svakih 6 do 8 nedelja, može se smatrati bezbednim (38). Kod profesionalne izloženosti trudnica ovim KP, u cilju smanjenja ekspozicije, preporučuje se obavezno nošenje rukavica, rad u trajanju do 35 časova nedeljno i adekvatna ventilacija salona (38,42). Moguć NE ovih KP - AKD prouzrokovan sastojcima proizvoda (PPD, 4-aminofenol, rezorcinol, amonijum tioglikolat, gliceril tioglikolat, formaldehid) (10,11).</p>
KP za ulepšavanje noktiju	<p>Lakovi za nokte su bezbedni (43) i mogu se koristiti tokom trudnoće i laktacije. NE - AKD prouzrokovan određenim sastojcima (npr. smole koje sadrže formaldehid) (12). Toluen (toksičan po reprodukciju, kategorija 3) je bezbedan u ovim KP, jer nema penetracije. Izveštajem SCCS*-a je obuhvaćena profesionalna izloženost u trajanju od 8h dnevno, u dobro ventiliranom salonu (44).</p> <p>Prilikom upotrebe proizvoda za jačanje noktiju (engl. <i>nail hardeners</i>) sa formaldehidom (karcinogen 1B) može doći do njegove inhalacije, ali nema dokaza da bi nakon inhalacije formaldehida (usled povremenog korišćenja proizvoda) kod trudnica moglo doći do reproduktivne toksičnosti i razvojnih poremećaja kod ploda. U izveštaju nije obuhvaćena profesionalna izloženost trudnica formaldehidu (13). NE formaldehida - izražen iritacioni (oči, respiratorni trakt) i alergogeni potencijal (12,13).</p> <p>Monomeri metakrilata u proizvodima za izlivanje/produživanje noktiju ne mogu penetrirati kroz nokatnu ploču i nakon izlaganja svetlosti UV lampe odmah kreće njihova polimerizacija. Nema podataka o njihovoj reproduktivnoj toksičnosti i mogu se smatrati bezbednim za primenu (14). Moguć NE - AKD (12,14).</p>

*SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*) - Naučni odbor za bezbednost potrošača

Neinvazivne estetske procedure tokom perioda trudnoće i laktacije

Zbog različitih reverzibilnih i/ili ireverzibilnih promena kože nastalih tokom trudnoće (1-3), trudnice i dojilje pokazuju veliko interesovanje i podvrgavaju se, na lični zahtev, određenim estetskim procedurama. Međutim, bezbednost EP (hemijski piling, mezoporacija, sonoforeza, upotreba lasera u okviru procedura itd) nije procenjivana na trudnicama i dojiljama, zbog čega predstavlja kompleksno pitanje bez jasnih i potpuno sigurnih odgovora (4).

Generalno, estetske procedure su diskrecione, ne rešavaju zdravstveni problem, odnosno nisu medicinski indikovane, zbog čega treba razmotriti koliko je njihova primena tokom trudnoće i laktacije zaista opravdana.

S obzirom da potencijalna primena invazivnih EP tokom trudnoće pokreće niz etičkih, medicinskih i pravnih pitanja, u radu će biti prikazane samo neinvazivne procedure koje se (većinom) obavljaju u kozmetičkim salonima i za koje postoji veliko interesovanje, čak i u periodu trudnoće i laktacije. U Tabeli IV navedene su najčešće neinvazivne EP za koje trudnice i dojilje pokazuju veliko interesovanje, dostupni literaturni podaci o njihovoj bezbednosti i preporuke za primenu tokom perioda trudnoće i laktacije.

Tabela IV Pregled neinvazivnih estetskih procedura, podataka o bezbednosti i preporuke za primenu tokom trudnoće i laktacije

Table IV Overview of non-invasive aesthetic procedures, safety data and recommendations for usage during pregnancy and lactation

Neinvazivna estetska procedura	Dostupni podaci o bezbednosti neinvazivnih estetskih procedura i preporuke za primenu tokom trudnoće i laktacije
Površinski hemijski piling	Rastvor glikolne kiseline (do 30%): ograničena dermalna penetracija glikolne kiseline, bezbedan za primenu (1,4,34,35). Rastvor mlečne kiseline (do 30%): ograničena penetracija mlečne kiseline, relativno bezbedan za primenu (4). Rastvor salicilne kiseline (15-20%): značajna dermalna penetracija (oko 25%) ukoliko se nanosi na veću površinu kože, ima podataka koji ukazuju da bi mogla izazvati razvojne poremećaje kod ploda (toksična po reprodukciju, kategorija 2) (4,34,36).
Preparativni tretmani lica	Hijaluronska kiselina, njene soli i fragmenti, tokoferol i derivati, askorbinska kiselina i derivati, ubihinon (koenzim Q₁₀), lipoinska kiselina su bezbedni (29) i mogu se koristiti tokom perioda trudnoće i laktacije.
Potamnjanje kože prskanjem (engl. air brushing)	Vodeni rastvor DHA u koncentraciji do 14% za profesionalnu upotrebu se smatra bezbednim, ukoliko se ne primenjuje češće od jednom nedeljno, uz adekvatnu zaštitnu opremu (oči, usta, nos). Penetracija/permeacija DHA je ograničena (10-13% nanese konc.), DHA se zadržava uglavnom na nivou epidermisa, inhalacija DHA je zanemarljiva (31).

ipak imaju ključnu ulogu u informisanju i davanju preporuka o njihovom izboru i primeni.

U pogledu primene neinvazivnih estetskih procedura tokom trudnoće, treba imati u vidu da bezbednost metoda i uređaja nije procenjivana, niti će se procenjivati na trudnicama i dojiljama, kao i da nije poznat njihov uticaj na plod. U ovom slučaju su savetovanje i detaljna diskusija o bezbednosti procedure, od izuzetnog značaja. Trudnica/dojilja treba da bude svesna svih prijavljenih i teoretskih rizika koji su povezani sa primenom EP tokom trudnoće i laktacije, kao i nedostatka dokaza o bezbednosti određenih procedura.

Literatura

1. Gontijo G, Gualberto GV, Madureira NA. Dermatologic surgery and cosmetic procedures during pregnancy — a systematic review. *Surg Cosmet Dermatol*. 2010; 2(1): 39-45.
2. Kar S, Krishnan A, Shivkumar PV. Pregnancy and skin. *J Obstet Gynecol India*. 2012; 62(3): 268-75.
3. Tyler KH. Physiological skin changes during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 2015; 58(1): 119-24.
4. Trivedi MK, Kroumpouzou G, Murase JE. A review of the safety of cosmetic procedures during pregnancy and lactation. *Int J Womens Dermatol*. 2017; 3(1): 6-10.
5. Ficheux AS, Wesolek N, Chevillotte G, Roudot AC. Consumption of cosmetic products by the French population. First part: Frequency data. *Food Chem Toxicol*. 2015; 78: 159–69.
6. Bernard A, Dornic N, Roudot A, Ficheux A. Probabilistic exposure assessment to face and oral care cosmetic products by the French population. *Food Chem Toxicol*. 2018; 111: 511-24.
7. Marie C, Cabut S, Vendittelli F, Sauvart-Rochat MP. Changes in cosmetics use during pregnancy and risk perception by women. *Int J Environ Res Public Health*. 2016; 13(4): 383.
8. Bavoux C, Picot V, Roudot A, Verdier C, Sater N, Ould Elhkim M, Desmares C. Pregnant women exposure assessment to cosmetic products. *Toxicol Lett*. 2011(205): S255-256.
9. Biesterbos JWH, Dudzina T, Delmaar CJE, Bakker MI, Russel FGM, von Goetz N, Scheepers PTJ, Roeleveld N. Usage patterns of personal care products: important factors for exposure assessment. *Food Chem. Toxicol*. 2013; 55: 8–17.
10. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on p-phenylenediamine, 26-27 June 2012 [cited 2019 June 25]. Available from: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_094.pdf.
11. Chongo-Faruk V. Allergies and other occupational diseases in the hairdressing industry: allergies in the workplace. *Curr Allergy Clin Im*. 2016; 29(3): 180-88.
12. Arora H, Tosti A. Safety and efficacy of nail products. *Cosmetics*. 2017; 4(3): 24-43.

13. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on the safety of the use of formaldehyde in nail hardeners, SCCS/1538/14, written procedure 7 November 2014, revision of 16 December 2014 [cited 2019 June 25]. Available from:
http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_164.pdf.
14. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on the safety of cosmetic ingredients HEMA (CAS 868-77-9) and Di-HEMA Trimethylhexyl Dicarbamate (CAS 41137-60-4/72869-86-4)-Submission I (Sensitisation only), SCCS/1592/17, preliminary version adopted on 22 December 2017, final version adopted on 21-22 June 2018 [cited 2019 June 25]. Available from:
https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_214.pdf.
15. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 10th revision, 24-25 October 2018, SCCS/1602/18 [cited 2019 June 25]. Available from:
https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_224.pdf.
16. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 Nov 2009 on cosmetic products (consolidated version of 01/08/2018) [cited 2019 June 25]. Available from:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R1223-20180801&from=EN>.
17. Zakon o predmetima opšte upotrebe; Službeni glasnik RS 25/2019.
18. Đukić-Ćosić D, Antonijević B. Zašto je potrebna toksikološka procena rizika za kozmetički proizvod? *Arh. farm.* 2018; 68: 971–89.
19. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on Vitamin A (Retinol, Retinyl Acetate, Retinyl Palmitate), SCCS/1576/16, 20 April 2016, final version of 6 October 2016, CORRIGENDUM on 23 December 2016 [cited 2019 June 25]. Available from:
https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_199.pdf.
20. Nohynek GJ. Commentary on the safety of topical vitamin A in cosmetics. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017; 89: 302-4.
21. Lukić M. Konzervansi, sredstva za bojenje i UV filteri u kozmetičkim proizvodima: aspekti bezbedne primene. *Arh. farm.* 2018; 68: 934–48.
22. Savić S, Paunović J. Bezbednost kozmetičkih proizvoda u svetlu evropskih propisa: Kozmetička uredba 1223/2009. *Arh. farm.* 2018; 68: 911-33.
23. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Memorandum on Endocrine Disruptors, SCCS/1544/14, 16 December 2014 [cited 2019 June 25]. Available from:
http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_009.pdf.
24. de Renzy-Martin KT, Frederiksen H, Christensen JS, Kyhl HB, Andersson AM, Husby S, Barington T, Main KM, Jensen TK. Current exposure of 200 pregnant Danish women to phthalates, parabens and phenols. *Reproduction.* 2014; 147(4): 443-53.

25. Ghazarian AA, Trabert B, Robien K, Graubard BI, McGlynn KA. Maternal use of personal care products during pregnancy and risk of testicular germ cell tumors in sons. *Environ Res.* 2018; 164: 109-13.
26. Braun JM, Just AC, Williams PL, Smith KW, Calafat AM, Hauser R. Personal care product use and urinary phthalate metabolite and paraben concentrations during pregnancy among women from a fertility clinic. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2014; 24(5): 459-66.
27. Steinberg BJ, Hilton IV, Iida H, Samelson R. Oral health and dental care during pregnancy. *Dental Clinics.* 2013; 57(2): 195-210.
28. Etzel TM, Calafat AM, Ye X, Chen A, Lanphear BP, Savitz DA, Yolton K, Braun JM. Urinary triclosan concentrations during pregnancy and birth outcomes. *Environ Res.* 2017; 156:505-11.
29. Maluf DF, Roters F, Silva LCF. Current Cosmetic Treatments in Pregnancy. *Int J Med Health Sci* 2017; 11 (3): 100-6.
30. Sur D, Chakravorty R. The Effects of Topically-Applied Skin Moisturizer on Striae Gravidarum in East Indian Women. *J Clin Exp Dermatol Res.* 2015; 6(6): 303.
31. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on dihydroxyacetone, 14 December 2010 [cited 2019 June 25]. Available from: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_048.pdf.
32. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments--2002/2003. *Int J Toxicol.* 2005; 24: 1-120.
33. Pugashetti R, Shinkai K. Treatment of acne vulgaris in pregnant patients. *Dermatol Ther.* 2013; 26(4): 302-11.
34. Lee KC, Korgavkar K, Dufresne Jr RG, Higgins HW. Safety of cosmetic dermatologic procedures during pregnancy. *Dermatol Surg.* 2013; 39(11): 1573-86.
35. Chien AL, Qi J, Rainer B, Sachs DL, Helfrich YR. Treatment of acne in pregnancy. *J Am Board Fam Med.* 2016; 29(2): 254-62.
36. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on salicylic acid (CAS 69-72-7) - Submission I, preliminary version of 10 September 2018, final version of 21 December 2018, SCCS/1601/18 [cited 2019 June 25]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_223.pdf.
37. Nohynek GJ, Antignac E, Re T, Toutain H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 243(2): 239-59.
38. Chua-Gocheo A, Bozzo P, Einarson A. Safety of hair products during pregnancy: Personal use and occupational exposure. *Can Fam Physician.* 2008; 54(10): 1386-8.
39. Kim D, Kang MY, Choi S, Park J., Lee HJ, Kim EA. Reproductive disorders among cosmetologists and hairdressers: a meta-analysis. *Int Arch Occup Environ Health.* 2016; 89(5): 739-53.
40. Andersen FA. Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments: 2007-2010. *Int J Toxicol.* 2011; 30(5_suppl): 73S-127S.

41. Nohynek GJ, Skare JA, Meuling WJ, Wehmeyer KR, de Bie AT, Vaes WH, Dufour EK, Fautz R, Steiling W, Bramante M, Toutain H. Human systemic exposure to [14C]-paraphenylenediamine-containing oxidative hair dyes: Absorption, kinetics, metabolism, excretion and safety assessment. *Food Chem Toxicol.* 2015; 81: 71-80.
42. Pak VM, Powers M, Liu J. Occupational chemical exposures among cosmetologists: risk of reproductive disorders. *Workplace Health Saf.* 2013; 61(12): 522-28.
43. Draelos ZD. Cosmetic treatment of nails. *Clin Dermatol.* 2013; 31: 573–77.
44. SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on toluene, 15 April 2008 [cited 2019 June 25]. Available from: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_133.pdf.
45. Konda D, Thappa D. Mesotherapy: What is new? *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013; 79(1): 127-34.
46. Toivo T, Orreveteläinen P, Kännälä S, Toivonen T. Survey on limiting exposure to ultrasound. STUK-TR 26. Helsinki 2017. 25 pp + appendix 5 p. ISBN 978-952-309-381-2 [cited 2019 June 25]. Available from: <http://www.julkari.fi/handle/10024/134850>.
47. Babilas P, Schreml S, Szeimies RM, Landthaler M. Intense pulsed light (IPL): a review. *Lasers Surg. Med.* 2010; 42(2): 93-104.
48. Paasch U, Bodendorf MO, Grunewald S, Simon JC. Skin rejuvenation by radiofrequency therapy: methods, effects and risks. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2009; 7(3): 196-203.
49. Kaushik SB, Alexis AF. Nonablative fractional laser resurfacing in skin of color: evidence-based review. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2017; 10(6): 51-67.

Cosmetic products and non-invasive aesthetic procedures: safety of usage and recommendations regarding selection during pregnancy and lactation

Mila Filipović^{1*}, Milica Lukić², Snežana Savić²

¹Higher Education School of Professional Health Studies, Cara Dušana 254,
11080 Belgrade, Serbia

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

*Corresponding author: Dr sci. med. Mila Filipović,
e-mail: millatrbovic@hotmail.com

Summary

Changes of the skin and skin appendages, which occur during pregnancy, are often the cause of discontentment and the reason why pregnant and breastfeeding women use numerous cosmetic products on the daily basis and show the interest for the different aesthetic procedures. Although safety of cosmetic products must be confirmed before the product is placed on the market, the fact is that their safety, as well as the safety of aesthetic procedures, is not estimated on pregnant or breastfeeding women. The selection of an appropriate product is further complicated by the absence of the list of allowed raw materials which should be considered during pregnancy and lactation, especially for substances that are known or potential endocrine disruptors or substances which are (potentially) toxic for the reproduction. Additionally, there are no official recommendations issued by the regulatory bodies or any healthcare associations, which would facilitate the selection of cosmetic products during pregnancy and breastfeeding and reduce the possible fear regarding the exposure of fetus/baby to unsafe ingredients.

The paper provides an overview of the safety data of the specified cosmetic ingredients, different categories of cosmetic products and non-invasive aesthetic procedures, with an attempt to consolidate those data into the specific recommendations regarding selection and their usage during pregnancy and lactation.

Key words: cosmetic products, non-invasive aesthetic procedures, safety, pregnancy, lactation, recommendations

Prilozi – Contributions

Izveštaj sa 70. simpozijuma Saveza farmaceutskih udruženja Srbije

70. simpozijum Saveza farmaceutskih udruženja Srbije se organizuje u godini kada obeležavamo 140 godina od osnivanja Saveza farmaceutskih udruženja Srbije i 80 godina studija farmacije u Srbiji.

Kopaonik, 23.05.-26.05.2019.

23.05.2019.

Kongresna sala hotela Grand

17:45-18:00

Otvaranje 70. Simpozijuma

18.00-18.30: VEGA: Intesta® na pravom putu do zdravog creva,
prof dr Tomica Milosavljević, KC Srbije,
Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju

18:30-19:00: TRADETICITY: Evropski farmakovigilancijski trendovi i
regulativa, Iva Mandić, Lidija Pozaić Frketić

24.05.2019.

Kongresna sala hotela Grand

Seminar 1.

Biljni lekoviti proizvodi u savremenoj farmaceutskoj praksi

Rešenje broj: 153-02-449/2019-01 od 04.03.2019. godine

Evidencioni broj: B 7/19

Broj bodova za učesnike: 6

Broj bodova za predavače: 12

Seminar je predviđen za lekare, farmaceute i farmaceute specijaliste

Ciljevi seminara:

1. Upoznavanje sa kategorijama biljnih lekovitih proizvoda: biljnim lekovima i tradicionalnim biljnim lekovima, njihovim karakteristikama i generalnim mogućnostima primene
2. Upoznavanje sa biljnim lekovitim proizvodima u terapiji kašlja povezanog sa prehladom
3. Upoznavanje sa biljnim lekovitim proizvodima za ublažavanje simptoma urinarnih tegoba
4. Predstavljanje procene bezbednosti primene određenih biljnih proizvoda
5. Predstavljanje istraživačkih podataka, mogućnosti primene i statusa na tržištu etarskog ulja divljeg origana, crnog kumina i rizoma kurkume

PROGRAM SEMINARA 1.

Moderator: prof. dr Silvana Petrović

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
9.00-9.40	Biljni lekoviti proizvodi: biljni lekovi i tradicionalni biljni lekovi	predavanje	Prof. dr Silvana Petrović
9.40-10.15	Biljni lekoviti proizvodi u terapiji kašlja povezanog sa prehladom	predavanje	Prof. dr Tatjana Kundaković-Vasović
10.15-10.50	Biljni lekoviti proizvodi za ublažavanje simptoma urinarnih tegoba predavanje	predavanje	Dr sc. Zoran Maksimović, vanr. prof.
10.50-11.20	Diskusija		
11.20-11.50	Pauza		
11.50-12.25	Procena bezbednosti primene određenih biljnih proizvoda	predavanje	Dr sc. Milica Drobac, vanr. prof.
12.25-13.00	Istraživački podaci, mogućnost primene i status na tržištu: etarsko ulje divljeg origana, plod crnog kumina i rizom kurkume	predavanje	Prof. dr Nada Kovačević
13.00-13.30	Diskusija		
13.30-14.30	Pauza za ručak		
14.30-16.00	Odabrani biljni proizvodi u apotekama - analiza i savetovanje pacijenata	radionica	doc. dr Mirjana Marčetić Mag. farm. spec. Mira Stojanović
16.00-16.30	Test I evaluacija seminara		

Satelitski simpozijumi - Kongresna sala hotela Grand

17:00-17:30: AMICUS: Disbioza moderan koncept uzroka bolesti i mogućnosti lečenja, prof. dr Ivan Jovanović, KC Srbije, Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju

17:30-18:00: AMICUS: Terapija akutnog bola, prof. dr Nada Vujašinović Stupar, Institut za reumatologiju, Beograd

18:00-18:30: PharmaSwiss d.o.o.: Terapija bola – pravi lek, dobar rezultat, prof. dr Srđan Pesić, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Katedra farmakologija sa toksikologijom

18:30-19:00: PharmaSwiss d.o.o.: Artelac® Splash- čist kao suza, doc. dr Svetlana Stanojlović, spec. oftalmologije, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Klinika za oftalmologiju KCS

19:00-19:30: NELT CO: Prolepšaj se! Spolja&Iznutra, doc. dr Milica Lukić, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za tehnologiju i kozmetologiju

Lečenje infekcija gornjih disajnih puteva, prof. dr Mijomir Pelemiš

19:30-20:00: Sopharma Trading d.o.o: Uloga androgena u muškom zdravlju, specijalista urologije dr Uroš Kenić

20.00-20.30: Kviz Slagalica–Tema: Lekovite biljke, pripremila vanr. prof. dr Danijela Đukić- Ćosić, Univerzitet u Beogradu Farmaceutski fakultet

25.05.2019.

Kongresna sala hotela Grand

Seminar 2.

Vakcine: dileme, izazovi i perspektive

Rešenje broj: 153-02-449/2019-01 od 04.03.2019. godine

Evidencioni broj: B 20/19

Broj bodova za učesnike: 6

Broj bodova za predavače: 12

Seminar je predviđen za lekare, farmaceute i farmaceute specijaliste

Ciljevi seminara:

1. Da se učesnici upoznaju sa efikasnošću i bezbednošću vakcina koje su u upotrebi
2. Da se učesnici upoznaju sa specifičnostima kontrole bezbednosti vakcina

3. Da se učesnici upoznaju sa razvojem novih tehnologija za proizvodnju vakcina i razvojem novih vakcina za infektivne bolesti koje se još uvek ne mogu kontrolisati vakcinacijom
4. Da se učesnici programa upoznaju sa specifičnostima imunskog sistema pedijatrijske populacije, efikasnošću i bezbednošću vakcina koje se koriste u ovoj populaciji i razvojem novih vakcina namenjenih ovoj populaciji
5. Da se učesnici programa upoznaju sa specifičnostima imunskog sistema

PROGRAM SEMINARA 2.

Moderator: prof. dr Gordana Leposavić

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
9.00-9.45	Prednosti i nedostaci vakcina koje su u upotrebi i glavni pravci razvoja novih vakcina	predavanje	Prof. Nevena Arsenović-Ranin
9.45-10.30	Specifični aspekti praćenja bezbednosti vakcina	predavanje	Dr Ivan Kovačević
10.30-11.30	Diskusija		
11.30-12.00	Pauza		
12:00-12:45	Vakcinacija dece u XXI veku: dileme roditelja i izazovi za lekare	predavanje	Dr Srđa Janković
12.45-13.30	Imunsko starenje, vakcine i vakcinacija	predavanje	Prof. Janko Nikolić-Žugić
13.30-14.30	Diskusija		
14.30-15.30	Pauza za ručak		
15.30-16.15	Izazovi u sprovođenju vakcinacije u XXI veku	predavanje	Prof.dr Nataša Maksimović
16.15-16.45	Test i evaluacija seminara		

Satelitski simpozijumi- Kongresna sala hotela Grand

17:00-17:30: AbelaPharm: Značaj stabilnosti i kvaliteta probiotskih proizvoda kao farmaceutske dozirane oblike, Dr sc.spec.farm. Davor J.Korčok, generalni direktor AbelaPharm

17:30-18:00: SANOFI: Imunski odgovor na vakcinu protiv gripa – značaj četvorovalentne vakcine, prof. dr Miloš Marković, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Katedra Imunologija

18.00-18.30: GALENIKA a.d.: Flonivin plus – plus za vaš organizam!, Mr.sc.med.dr Predrag Dugalić, Služba gastroenterologije i hepatologije, KBC Zemun

Prezentacije predavanja su objavljene na CD-u.

Simpozijumu su prisustvovala **364** registrovana učesnika.

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

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

ANALIZA ANKETE SPOROVEDENE NA 70. SIMPOZIJUMU

UKUPNO REGISTROVANIH UČESNIKA 364

Opšta ocena Seminara 1: **4,77**

Ocene predavača

	PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	RANG
1	Silvana Petrović	130	10	3	0	0	4,89	3
2	Tatjana Kundaković Vasović	125	11	6	0	0	4,84	7
3	Zoran Maksimović	128	13	2	1	0	4,86	6
4	Milica Drobac	130	9	4	0	0	4,88	4
5	Nada Kovačević	128	12	3	0	0	4,87	5
6	Mira Stojanović	131	9	0	0	0	4,94	1
7	Mirjana Marčetić	128	10	2	0	0	4,90	2

Ukupno 143 upitnika

Opšta ocena Seminara 2: **4,80**

Ocene predavača

	PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	RANG
1	Nevena Arsenović Ranin	95	25	5	1	0	4,70	4
2	Ivan Kovačević	98	23	1	0	0	4,80	3
3	Srđa Janković	121	19	5	0	0	4,86	2
4	Janko Nikolić Žugić	120	17	0	0	0	4,88	1
5	Nataša Maksimović	100	21	2	0	0	4,80	3

Ukupno 140 upitnika

Predložene teme za naredne simpozijume (prenosimo iz ankete onako kako su navedene):

KVS

KOMUNIKACIJA U FARMACEUTSKOJ PRAKSI

DIJETETSKI SUPLEMENTI NA SRPSKOM TRŽIŠTU

INTERAKCIJA LEKOVA

ANTI AGE SUPSTANCE I PROIZVODI

ANTIHIPERTENZIVI

PSIHIČKE BOLESTI

HOMEOPATIJA

PREVENCIJA DIJABETESA

UPOTREBA I ZLOUPOTREBA ANTIBIOTIKA

IZRADA MAGISTRALNIH PREPARATA

UPOTREBA ANTIBIOTIKA I ANTIPIRETIKA U PEDIJATRIJSKOJ POPULACIJI

BOLESTI STAROSNE POPULACIJE

TRETIRANJE FOTOŠTEĆENE KOŽE

DEPRESIJA

KONTRACEPCIJA

Beograd, 12.06.2019.

Stručni i Organizacioni odbor 70. simpozijuma SFUS