

# Multi-criteria decision making approach for- the optimization of atorvastatin and its impurities separation by micellar liquid chromatography

Andelija Malenović, Nađa Kostić, Ana Vemić, Tijana Rakić,  
Biljana Jančić-Stojanović

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis, Vojvode  
Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Corresponding author: andja@pharmacy.bg.ac.rs;  
tel.: +381 11 3951 333; fax.: +381 11 3972 840

---

## Summary

In the current paper, multi-criteria decision making (MCDM) approach was applied to optimize micellar liquid chromatography (MLC) intended for the pharmaceutical analysis of atorvastatin and its impurities, *trans*-atorvastatin and desfluoro-atorvastatin. MLC is a reversed-phase liquid chromatographic (RPLC) mode where the modification of mobile phase leads to the stationary phase modification. This results in the diverse interactions (hydrophobic, ionic and steric) significantly affecting retention and selectivity. For that reason double chained surfactant sodium dioctyl sulfosuccinate - AOT (Aerosol OT), with oxygen atoms in its tails, was used for the first time in such kind of separation. As the most efficient way to investigate a high number of factors, and simultaneously optimize defined antagonistic objectives (minimization of run time and maximization of atorvastatin and *trans*- atorvastatin resolution) MCDM approach was employed. Central composite design (CCD) with fractional factorial design,  $\pm 0.5$  star design and four replications in central point was used to define plan of experiments. Five responses selected during method development were optimized simultaneously using Derringer's desirability function. The predicted optimum was: 32 % acetonitrile, 2 % ethylene glycol, 66 % 6.4 mmol L<sup>-1</sup> AOT in 20 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate, pH of the water phase 5.50 adjusted with acetic acid, flow rate 1.15 mL min<sup>-1</sup> and column temperature of 10 °C.

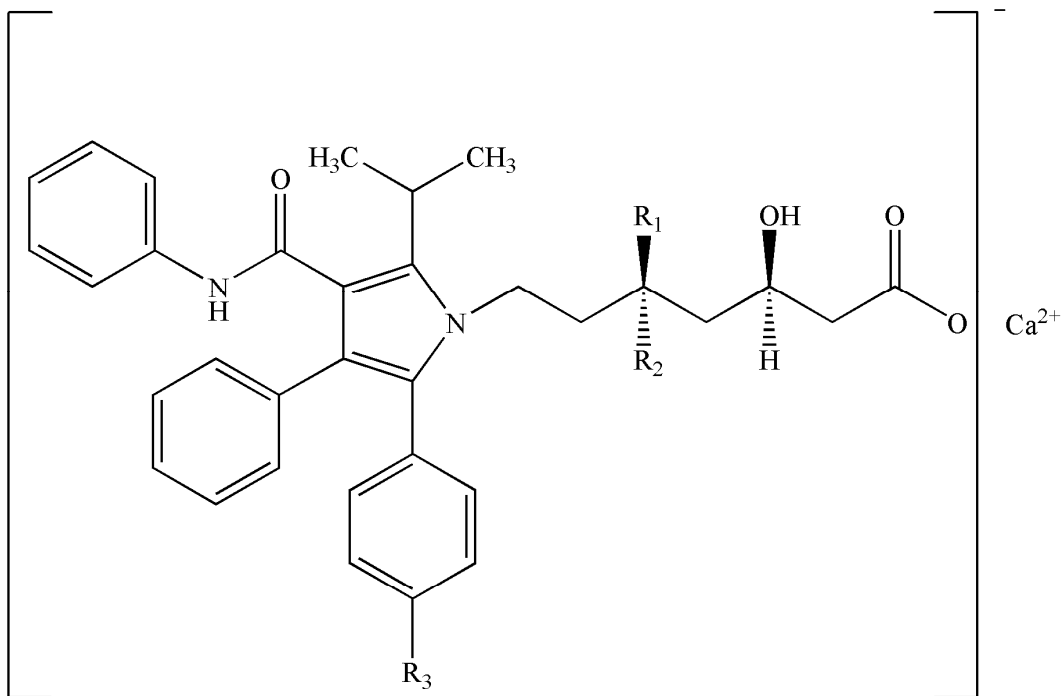
**Key words:** Multi-criteria decision making; Derringer's desirability function;  
Micellar liquid chromatography; Atorvastatin and its impurities

---

## Introduction

When one needs to optimize more than one response at a time and if the optimal values for each response are localized in different regions the application of multi-criteria decision making (MCDM) approach would be the best choice. In MCDM different approaches can be used, e.g. path of steepest ascent, constrained optimization procedure, Pareto-optimality, and Derringer's desirability function (1). In the presented study Derringer's desirability function was used for the optimization of atorvastatin (A), *trans*-atorvastatin (TA) and desfluoro-atorvastatin (DFA) separation in micellar liquid chromatography mode. Micellar liquid chromatography (MLC) is the modification of classical RP-HPLC mode of separation based on the studies of organized solutions. When micelles or microemulsion are used as mobile phases, solutes present in a mixture are separated on the basis of their differential partitioning between the bulk aqueous phase and the micellar aggregates or microemulsion droplets in the mobile phase, as well as between the bulk aqueous phase and the surfactant-coated stationary phase (2 - 4). This secondary partitioning enables better separation of complex mixtures especially those composed of analytes of different polarity.

The main objective of this paper was the investigation of improvement in selectivity promoted by MLC stationary and mobile phase modification (4, 5), as well as the application of MCDM approach to the optimization of the developed MLC method. The authors wanted to study all the presumed benefits of MLC applying it to the separation of A and its two impurities separation (Figure 1). According to the manufacturer (Krka, Novo Mesto, Slovenia) these two impurities have to be evaluated during the shelf-life and for that reason they were selected for this analysis. The therapy with statins is very long and thus the purity of these drugs is of a great significance.



atorvastatin	R <sub>1</sub> =OH;	R <sub>2</sub> =H;	R <sub>3</sub> =F
<i>trans</i> -atorvastatin	R <sub>1</sub> =H;	R <sub>2</sub> =OH;	R <sub>3</sub> =F
desfluoro-atorvastatin	R <sub>1</sub> =OH;	R <sub>2</sub> =H;	R <sub>3</sub> =H

**Figure 1. Chemical structures of atorvastatin, *trans*-atorvastatin and desfluoro-atorvastatin**

**Slika 1. Hemijske strukture atorvastatina, *trans*-atorvastatina i desfluoro-atorvastatina**

In the literature, RP-LC method has been reported for the separation of atorvastatin (A), *trans*-atorvastatin (TA) and desfluoro-atorvastatin (DFA) (6). Very recently, a rapid resolution RP-LC method for the simultaneous quantitation of A and related substances in bulk drug has been developed (7). For the simultaneous quantitation of atorvastatin and its related impurities, micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) was used (8). Liquid chromatography – tandem mass spectrometry was applied for separation, characterization and quantification of atorvastatin and its impurities, including *trans*-atorvastatin and desfluoro-atorvastatin (9). Recently the authors have published the paper dealing with the optimization of artificial neural networks which can be used as a tool in modelling of A and its impurities retention when separated by micellar liquid chromatography (10). For the simultaneous determination of atorvastatin, aspirin and their major degradation products, salicylic acid, salicylsalicylic acid and the lactone form of atorvastatin, ultra

HPLC method was developed and validated (11). An ultra performance liquid chromatographic method with UV detection was applied as stability indicating method for metoprolol, atorvastatin and ramipril in capsules (12). Also, review of HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin in bioanalytical assays, pharmaceutical assays and environmental applications is published (13).

In this paper the novelty was introduced by the application of Derringer's desirability function to simultaneously optimize the five chosen responses (retention factor of DFA –  $k_{DFA}$ , retention factor of TA –  $k_{TA}$ , retention factor of A –  $k_A$ , resolution between DFA and TA –  $R_{DFA/TA}$  and  $1-v/p$  value for A and TA) which improved and facilitated method optimization step. According to Ph. Eur. 6 (14) in the test for related substances when baseline separation between two peaks of very different height is not reached, the peak-to-valley ratio ( $p/v$ ) may be employed for the assessment of the separation. However, as the better approach calculation of valley-to peak ratio ( $v/p$ ) was proposed (15). For the sake of easier comparison of  $v/p$  with the resolution factor  $R_s$ , the subtracting of the ratio  $v/p$  from 1 was suggested ( $1-v/p$ ) (16). The resulting value of 1 corresponds to baseline separation, but value of 0 to unresolved peaks. For the optimization purpose, it is advantageous to use the height of the peak that will result in the most sensitive  $v/p$  ratio. When there is a big difference in height (separation of active substance and its related impurity), the  $v/p$  ratio for smaller peak is much more sensitive to changes than the  $v/p$  ratio of large peak and hence is the most useful value to use for the calculation (15). So, in this case for the evaluation of A and TA separation equation  $1-v/p$  was used, where  $v$  stands for the height of the valley between TA and A peak and  $p$  is TA peak height.

## Experimental

**Chemicals.** All reagents used were of an analytical grade. Sodium dioctyl sulfosuccinate - AOT (Aerosol OT; docusate sodium), tetrahydrofuran dried (THF), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol and acetonitrile - HPLC gradient grade were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Water - HPLC grade, ammonium acetate (J. T. Baker, Deventer, Netherlands), ammonium hydroxide and glacial acetic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) were used to prepare a water phase. Reference substances of atorvastatin (batch ATS1-2542/1), *trans*-atorvastatin (batch ATN1-2042) and desfluoro-atorvastatin (batch ATN2-2429-C) were kindly donated by Krka (Novo Mesto, Slovenia).

**Determination of AOT critical micellar concentration (CMC).** For the determination of AOT CMC procedure proposed in (17) was used. Extrapolation of the decreasing and horizontal part of the plot of surface tension against the surfactant concentration results in a change in gradient at the CMC value (18). Surface tension was measured by weighting 50 drops of solutions containing different concentrations of AOT or AOT and acetonitrile. The weighting was done on analytical balance, precision  $\pm 0.0001$  g (Sartorius, Göttingen, Germany).

**Chromatographic conditions.** The chromatographic system consisted of Finnigan Surveyor Thermo Scientific, Finnigan Surveyor LC Pump Plus, Finnigan Surveyor UV/VIS Plus Detector, Finnigan Surveyor Autosampler Plus and ChromQuest for data collection. The samples were introduced through partial loop in 5  $\mu\text{L}$  volume. For the separation the X-Terra<sup>TM</sup> Phenyl 4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size column was used. UV detection was performed at 254 nm.

**Software.** Design-Expert<sup>®</sup> 7.0.0. (Stat-Ease Inc., Minneapolis) was used for the definition of the plan of experiments, data analysis and desirability function calculations.

**Standard solutions.** For the optimization solutions containing 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of A and 0.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of TA and DFA were prepared in the mixture of acetonitrile-water (30:70 V/V).

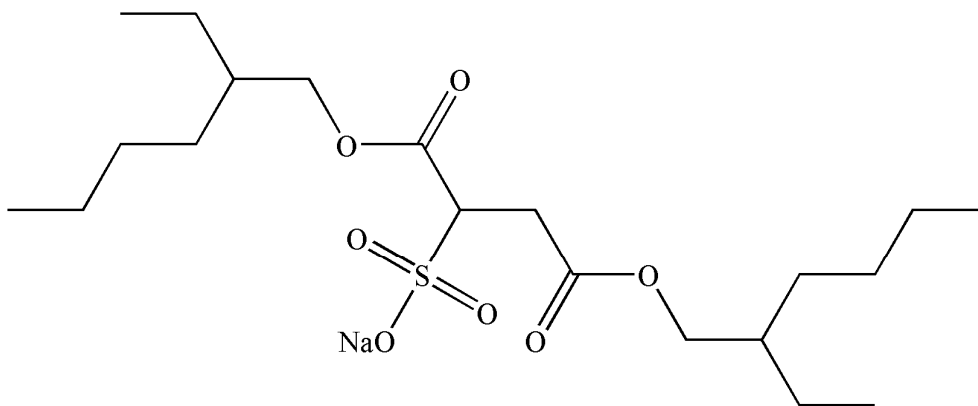
## Results and discussion

### Method development

In MLC eluents the micelles are formed as the surfactant is added in the concentration above its CMC. When the organic modifier is added to pure micellar mobile phase, elution strength is modified and the chromatographic behavior of analyzed substances significantly changes.

### *Surfactant selection*

In this case, the necessity of the separation of two structurally very similar substances imposed AOT as surfactant in MLC separation of A, TA and DFA. The authors presumed that double chain, anionic and hydrophobic surfactant (Figure 2) can be important ingredient in the mobile phase intended for isocratic mode separation of A and TA. The structures of A and TA (Figure 1) differ only in the configuration at one C-atom (epimers with the different orientation of secondary alcohol group), which consequently leads to very similar, almost the same, chromatographic behavior for these two substances. It was expected that the presence of double chained surfactant and oxygen atoms (acceptors) in its tails may lead to intermolecular hydrogen bond formation with alcohol groups (donors) of A and TA. Hydrogen bond is an electrostatic dipole-dipole interaction varying in strength and length, as well as in bond angle which mostly depends on the nature of the hydrogen bond donor. As the orientation of alcohol groups in A is *cis* and in TA *trans*, it was expected that the formed hydrogen bonds will differ in length and angle resulting in improvement of A and TA separation performance in the presence of AOT.



sodium salt bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT)

**Figure 2. Chemical structure of AOT (sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate)**  
**Slika 2. Hemijska struktura AOT-a (natrijum bis(2-etilheksil)sulfosukcinat)**

The first step in this investigation was determination of AOT CMC in 20 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate applying the procedure published in the literature (17). Orientation of surfactant molecules at the air-water interface reduces surface tension and, therefore, the solvent drop size depends on the free surfactant monomers (17). An experimental study was performed by weighting 50 drops of solutions containing AOT (0.1 mmol L<sup>-1</sup> to 2.0 mmol L<sup>-1</sup>) in 20 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate, in order to monitor changes in the surface tension that could provide information about micelle formation, i.e. reaching and exceeding CMC. The determined CMC value was 0.4 mmol L<sup>-1</sup> (Figure 3a).

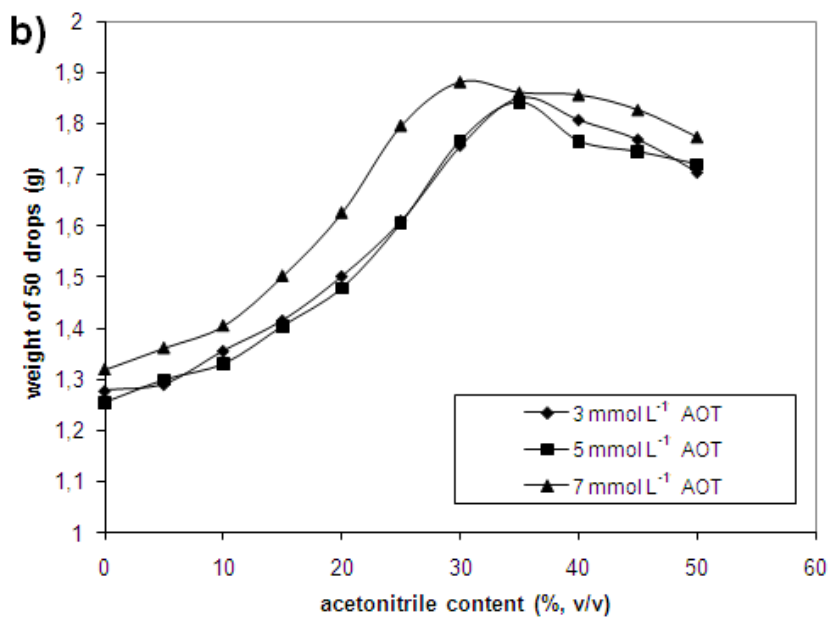
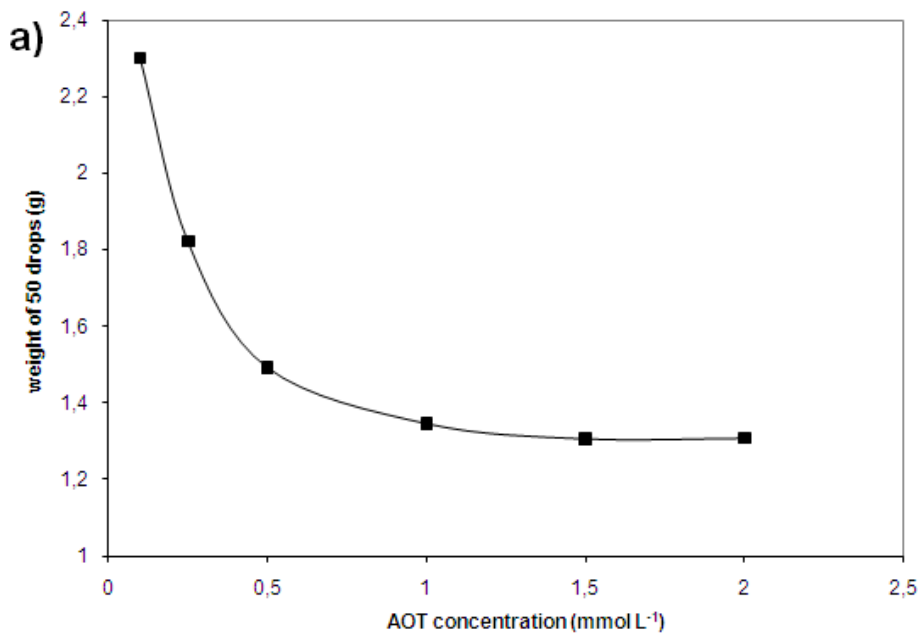


Figure 3. a) Determination of CMC for AOT in 20 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate  
 b) Weight of 50 drops of solutions containing AOT and acetonitrile  
 Slika 3. a) Određivanje CMC za AOT u 20 mmol L<sup>-1</sup> amonijum-acetatu  
 b) Masa 50 kapi rastvora koji sadrži AOT i acetonitril

### ***Organic modifier selection***

As organic modifier acetonitrile was added so the influence of organic modifier on formed micelles should be acquired. For that reason the authors applied the same procedure used for the determination of AOT CMC in order to monitor changes in the surface tension that could provide information about micelle existence and disaggregation. It was proved that AOT micelles are not influenced by acetonitrile content up to 35 %, while the content higher than that is probably affecting micellar integrity as the mild decrease of the plot weight of 50 drops =  $f$  (acetonitrile concentration) is observed. However, the likely breakdown of micelles is not observed up to 50 % (Figure 3b).

### ***Definition of other mobile phase constituents***

As it could be concluded from the preliminary study, in the interest of adjusting elution strength, some additional organic modifier must be used. Tetrahydrofuran (THF), dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol were selected. THF and DMSO are dipolar aprotic solvents like acetonitrile, but with notable difference in structure. THF has a cyclic structure and completely different steric effects could be expected. Presence of the oxygen atom in its structure may also result in hydrogen bond formation and improved A and TA separation. On the other hand, DMSO has so called "soft" oxygen atom and "hard" sulfur atom that may lead to different interaction with A and TA and result in acceptable separation. As previously mentioned, the different orientation of alcohol groups in A and TA structure will definitely result in different interaction with ethylene glycol *via* hydrogen bonding with the two alcohol groups. Comparing the influence of 2 % THF, DMSO and ethylene glycol in the mobile phase containing 35 % acetonitrile and 63 % 5 mmol L<sup>-1</sup> AOT in 20 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate (pH of the water phase was adjusted at 5.50 with acetic acid), the most significant and acceptable improvement of  $1 - v/p$  value could be noticed with ethylene glycol. When the content of ethylene glycol was reduced to 1 % or increased to 4 %, no substantial deterioration or improvement were observed. For that reason 2 % of ethylene glycol in the mobile phase was kept at the constant level during the method optimization.

Finally the influence of water phase pH value was analyzed. During the preliminary experiments the authors concluded that in the optimization phase the pH of the mobile phase must be investigated in the range from 5.0 to 6.0 because from 4.0 to 5.0 the satisfactory separation of A and TA could not be reached (all the obtained values of  $1 - v/p$  were less than 0.2).



## Method optimization

### *Independent and dependent variables selection*

The first step in the method optimization was definition of the factors which were important for certain separation (independent variables). During the method development stage as the influential factors acetonitrile content and AOT concentration in 20 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate (constituents of MLC mobile phase), as well as the pH of the water phase, mobile phase flow rate and column temperature were extracted. Other factors like ammonium acetate concentration (20 mmol L<sup>-1</sup>) and ethylene glycol content in the mobile phase (2 %) were kept constant. As dependent variables five responses were included in the investigation (retention factor of DFA –  $k_{DFA}$ , retention factor of TA –  $k_{TA}$ , retention factor of A –  $k_A$ , resolution between DFA and TA –  $R_{DFA/TA}$  and  $1-v/p$  value for A and TA).

### *Experimental design selection*

The next step was the selection of the appropriate experimental design that will define which experiments should be carried out in the experimental region of interest. For this study experimental design must assure that all studied variables are examined at least in three factor levels, and as the most useful inscribed-CCD with 2<sup>5</sup> half-fractional factorial design,  $\pm 0.5$  star design and four replications in central point was chosen. The plan of experiments is presented in Table I.

**Table I** Plan of experiment for inscribed CCD (coded values for factor levels are in brackets)  
**Tabela I** Plan eksperimenta za *inscribed* CCD (kodirane vrednosti za nivoe faktora date su u zagradama)

№	Factors levels Nivoi faktora									
	$x_1$		$x_2$		$x_3$		$x_4$		$x_5$	
1	32	(-1)	3	(-1)	5.00	(-1)	1.00	(-1)	20.0	(+1)
2	40	(+1)	3	(-1)	5.00	(-1)	1.00	(-1)	10.0	(-1)
3	32	(-1)	7	(+1)	5.00	(-1)	1.00	(-1)	10.0	(-1)
4	40	(+1)	7	(+1)	5.00	(-1)	1.00	(-1)	20.0	(+1)
5	32	(-1)	3	(-1)	6.00	(+1)	1.00	(-1)	10.0	(-1)
6	40	(+1)	3	(-1)	6.00	(+1)	1.00	(-1)	20.0	(+1)
7	32	(-1)	7	(+1)	6.00	(+1)	1.00	(-1)	20.0	(+1)
8	40	(+1)	7	(+1)	6.00	(+1)	1.00	(-1)	10.0	(-1)
9	32	(-1)	3	(-1)	5.00	(-1)	1.50	(+1)	10.0	(-1)
10	40	(+1)	3	(-1)	5.00	(-1)	1.50	(+1)	20.0	(+1)
11	32	(-1)	7	(+1)	5.00	(-1)	1.50	(+1)	20.0	(+1)
12	40	(+1)	7	(+1)	5.00	(-1)	1.50	(+1)	10.0	(-1)
13	32	(-1)	3	(-1)	6.00	(+1)	1.50	(+1)	20.0	(+1)
14	40	(+1)	3	(-1)	6.00	(+1)	1.50	(+1)	10.0	(-1)
15	32	(-1)	7	(+1)	6.00	(+1)	1.50	(+1)	10.0	(-1)
16	40	(+1)	7	(+1)	6.00	(+1)	1.50	(+1)	20.0	(+1)
17	34	(-0.5)	5	(0)	5.50	(0)	1.25	(0)	15.0	(0)
18	38	(+0.5)	5	(0)	5.50	(0)	1.25	(0)	15.0	(0)
19	36	(0)	4	(-0.5)	5.50	(0)	1.25	(0)	15.0	(0)
20	36	(0)	6	(+0.5)	5.50	(0)	1.25	(0)	15.0	(0)
21	36	(0)	5	(0)	5.25	(-0.5)	1.25	(0)	15.0	(0)
22	36	(0)	5	(0)	5.75	(+0.5)	1.25	(0)	15.0	(0)
23	36	(0)	5	(0)	5.50	(0)	1.13	(-0.5)	15.0	(0)
24	36	(0)	5	(0)	5.50	(0)	1.38	(+0.5)	15.0	(0)
25	36	(0)	5	(0)	5.50	(0)	1.25	(0)	12.0	(-0.5)
26	36	(0)	5	(0)	5.50	(0)	1.25	(0)	17.0	(+0.5)
27	36	(0)	5	(0)	5.50	(0)	1.25	(0)	15.0	(0)
28	36	(0)	5	(0)	5.50	(0)	1.25	(0)	15.0	(0)
29	36	(0)	5	(0)	5.50	(0)	1.25	(0)	15.0	(0)
30	36	(0)	5	(0)	5.50	(0)	1.25	(0)	15.0	(0)

$x_1$  – content of acetonitrile (%),  $x_2$  – content of AOT ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) in  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  ammonium acetate,  $x_3$  – pH of the water phase;  $x_4$  – flow rate;  $x_5$  – column temperature

$x_1$  – sadržaj acetonitrila (%),  $x_2$  – koncentracija AOT-a ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) u  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  amonijum-acetatu,  $x_3$  – pH vrednost vodene faze;  $x_4$  – protok mobilne faze;  $x_5$  – temperatura kolone

## Optimization based on multi-criteria decision making approach

The experiments were conducted according to the defined plan and the resulting responses are presented in Table II. Design-Expert 7.0.0 was employed for the necessary calculations. For  $k_{DFA}$ ,  $k_{TA}$ ,  $k_A$  and  $1-v/p$  quadratic response model was suggested as the most adequate and calculated coefficients of response model for coded factor levels are given in Table III. On the other hand, for  $R_{DFA/TA}$ , five-factor interaction response model was suggested as the most adequate. The coefficients of response model calculated for coded factor levels are given in Table IV.

**Table II** Experimentally obtained responses

**Tabela II** Eksperimentalno dobijeni odgovori

Exp. №	Responses				
	$k_{DFA}$	$k_{TA}$	$k_A$	$R_{DFA/TA}$	$1-v/p$
1	22.64	26.18	26.57	2.81	0.54
2	8.39	9.20	9.62	1.32	0.07
3	17.64	20.50	21.43	2.80	0.43
4	6.37	7.02	7.36	1.18	0.16
5	8.02	9.46	9.96	1.78	0.53
6	5.19	5.74	6.13	1.24	0.24
7	6.08	7.01	7.41	1.65	0.21
8	2.61	2.85	3.08	0.62	0.33
9	27.80	32.70	34.08	3.40	0.13
10	7.10	7.90	8.27	0.76	0.24
11	18.69	21.43	22.31	2.58	0.28
12	6.04	6.68	7.03	1.02	0.15
13	12.67	14.47	15.32	1.35	0.35
14	3.19	3.54	3.74	0.91	0.14
15	10.03	11.43	12.20	1.39	0.35
16	2.14	2.36	2.50	0.51	0.09
17	9.60	10.88	11.61	1.92	0.53
18	5.81	6.44	6.88	1.25	0.59
19	6.32	7.10	7.60	1.74	0.51
20	6.39	7.16	7.67	1.45	0.56
21	8.97	10.09	10.71	1.59	0.34
22	7.09	8.08	8.64	1.94	0.42
23	10.09	11.53	12.37	1.95	0.60
24	6.70	7.57	8.09	1.51	0.53
25	8.37	9.44	10.16	1.76	0.56
26	5.55	6.25	6.67	1.44	0.73
27	5.73	6.45	6.93	1.57	0.61
28	6.07	6.73	7.28	1.69	0.55
29	5.86	6.53	7.00	1.69	0.55
30	6.09	6.75	7.28	1.56	0.53

$k_{DFA}$  – retention factor for DFA;  $k_{TA}$  – retention factor for TA;  $k_A$  – retention factor for A;  
 $R_{DFA/TA}$  – resolution between DFA and TA;  $1-v/p$  – measure of A and TA peak separation  
 $k_{DFA}$  – retencioni faktor za DFA;  $k_{TA}$  – retencioni faktor za TA;  $k_A$  – retencioni faktor za A;  
 $R_{DFA/TA}$  – rezolucija između DFA i TA;  $1-v/p$  – separacija između A i TA

**Table III** Coefficients of quadratic response model for  $k_{DF}$ ,  $k_{TA}$ ,  $k_A$  and  $1-v/p$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{15}x_1x_5 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{25}x_2x_5 + b_{34}x_3x_4 + b_{35}x_3x_5 + b_{45}x_4x_5 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2 + b_{55}x_5^2$$

**Tabela III** Koeficijenti kvadratnog modela za odgovore:  $k_{DF}$ ,  $k_{TA}$ ,  $k_A$  i  $1-v/p$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{15}x_1x_5 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{25}x_2x_5 + b_{34}x_3x_4 + b_{35}x_3x_5 + b_{45}x_4x_5 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2 + b_{55}x_5^2$$

	$k_{DF}$	p-value	$k_{TA}$	p-value	$k_A$	p-value	$1 - v/p$	p-value
$b_0$	6.90	<0.0001*	7.76	<0.0001*	8.32	<0.0001*	0.55	0.0007*
$b_1$	-5.12	<0.0001*	-6.07	<0.0001*	-6.30	<0.0001*	-0.083	0.0010*
$b_2$	-1.54	0.0030*	-1.81	0.0029*	-1.84	0.0037*	-0.013	0.4712
$b_3$	-3.98	<0.0001*	-4.59	<0.0001*	-4.69	<0.0001*	0.017	0.3529
$b_4$	0.55	0.1868	0.64	0.1865	0.71	0.1672	-0.049	0.0190*
$b_5$	-0.26	0.5202	-0.35	0.4509	-0.42	0.3949	0.005	0.7798
$b_{12}$	0.75	0.0862	0.94	0.0699	0.92	0.0870	0.020	0.2849
$b_{13}$	2.20	0.0003*	2.63	0.0003*	2.67	0.0004*	0.0075	0.6799
$b_{14}$	-1.18	0.0140*	-1.33	0.0172*	-1.45	0.0147*	0.026	0.1699
$b_{15}$	0.25	0.5382	0.36	0.4499	0.43	0.3968	0.0063	0.7306
$b_{23}$	0.56	0.1827	0.67	0.1724	0.65	0.2078	-0.02	0.2849
$b_{24}$	-0.15	0.7178	-0.22	0.6412	-0.27	0.5842	0.016	0.3797
$b_{25}$	-0.20	0.6150	-0.19	0.6870	-0.19	0.7013	-0.064	0.0055*
$b_{34}$	0.096	0.8100	0.058	0.9011	0.029	0.9527	0.0013	0.9449
$b_{35}$	0.46	0.2702	0.55	0.2550	0.63	0.2251	-0.056	0.0109
$b_{45}$	-0.63	0.1396	-0.76	0.1300	-0.75	0.1527	0.025	0.1890
$b_{11}$	1.15	0.7740	1.21	0.7980	1.17	0.8147	0.069	0.7077
$b_{22}$	-4.25	0.3070	-4.93	0.3118	-5.28	0.3053	-0.031	0.8633
$b_{33}$	2.45	0.5457	2.91	0.5415	2.88	0.5658	-0.065	0.0051
$b_{44}$	3.91	0.3431	4.75	0.3253	5.10	0.3194	0.089	0.6291
$b_{55}$	0.11	0.9773	0.067	0.9807	0.011	0.9804	0.24	0.1829

\* significant model terms at 95% confidence level

\* interval pouzdanosti 95 %

**Table IV** Coefficients of second-order response model for  $R_{DFA/TA}$ 

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{15}X_1X_5 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{25}X_2X_5 + b_{34}X_3X_4 + b_{35}X_3X_5 + b_{45}X_4X_5$$

**Tabela IV** Koeficijenti modela drugog reda za odgovor  $R_{DFA/TA}$ 

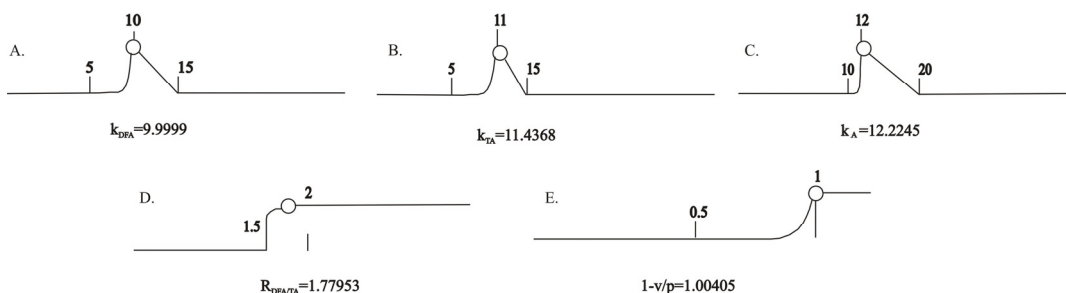
$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{15}X_1X_5 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{25}X_2X_5 + b_{34}X_3X_4 + b_{35}X_3X_5 + b_{45}X_4X_5$$

	$R_{DFA/TA}$	p-value
$b_0$	1.610	<0.0001*
$b_1$	-0.640	<0.0001*
$b_2$	-0.120	0.0211*
$b_3$	-0.380	<0.0001*
$b_4$	-0.100	0.0413*
$b_5$	-0.080	0.1037
$b_{12}$	0.001	0.9790
$b_{13}$	0.280	<0.0001*
$b_{14}$	-0.052	0.2784
$b_{15}$	0.050	0.3010
$b_{23}$	-0.025	0.5997
$b_{24}$	-0.001	0.9790
$b_{25}$	0.084	0.0936
$b_{34}$	-0.049	0.3128
$b_{35}$	0.079	0.1129
$b_{45}$	-0.120	0.0243*

\* significant model terms at 95% confidence level

\* interval pouzdanosti 95 %

In the next stage, in order to discover global optimal conditions several dependent properties were simultaneously optimized using MCDM based approach. For that purpose, Derringer's desirability function (19) was selected to optimize five responses with different targets. Derringer and Suich (19) proposed three types of desirability functions depending on whether a particular response is to be maximized, minimized or assigned a target value. In order to emphasize certain goal assigned to the response, the weights (exponents) of adopted function have to be selected (15). It is important to know that weights lower than 1 give less emphasis to the goal, while weights greater than 1 give more emphasis to the goal. The restrictions adopted for the determination of the most appropriate global desirability in this investigation are graphically presented in Figure 4.



**Figure 4** Graphical representation of the constraints adopted for the determination of global desirability (A –  $k_{DFA}$ ; B –  $k_{TA}$ ; C –  $k_A$ ; D –  $R_{DFA/TA}$  and E –  $1 - v/p$ )

**Slika 4** Grafički prikaz uslova definisanih za određivanje globalne *desirability* funkcije (A –  $k_{DFA}$ ; B –  $k_{TA}$ ; C –  $k_A$ ; D –  $R_{DFA/TA}$  i E –  $1 - v/p$ )

It can be seen from Figure 4A, 4B and 4C that  $k_{DFA}$ ,  $k_{TA}$  and  $k_A$  responses were set as *target* best kind and selected values for weights were 10 and 1, respectively. For  $R_{DFA/TA}$  (Figure 4D) and  $1 - v/p$  (Figure 4E) the responses constraint was defined as *maximization*. In the former case weight was adjusted to 0.1 as any response value above 1.5 can be considered as acceptable. However, for  $1 - v/p$   $s$  was set to 10, as the most desirable response would have value 1. In this way the significance of this response in the definition of global optimum was emphasized.

According to defined constraints the predicted optimal mobile phase composition was: 32 % acetonitrile, 2 % ethylene glycol, 66 %  $6.4 \text{ mmol L}^{-1}$  AOT in  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  ammonium acetate, pH of the water phase 5.50 adjusted with acetic acid, flow rate  $1.15 \text{ mL min}^{-1}$  and column temperature of  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  and the corresponding global desirability 0.980.

Finally, the predicted optimal mobile phase was applied for the separation of investigated substances in order to check the concordance between predicted and experimentally obtained response values. The obtained experimental data for  $k_{DFA}$ ,  $k_{TA}$ ,  $k_A$ ,  $R_{DFA/TA}$  and  $1 - v/p$  were in a good agreement with predicted ones presented in Figure 4. Representative chromatogram obtained after injection of a mixture, in which the impurities TA and DFA had the maximum allowed concentrations in formulations, under optimal conditions can be found in Malenović *et al.* (10).

## Conclusion

In this paper a novel, simpler and more efficient MLC method for the separation of A, TA and DFA was proposed. Application of MCDM approach improved method optimization step by the desirability estimation of several interrelated responses. Global optimal chromatographic conditions were defined using Derringer's desirability function. First of all five investigated responses were converted to desirability functions,

which were then modeled in the experimental domain with a good fit. Then, the global desirability was defined according to adopted restrictions and the optimal chromatographic conditions settled. Also, 3D-graphs of global desirability were constructed and their investigation enabled the evaluation of system behavior. It could be seen that all the parameters of the proposed method must be strictly controlled in order to maintain method performance, which could have been expected, due to the structural resemblance between A and TA that results in similar chromatographic behavior and problematic separation. Finally, it can be concluded that the proposed desirability-based MCDM approach proved to be valuable tool in the optimization of chromatographic methods, especially novel ones like MLC.

## Acknowledgements

The authors thank to Ministry of Science of Republic of Serbia for supporting these investigations in Project 142077.

## References

1. *NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods* <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook> (Accessed: November, 2011)
2. Armstrong DW, Nome F. [Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography](#). *Anal Chem* 1981; 53: 1662-1666.
3. Arunyanart M, Cline-Love LJ. [Model for micellar effects on liquid chromatography capacity factors and for determination of micelle-solute equilibrium constants](#). *Anal Chem* 1984; 56: 1557-1561.
4. Malenović A, Ivanović D, Medenica M, Jančić B, Marković S. [Retention modelling in liquid chromatographic separation of simvastatin and six impurities using a microemulsion as eluent](#). *J Sep Sci* 2004; 27: 1087-1092.
5. Ruiz-Ángel MJ, Torres-Lapasió JR, García-Álvarez-Coque MC, Carda-Broch S. [Submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes applied to the separation of  \$\beta\$ -blockers](#). *J Chromatogr A* 2009; 1216: 3199-3209.
6. Ertürk S, Sevinç Aktaş E, Ersoy L, Fıçıoğlu S. [An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets](#). *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33: 1017-1023.
7. Petkovska R, Cornett C, Dimitrovska A. [Development and validation of rapid resolution RP-HPLC method for simultaneous determination of atorvastatin and related compounds by use of chemometrics](#). *Anal Lett* 2008; 41: 992-1009.
8. Nigović B, Damić M, Injac R, Kočevar Glavač N, Štrukelj B. [Analysis of atorvastatin and related substances by MEKC](#). *Chromatographia* 2009; 69: 1299-1305.

9. Mornar A, Damić M, Nigović B. Separation, characterization, and quantification of atorvastatin and related impurities by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Lett* 2010; 43: 2859-2871.
10. Malenović A, Jančić-Stojanović B, Kostić N, Ivanović D, Medenica M. Optimization of artificial neural networks for modeling of atorvastatin and its impurities retention in micellar liquid chromatography. *Chromatographia* 2011; 73: 993-998.
11. Vora DN, Kadav AA. [Validated ultra HPLC method for the simultaneous determination of atorvastatin, aspirin, and their degradation products in capsules.](#) *J Liq Chromatogr Rel Technol* 2008; 31: 2821-2837.
12. Seshadri RK, Desai MM, Raghavaraju TV, Krishnan D, Rao DV, Chakravarthy IE. Simultaneous quantitative determination of metoprolol, atorvastatin and ramipril in capsules by a validated stability-indicating RP-UPLC method. *Sci Pharm* 2010; 78: 821-834.
13. Nováková L, Šatínský D, Solich P. [HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin.](#) *Trends Anal Chem* 2008; 27: 352-367.
14. European Pharmacopoeia, 6th ed., Council of Europe, Strasburg Cedex 2008. pp. 74
15. Christophe AB. [Valley to peak ratio as a measure for the separation of two chromatographic peaks.](#) *Chromatographia* 1971; 4: 455-458.
16. Ermer J. Performance Parameters, Calculations and Tests. In: Ermer J, Miller McB JH. ed. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis, A Guide to Best Practice*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005: 55-57.
17. López-Grió S, Baeza-Baeza JJ, García-Alvares-Coque MC. [Influence of the addition of modifiers on solute-micelle interaction in hybrid micellar liquid chromatography.](#) *Chromatographia* 1998; 48: 655-663.
18. Ruiz-Ángel MJ, Torres-Lapasió JR, García-Álvares-Coque MC, Carda-Broch S. [Retention mechanisms for basic drugs in the submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes.](#) *Anal Chem* 2008; 80: 9705-9713.
19. Derringer G, Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. *J Quality Technol.* 1980; 12: 214-219.



# Multikriterijumski pristup optimizaciji metode micelarne tečne hromatografije za analizu atorvastatina i njegovih nečistoća

Anđelija Malenović, Nađa Kostić, Ana Vemić, Tijana Rakić,  
Biljana Jančić-Stojanović

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,  
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Autor za korespondenciju: [andja@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:andja@pharmacy.bg.ac.rs);  
tel.: +381 11 3951 333; fax.: +381 11 3972 840;

---

## Kratak sadržaj

U ovom radu, za optimizaciju metode micelarne tečne hromatografije (MLC) namenjene za farmaceutsku analizu atorvastatina i njegovih nečistoća, *trans*-atorvastatina i desfluoro-atorvastatina primenjen je multikriterijumski pristup. MLC je oblik reverzno-fazne tečne hromatografije gde promene u mobilnoj fazi dovode i do modifikacije stacionarne faze. Ovo rezultuje različitim interakcijama (hidrofobnim, jonskim, sternim) sa značajnim uticajem na retenciju i selektivnost. Zbog toga je za separaciju odabran surfaktant koji sadrži dvostruki lanac i atom kiseonika, natrijum dioktil sulfosukcinat – AOT (Aerosol OT). Kao najefikasniji način za istraživanje velikog broja faktora i istovremenu optimizaciju suprotstavljenih ciljeva (minimizacija vremena trajanja razdvajanja i maksimizacija rezolucije između atorvastatina i *trans*-atorvastatina) primenjena je multikriterijumska optimizacija. Centralni kompozicioni dizajn (CCD) sa frakcionim faktorskim dizajnom,  $\pm 0.5$  zvezda dizajnom i četiri replikacije u centralnoj tački korišćen je za definisanje plana eksperimenta. Korišćenjem *Derringer* funkcije poželjnih odgovora, optimizirano je pet odgovora. Predviđeni optimalni uslovi bili su: 32 % acetonitrila, 2 % etilen-glikola, 66 % 6,4 mmol L<sup>-1</sup> AOT u 20 mmol L<sup>-1</sup> amonijum-acetatu, pH vodene faze 5,50 podešen sirčetnom kiselinom, protok 1,15 mL min<sup>-1</sup> uz temperaturu kolone 10 °C.

**Ključne reči:** Multikriterijumska optimizacija, *Derringer* funkcija poželjnih odgovora, Micelarna tečna hromatografija, Atorvastatin i njegove nečistoće

---

## **Analiza, adaptacija i validacija dokumenta za procenu kompetencija farmaceuta**

**Svetlana Stojkov Rudinski<sup>1</sup>, Ivana Tadić<sup>2</sup>, Tatjana Crnjanski<sup>1</sup>,  
Dušanka Krajnović<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ZU Apoteka Subotica, Matije Gupca 26, 24000 Subotica

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za socijalnu farmaciju i farmaceutsko zakonodavstvo, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

Autor za korespondenciju: Svetlana Stojkov Rudinski,  
e-mail: [direktor@apotekasubotica.rs](mailto:direktor@apotekasubotica.rs)

---

### **Kratak sadržaj**

Kompetentnost farmaceuta jedan je od osnovnih preduslova za obezbeđivanje farmaceutske zaštite visokog kvaliteta. Okvir opšteg nivoa (eng. *General Level Framework - GLF*) koji je razvila grupa britanskih stručnjaka (eng. *Competency Development and Evaluation Group - CoDEG*) obuhvata odgovarajući upitnik i metode koje omogućavaju definisanje, procenu i razvoj stručne osposobljenosti farmaceuta u pružanju farmaceutske zdravstvene zaštite. U okviru Apoteke Subotica je iniciran i organizovan panel eksperata radi analize, adaptacije i validacije GLF dokumenta za primenu u javnim apotekama u Srbiji.

U radu je dat prikaz adaptacije GLF dokumenta za primenu u javnim apotekama u Srbiji.

Dokument je analiziran sa aspekta relevantnosti, razumljivosti, nacionalne regulative i primenljivosti u praksi putem anonimnih ocena i diskusije učesnika panela eksperata. Validirani su nazivi i opisi 26 kompetencija farmaceuta identifikovanih u hrvatskoj verziji originalnog dokumenta.

Dokument za procenu kompetencija farmaceuta prilagođen je farmaceutskoj praksi i regulativi u Srbiji, pri čemu su, uz odgovarajuće, manje, izmene s ciljem prilagođavanja farmaceutskoj praksi i regulativi u Srbiji, prihvaćene sve kompetencije iz originalnog dokumenta.

GLF dokument je, na osnovu adaptacije sprovedene od strane panela eksperata, pokazao zadovoljavajuće karakteristike za primenu u farmaceutskoj praksi u Srbiji.

***Ključne reči:*** Kompetencija, Okvir opšteg nivoa, Apoteka Subotica

---

## Uvod

U savremenim zdravstvenim sistemima farmaceuti imaju aktivnu ulogu u obezbeđivanju racionalne farmakoterapije i preuzimaju odgovornosti za ishode lečenja. Nove uloge farmaceuta zahtevaju nadogradnju već postojećih znanja stečenih visokim obrazovanjem i kontinuirano unapređenje farmaceutskih veština. Pored stručne edukacije, kontinuirana procena stručnog rada može biti primenjena kao podsticaj za unapređenje znanja i veština, a time i kompetentnosti farmaceuta. Razvijene kompetencije farmaceuta doprinose pružanju farmaceutske zdravstvene zaštite visokog kvaliteta koja se zahteva kako od strane drugih zdravstvenih radnika tako i od odgovarajućih regulatornih tela [1].

Kompetencije obuhvataju odgovarajuća znanja, veštine i iskustvo, a prema Videtu i Holifordu predstavljaju stručnu sposobnost zasnovanu na radu i rezultatima rada [2]. Cilj razvoja kompetencija farmaceuta je sticanje, primena i razmena kompetencija između kolega, neophodnih za unapređenje kvaliteta rada i pružanja farmaceutske zdravstvene zaštite. U poslednjih nekoliko godina uočeno je posebno interesovanje Međunarodne federacije farmaceuta (eng. *International Pharmaceutical Federation - FIP*) za razvoj efikasnih programa za vrednovanje i razvoj kompetencija u apotekarskoj delatnosti [3, 4].

Razvoj kompetencija u apotekarstvu jedan je od preduslova za pružanje kvalitetne farmaceutske zdravstvene zaštite i preuzimanje odgovornosti za ishod lečenja pacijenata. Potrebne kompetencije usmerene su i na izvršavanje zadataka i na usvajanje određenih obrazaca ponašanja da bi briga o pacijentu dostigla željeni kvalitet [5].

Jedan od preporučenih modela za procenu i razvoj kompetencija farmaceuta je dokument „Okvir opšteg nivoa“ (eng. *General Level Framework document – GLF dokument*), razvijen 2005. godine od strane Akademske grupe za razvoj i evaluaciju kompetencija (eng. *Competency Development and Evaluation Group - CoDEG*) Velike Britanije [6]. GLF dokument sadrži detaljne opise radnji, veština i znanja koje farmaceut treba da primenjuje u pružanju farmaceutske usluge da bi bio procenjen kao kompetentan.

GLF dokument se sastoji iz 4 segmenta:

1. Kompetencije pružanja farmaceutske zdravstvene zaštite
2. Kompetencije rešavanja problema
3. Lične kompetencije
4. Kompetencije menadžmenta i organizacije

Ovaj dokument se pokazao dobrim alatom ne samo za evaluaciju, nego i za razvoj stručnih kompetencija u farmaceutskoj delatnosti. Do sada su projekti implementacije GLF sprovedeni u Velikoj Britaniji, Singapuru, Australiji, Novom Zelandu i Hrvatskoj [7]. Takođe se koristi za procenu polaznih kompetencija i napretka ostvarenog u toku pohađanja poslediplomskog studijskog programa iz bolničke farmacije (*MSc in Hospital Pharmacy*) [8].

U Srbiji do sada nije ustanovljen sistem procene stručnih kompetencija farmaceuta u praksi. Upoznavši se sa GLF dokumentom, menadžment i stručni savet Apoteke Subotica, prihvatio je ovaj dokument kao proveren način za procenu i razvoj stručnih kompetencija farmaceuta.

Cilj ovog rada je prikaz postupka prilagođavanja GLF dokumenta farmaceutskoj praksi i zakonskoj regulativi naše zemlje.

## **Metode**

### ***Formiranje GLF tima Apoteke Subotica***

Projekat razvoja okvira za procenu kompetencija namenjenog farmaceutskoj praksi u Srbiji započeo je u januaru 2011. godine kada je formiran tim za implementaciju GLF dokumenta Apoteke Subotica. Ovaj tim je uključio 7 diplomiranih farmaceuta, od kojih je četvoro završilo različite vidove poslediplomskog usavršavanja (specijalističke akademske studije studijskih programa: Farmaceutski menadžment i marketing, Farmakoekonomija i farmaceutska legislativa i Farmaceutska zdravstvena zaštita). Članovi tima imali su zadatke da aktivno učestvuju u projektu implementacije okvira za procenu kompetencija. Njihovi zadaci bili su: (i) priprema materijala za panel eksperata koji je obuhvatao prevod i obradu GLF dokumenta usvojenog u Hrvatskoj, (ii) učešće u panelu eksperata, validaciju pojedinačnih kompetencija, (iii) procenu kompetentnosti farmaceuta, (iv) analizu i (v) evaluaciju rezultata procene i edukaciju farmaceuta.

### ***Formiranje panela eksperata i validacija GLF-dokumenta***

Pre implementacije GLF dokumenta, Apoteka Subotica potpisala je memorandum o saradnji sa CoDEG grupom. Dodeljeni tutor ispred CoDEG grupe bio je njihov predstavnik iz Hrvatske. Kao model GLF obrasca predložen je dokument koji je pripremljen u toku sprovođenja sličnog projekta u Hrvatskoj, gde se praksa i regulativa ne razlikuju bitno od prakse javnih apoteka u Srbiji.

Originalni GLF dokument evaluiran je u Hrvatskoj tokom 2009. godine kada su napravljene izmene vezane, pre svega, za različitu zakonsku regulativu u odnosu na Veliku Britaniju, kao što su, na primer, ovlašćenja farmaceuta da sprovedu propisivanje lekova.

Formiranje panela eksperata i usvajanje srpske verzije GLF dokumenta sprovedeno je u periodu 1.2 - 1.3.2011. godine.

Početkom februara kontaktirane su najviše strukovne institucije u Srbiji sa ciljem delegiranja predstavnika panela eksperata. Svoje učešće potvrdile su sve kontaktirane institucije i zdravstvene ustanove. Učesnicima panela eksperata dostavljen je materijal potreban za diskusiju (hrvatska verzija GLF dokumenta), a institucijama i organizacijama ugovor o saradnji.

Razmatranje hrvatske verzije GLF - dokumenta sprovedeno je u okviru panela eksperata u kojem je učestvovalo 14 članova predstavnika: Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (2 člana), Farmaceutske komore Srbije (1 član), Saveza farmaceutskih udruženja Srbije (2 člana), apoteka - Apoteke Subotica (5 članova) i Apoteke Sombor (1 član), Doma zdravlja Subotica (1 član), Opšte bolnice Subotica (2 člana), uz predstavnicu CoDEG grupe za jugoistočnu Evropu, kao moderatora panela. Na ovaj način su u rad panela eksperata uključeni farmaceuti iz prakse (zaposleni u javnim i bolničkim apotekama), farmaceuti koji učestvuju u kreiranju zdravstvene politike i predstavnici akademskih ustanova. Takođe, članovi tima eksperata bili su i lekar specijalista opšte medicine i diplomirani psiholog.

Validacija sadržaja prvog segmenta GLF - dokumenta izvršena je pregledom dokumenta i analizom uz odgovarajuću diskusiju, primenom Delfi metode [7, 9]. Procenjeno je da li sve stavke u postojećem dokumentu odražavaju koncept kompetencija karakterističan za farmaceutsku praksu u Srbiji. Svaka pojedinačna kompetencija razmatrana je sa aspekta razumljivosti, relevantnosti, usklađenosti sa nacionalnom regulativom i primenljivosti u praksi. Pored naziva, razmatran je i detaljan opis sadržaja svake kompetencije. Nakon toga, svaki član panela eksperata anonimno je ocenjivao svaku kompetenciju na skali od 1 do 10. Kompetencija je usvojena ukoliko je ocenjena prosečnom ocenom višom od 7. U slučaju niže prosečne ocene, o kompetenciji se diskutovalo do postizanja konsenzusa. Nakon usvajanja kompetencija na osnovu dobijene prosečne ocene, pojedini opisi sadržaja su delimično izmenjeni s ciljem usklađivanja sa zakonskom regulativom i farmaceutskom praksom u Srbiji.

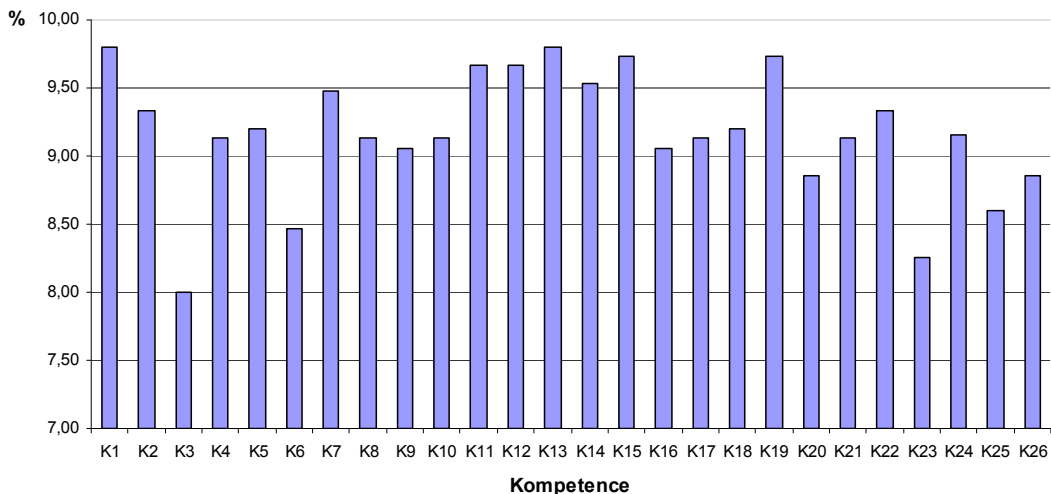
## **Rezultati**

Panel eksperata evaluirao je ukupno 26 kompetencija GLF dokumenta koje su pojedinačno navedene u Tabeli I.

**Tabela I** Nazivi kompetencija prema GLF dokumentu**Table I** The list of competences according to GLF

K1.	Procena pacijenta i/ili korisnika usluga i njegovih potreba
K2.	Konsultacija sa kolegom i/ili upućivanje pacijenta lekaru
K3.	Beleženje konsultacija
K4.	Saglasnost pacijenta
K5.	Prikupljanje informacija o bolesniku/pacijentu
K6.	Uzimanje istorije primenjenih lekova (farmako-anamneza)
K7.	Interakcije lek – lek
K8.	Interakcije lek – pacijent
K9.	Interakcije lek – bolest
K10.	Kontrola doziranja
K11.	Izbor načina i vremena doziranja
K12.	Izbor farmaceutskog oblika i jačine leka
K13.	Recept je jasan
K14.	Recept je zakonit, ispravan (legalan)
K15.	Označavanje leka
K16.	Javno zdravstvo
K17.	Zdravstvene potrebe
K18.	Identifikovana potreba za informacijama
K19.	Informacije o lekovima
K20.	Pružanje pisanih informacija
K21.	Identifikacija problema terapije lekovima
K22.	Procena važnosti problema terapije lekovima
K23.	Upotreba smernica
K24.	Rešavanje problema terapije lekovima
K25.	Beleženje intervencija
K26.	Procena rezultata intervencije

Učesnici panela eksperata usvojili su sve predložene kompetencije sa postignutim prosečnim ocenama iznad 7. Raspodela srednjih vrednosti ocena dodeljenih pojedinačnim kompetencijama prikazana je grafički na Slici 1.



**Slika 1 Prosečne ocene pojedinačnih kompetencija**

**Figure 1 The average mark of each competency**

Nakon ocenjivanja kompetencija, za svaki opis kompetencija razmatran je aspekt zakonske regulative kao i razlike u radu apoteka u Republici Hrvatskoj i Republici Srbiji. Delimične izmene opisa kompetencija u odnosu na Hrvatsku verziju GLF dokumenta izvršene su za kompetencije: K1, K3, K13, K14, K15, K16 i K18, što je detaljnije navedeno u daljem tekstu.

### **K1 Procena pacijenta/korisnika usluga i njihovih potreba**

Hrvatska verzija GLF dokumenta konkretno navodi korake u komunikaciji sa pacijentom. Srpska verzija ne navodi konkretne situacije, već opisno objašnjava kakva komunikacija između farmaceuta i pacijenta treba da bude, kako bi se prepoznale potrebe pacijenata/korisnika.

### **K3 Beleženje konsultacija**

U srpskoj verziji je više istaknut značaj beleženja konsultacija. Shodno stepenu primene informacionog sistema, u hrvatskoj verziji istaknut je značaj vođenja beleški u elektronskom obliku, dok u srpskoj nije naznačen način beleženja.

### **K13 Recept je jasan**

Kao i u hrvatskoj verziji GLF dokumenta, naglašeno je da recept mora biti čitko, precizno i nedvosmisleno popunjen, te da farmaceut prilikom izdavanja ne sme biti u dilemi u vezi sa vrstom, jačinom i ostalim podacima vezanim za propisan lek.

U srpskoj verziji GLF dokumenta pominje se pored ovoga i značaj izdavanja lekova u skladu sa savremenim farmakoterapijskim principima, kao i odgovarajuća





kvaliteta. Srpska verzija pruža konkretne informacije, dok je u hrvatskom dokumentu preporučena poseta određenim internet stranicama na kojima se mogu naći informacije vezane za unapređenje javnog zdravlja kroz delatnost apoteke.

### **K18 Identifikovana potreba za informacijama**

U srpskoj verziji GLF dokumenta, u odnosu na hrvatsku, detaljnije je opisan način komunikacije farmaceuta sa pacijentima. U srpskoj verziji se više ističe veština komunikacije farmaceuta, dok je u hrvatskoj naglasak stavljen na potrebe pacijenata i prilagođavanje komunikacije samom pacijentu.

### **Diskusija**

Originalni GLF dokument baziran je na praksi apoteka u Velikoj Britaniji, čiji se rad razlikuje sa aspekta regulative u odnosu na rad u Hrvatskoj i Srbiji [10].

Menadžment Apoteke Subotica inicirao je i organizovao panel eksperata sa ciljem postizanja nacionalnog konsenzusa u formiranju GLF dokumenta prilagođenog farmaceutskoj praksi i zakonskoj regulativi u Srbiji. Ocenjivanjem svake kompetencije, ispitano je mišljenje članova panela eksperata o tome koliko je svaka od kompetencija unutar GLF dokumenta značajna u farmaceutskoj praksi, odnosno njena relevantnost i usklađenost sa zakonskom regulativom u Srbiji. Usvajanjem svih 26 kompetencija prvog segmenta originalnog GLF dokumenta stvoreni su preduslovi za samoprocenu kompetentnosti farmaceuta, kao i procena kompetentnosti farmaceuta od strane kolega [6, 7, 11]. Takođe, omogućena je procena razvoja kompetencija farmaceuta nakon određenog perioda edukacije [12]. Dokument je modeliran u odnosu na specifičnosti zdravstvenog sistema u Srbiji, nacionalnu zakonsku regulativu i ulogu farmaceuta u zdravstvenoj zaštiti građana. Prednost metodologije razvoja srpske verzije GLF dokumenta ogleda se u učešću većeg broja stručnjaka (diplomiranih farmaceuta, lekara i diplomiranog psihologa), predstavnika strukovnih institucija i organizacija. Dokument je prilagođen trenutnom stanju u praksi, zakonskoj regulativi i strategiji razvoja farmaceutske struke putem unapređenja znanja i veština u skladu sa ciljevima iskazanim u okviru statuta Saveza farmaceutskih udruženja Srbije [13].

Primenom kombinacije Delfi metoda i metoda nominalne grupe, u Hrvatskoj je na sličan način validiran originalan GLF dokument. Članovi panela beležili su anonimno svoje stavove o svakoj kompetenciji pojedinačno i ocenjivali svaku kompetenciju na linearnoj analognoj skali od 0 do 10 shodno njenoj važnosti u pružanju farmaceutske zdravstvene zaštite. Bodovi na skali 1,00 - 3,00, označavali su da izjava/kompetencija nije relevantna za praksu javnih apoteka; 4,00 - 6,00 da izjave/kompetencije mogu i ne moraju biti od značaja za farmaceutsku praksu; iznad 6,00 predstavljaju veoma značajne izjave/kompetencije. Nakon bodovanja usvojeni su nazivi kompetencija, a nakon toga izvršena su delimična podešavanja pojedinih opisa. Sadržaj kompetencija koji se odnosi na ulogu farmaceuta u propisivanju lekova, kao i sadržaj koji opisuje medicinsku

dokumentaciju, pretrpeli su najveće promene usled prilagođavanja važećoj zakonskoj regulativi i farmaceutskej praksi u Hrvatskoj [7].

Kao i u Hrvatskoj, na panelu eksperata u Apoteci Subotica, sve razmatrane kompetencije prepoznate su kao važne za farmaceutskej praksu, o čemu govore visoke srednje ocene kompetencija, čija se vrednost kretala u rasponu između 8,26 i 9,80. Ovi podaci istovremeno govore i o visokom stepenu usaglašenosti stavova svih učesnika.

Nešto nižu ocenu u odnosu na ostale dobila je kompetencija K23 („upotreba smernica“), što su učesnici panela obrazložili odsustvom odgovarajućih smernica namenjenih farmaceutima. Kroz diskusiju članova panela eksperata prihvaćen je stav da u periodu dok se ne kreiraju i usvoje smernice za farmaceute treba koristiti dostupne smernice namenjene lekarima opšte prakse.

Najvišu ocenu članova panela eksperata, dobile su kompetencije K1 („procena pacijenta i/ili korisnika usluga“) i K13 („recept je jasan“), čija je srednja vrednost iznosila 9,8. Obe kompetencije prepoznate su kao vrlo važan aspekt stručne osposobljenosti farmaceuta.

Ocene usvojenih 26 kompetencija prvog segmenta GLF dokumenta u Hrvatskoj bile su u rasponu od 7,0 do 9,7 [7]. Najvišu ocenu (9,7) dobila je kompetencija K10 („kontrola doziranja“), dok je druga kompetencija sa visokom ocenom od 9,5 kompetencija K1 („procena pacijenta i/ili korisnika usluga“), koja je i od strane panela eksperata u Srbiji dobila najvišu ocenu. Najslabije ocenjene kompetencije u Hrvatskoj bile su kompetencije K3 („beleženje konsultacija“) i K16 („javno zdravlje“) koje su dobile istu ocenu - 7,0. Kompetencija K16 u Srbiji je ocenjena visokom ocenom od 9,06, čime su učesnici panela eksperata dali veliki značaj ulozi farmaceuta u zdravstvenoj edukaciji građana.

U narednom periodu slede aktivnosti na proceni kompetencija farmaceuta, kao i njihovog razvoja. Ovakav pristup razvoju kompetencija omogućiće farmaceutskej struci da istakne važnost svoje uloge i poziva, kao i da farmaceutskej profesiju učini vidljivom i prepoznatljivom u zdravstvenom timu i sistemu.

## **Zaključak**

U savremenim zdravstvenim sistemima farmaceuti imaju aktivnu ulogu u obezbeđivanju racionalne farmakoterapije i preuzimaju odgovornost za ishode lečenja. Nove uloge farmaceuta zahtevaju razvoj odgovarajućih kompetencija kroz nadogradnju već postojećih znanja i kontinuirano unapređenje farmaceutskeih veština. GLF dokument, razvijen u Velikoj Britaniji, predstavlja osnov za procenu kompetencija farmaceuta u radu u apoteci. Apoteka Subotica prva je institucija u Srbiji, a i među prvima u svetu koja je prepoznala značaj procene i razvoja kompetencija u stručnom radu farmaceuta i započela projekat na primeni okvira opšteg nivoa za procenu kompetencija u svom svakodnevnom radu. Pripremom GLF dokumenta na srpskom jeziku, uz odgovarajuće izmene s ciljem usklađivanja sa nacionalnom zakonskom regulativom i farmaceutskej praksom u javnim apotekama u Srbiji, nastao je dokument

od nacionalnog značaja, čime su postavljeni realni osnovi za procenu i razvoj kompetencija farmaceuta u skladu sa svetskim trendovima i standardima.

Zahvaljujemo moderatoru panela eksperata (mr ph Arijani Meštrović), svim članovima i učesnicima panela eksperata, kao i institucijama koje su podržale ovaj projekat (Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Savezu farmaceutskih udruženja Srbije, Farmaceutskoj komori Srbije, Apoteci Sombor, Opštoj bolnici i Domu zdravlja u Subotici).

## Literatura

1. The international forum for quality assurance of pharmacy education. A Global Framework for Quality Assurance of Pharmacy Education [Internet]. International Pharmaceutical Federation; 2008 [cited 2011 Oct 3]. Available from: <http://www.fip.org/files/fip/PharmacyEducation/GlobalFrameworkFinalDraft.pdf>.
2. Whiddett S, Hollyforde S. The competencies handbook. London: Institute of Personnel and Development; 1999.
3. Anderson C, Bates I, Beck D, et al. FIP Roundtable Consultation on Pharmacy Education: Developing a Global Vision and Action Plan. *Int Pharm J.* 2006; 20(2):12-13.
4. Anderson C, Bates I, Beck D, et al. Action! Update on the Global Pharmacy Education Consultation. *Int Pharm J.* 2008;22:6-8.
5. McRobbie D, Webb D, Bates I, Wright J, Davies J. Assessment of Clinical competence: Designing a Competence Grid for Junior Pharmacists. *Pharm Educ.* 2001;1:67-76.
6. Mills E, Farmer D, Bates I, Davies JG, Webb D, Robbie D. Development of an evidence-led competency framework for primary care and community pharmacists. *Pharm J.* 2005; 275:48-52.
7. Mestrovic A, Stanisic Z, Hadziabdic MO, et al. Evaluation of Croatian Community Pharmacists Patient Care Competencies Using the General Level Framework. *Am J Pharm Educ.* 2011;75(2):36.
8. McMahon N. Postgraduate Education of Hospital Pharmacists, Tempus PQPharm Seminar Pharmacy Education: meeting Patient need through Practice Development, Dublin, March, 16th 2012.
9. Jones J, Hunter D. Consensus methods for medical and health services research. *Br Med J.* 1995;311(7001):376-80.
10. A Framework for Pharmacists Development in General Pharmacy Practice, 2nd ed [Internet]. The Competency Development and Evaluation Group. [cited 2011 July 7]. Available from: <http://www.codeg.org>.
11. Mills E, Laaksonen R, Bates I, Davies G, Duggan C. Self-assessment of a competence in community pharmacy setting. *Pharm Educ.* 2000; 5(3/4):189-199.
12. Laaksonen R, Mills ER, Duggan C, Davies JG, Bates I, Mackie CA. The effect of training and service provision on the self-assessed competence of community pharmacists. *Int J Pharm Pract.* 2007; 15:141-147.
13. Statut saveza farmaceutskih udruženja Srbije [Internet]. Savez farmaceutskih udruženja Srbije. [cited 2011 July 7]. Available from: <http://www.farmacia.org>.

# **Analysis, adaptation and validation of the instrument for the competence evaluation of the pharmacists in community pharmacies**

**Svetlana Stojkov Rudinski<sup>1</sup>, Ivana Tadić<sup>2</sup>, Tatjana Crnjanski<sup>1</sup>,  
Dušanka Krajnović<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Community Pharmacy Subotica, Matije Gupca 26, 24000 Subotica

<sup>2</sup> University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Social Pharmacy and Pharmaceutical Legislation, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

---

## **Summary**

The competency of a pharmacist is one of the fundamental preconditions for high-quality pharmaceutical care provision. The General Level Framework (GLF), which was developed by a group of British experts (*Competency Development and Evaluation Group - CoDEG*), represents a tool that allows definition, measurement and professional competences development of the pharmacist during pharmaceutical care provision. Community Pharmacy Subotica organized an expert panel in order to analyse, adapt and validate the GLF document, which would be relevant to pharmacy practice in Serbia.

The aim of the paper is to present the adaptation process of the GLF document that could be used in community pharmacies in Serbia.

Validation of the document was performed using the expert panel methodology. The document was analyzed in terms of relevance, comprehension, compliance with national regulation, and applicability in practice, through anonymous evaluation and discussion of the expert panel participants. Titles and descriptions of each competence (26 in total) were validated.

The document for the competence assessment was adapted in accordance with the pharmacy practice and regulations in Serbia. All the competencies of the original document were accepted, with minor modifications in order to accommodate pharmaceutical practices and regulations in Serbia.

GLF document, have shown satisfactory properties to be used in the pharmacy practice in Serbia, based on the adaptation carried out by the expert panel.

**Key words:** Competence, GLF-General Level Framework,  
Community Pharmacy Subotica

---

# **In silico predviđanje apsorpcije karbamazepina nakon oralne primene tableta sa trenutnim oslobađanjem**

**Sandra Grbić\*, Jelena Parojčić, Zorica Đurić**

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

\*Sandra Grbić      tel: +381638611341      Fax: +381113972840  
E-mail adresa: [gsandra@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:gsandra@pharmacy.bg.ac.rs)

---

## **Kratak sadržaj**

Da bi se procenila mogućnost primene laboratorijskih (*in vitro*) i računarskih (*in silico*) metoda za predviđanje apsorpcije lekovite supstance u gastrointestinalnom traktu (GIT-u) i uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVK), neophodno je prethodno identifikovati *in vivo* profil oslobađanja lekovite supstance iz preparata. U slučaju lekovitih supstanci koje, zbog slabe rastvorljivosti, nije moguće primeniti intravenski, apsorpciju nije moguće predvideti primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda, pa je zato poslednjih godina veliki istraživački interes usmeren ka primeni mehanističkih apsorpcionih modela. Cilj ovog rada je da se: i) primenom *in silico* apsorpcionog modela razvije lek-specifičan model za predviđanje apsorpcije karbamazepina, ii) identifikuje profil *in vivo* oslobađanja koji će služiti kao osnova za uspostavljanje IVIVK, iii) identifikuju biorelevantne specifikacije za brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem i iv) dobijeni rezultati uporede sa rezultatima prethodnih studija. Za *in silico* predviđanje apsorpcije karbamazepina primenjen je GastroPlus™ programski paket. Vrednosti ulaznih parametara potrebnih za simulaciju su preuzete iz literature ili su korišćene *in silico* predviđene i/ili eksperimentalno određene vrednosti. Za utvrđivanje stepena korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka primenjen je konvolucionni pristup uspostavljanju IVIVK. Dobijeni rezultati su pokazali da je primenom *in silico* metode moguće uspešno simulirati apsorpciju karbamazepina nakon oralne primene i da se dobijeni profil koncentracije leka u krvi može koristiti kao ciljani profil za IVIVK i identifikovanje „biorelevantnih“ specifikacija za *in vitro* brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta.

**Ključne reči:** karbamazepin, *in silico* simulacija apsorpcije, brzina rastvaranja, *in vitro-in vivo* korelacija

---

## Uvod

Procena brzine i stepena apsorpcije, odnosno biološke raspoloživosti lekovitih supstanci iz oralno primenjenih farmaceutskih preparata predstavlja važan korak u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika i osnov je razvoja „biorelevantnog“ testa za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata. Prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije lekova (BSK), ograničavajući faktori za apsorpciju lekovite supstance se mogu identifikovati na osnovu njene rastvorljivosti/brzine rastvaranja u fiziološkim tečnostima i permeabilnosti kroz intestinalnu membranu (1). Kada su u pitanju slabo rastvorljive lekovite supstance (BSK klasa II), za procenu rastvorljivosti *in vivo* potrebno je razmotriti kombinovani uticaj fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance i fizioloških uslova u organizmu.

Stepen i brzina kojom lekovite supstance dospevaju u sistemsku cirkulaciju se najčešće procenjuju konvencionalnim farmakokinetičkim metodama (numerička dekonvolucija, metoda Wagner Nelson-a, metoda Loo Riegelman-a), na osnovu podataka o koncentraciji leka u plazmi u toku vremena dobijenih nakon intra- i/ili ekstravaskularne primene leka. No, u slučajevima kada se, zbog slabe rastvorljivosti, lek ne može primeniti u obliku rastvora za intravensku primenu ili kada lek pokazuje nelinearnu kinetiku, primena ovih metoda nije moguća. Iz tog razloga poslednjih godina veliku pažnju privlači razvoj *in silico* metoda kojima je apsorpciju lekovite supstance moguće predvideti na osnovu njenih fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina (2-6). Do sada je u ove svrhe razvijeno nekoliko programskih paketa, od kojih je najšire korišćen GastroPlus<sup>TM</sup> program (3-11). Ovaj program zahteva veliki broj ulaznih parametara koji se odnose na osobine izabranog fiziološkog sistema, fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine lekovite supstance, kao i izvesne osobine primenjenog farmaceutskog oblika. Čak i male varijacije u vrednostima ulaznih parametara mogu značajno uticati na preciznost predviđanja, pa su procena uticaja pojedinačnih faktora na apsorpciju lekovite supstance i odabir adekvatnih podataka u ovom postupku od ključnog značaja za uspešnu simulaciju.

Karbamazepin (CBZ) se koristi u terapiji epilepsije, bipolarnih afektivnih poremećaja i trigeminalne neuralgije. U pitanju je supstanca koja, zbog visoke vrednosti konstante disocijacije  $pK_a$  13.9 (12), ne jonizuje u fiziološkom opsegu pH vrednosti. Prema kriterijumu BSK, pripada grupi slabo rastvorljivih, visoko permeabilnih supstanci (BSK klasa II), pri čemu literaturni podaci za rastvorljivost u vodi variraju u opsegu 0.11-0.26 mg/ml (što odgovara doznom broju ( $D_6$ ) od 6.15 do 14.54) (13-17). U literaturi se navodi da je apsorpcija karbamazepina nakon oralne primene spora i varijabilna (18, 19). Naime, kliničke studije su pokazale da postoje značajne varijacije u brzini i obimu apsorpcije ove supstance, kako između pojedinaca, tako i nakon primene različitih preparata (20-22). Sa druge strane, dokumentovane su i studije u kojima su rezultati kliničkog ispitivanja pokazali biološku ekvivalentnost između preparata koji su ispoljili značajne razlike u brzini rastvaranja CBZ *in vitro* (18, 22, 23). S obzirom na to da ne postoje podaci o i.v. primeni rastvora karbamazepina, apsolutna biološka

raspoloživost ove supstance nije poznata, što ograničava primenu nekih konvencionalnih farmakokinetičkih metoda za analizu njene apsorpcije. U literaturi su opisane studije u kojima je za utvrđivanje profila *in vivo* apsorpcije/brzine rastvaranja karbamazepina i procenu *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVK) nivoa A primenjen dekonvolucionni pristup zasnovan na profilu apsorpcije izračunatom primenom Wagner-Nelson-ove metode, kao i konvolucionni pristup zasnovan na profilu koncentracije leka u plazmi predviđenom primenom GastroPlus™ programa (7, 9, 18, 21, 22, 24). Polazeći od pretpostavke da se dispozicija karbamazepina u organizmu može opisati jednodimenzionalnim farmakokinetičkim modelom, Homšek i saradnici su *in vivo* dobijene vrednosti o koncentraciji lekovite supstance u plazmi nakon primene dva preparata (tablete sa trenutnim oslobađanjem) karbamazepina analizirali primenom Wagner-Nelsonove metode. Poređenjem dobijenog profila apsorpcije sa profilima brzine rastvaranja karbamazepina *in vitro* u različitim medijumima pokazali su da je u slučaju *in vitro* ispitivanja u određenim medijumima (voda, 0,1 M HCl, acetatni pufer pH 4.5, 1% vodeni rastvor natrijum-laurilsulfata (NaLS)) moguće uspostaviti visok stepen IVIVK za pojedinačne preparate. Međutim, ni u jednom od primenjenih medijuma nije postignuta dobra korelacija za zbirni set podataka za oba ispitivana preparata. Stoga nije bilo moguće identifikovati jedinstven medijum za predviđanje biofarmaceutskih svojstava tableta sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina (18). Sa druge strane, rezultati Kovačevića i saradnika, dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije u kombinaciji sa IVIVK, ukazali su na to da bi se 1% rastvor NaLS mogao smatrati univerzalnim „biorelevantnim“ medijumom za *in vitro* ispitivanje tableta sa trenutnim i tableta sa kontrolisanim oslobađanjem karbamazepina. Pri ovome je za uspostavljanje IVIVK korišćen zbirni set podataka za tablete sa trenutnim i kontrolisanim oslobađanjem karbamazepina (7).

Kada je u pitanju gastrointestinalna simulacija apsorpcije karbamazepina, u do sada opisanim studijama su za razvijanje modela apsorpcije ove supstance korišćeni različiti ulazni parametri. Tako su Kovačević i saradnici (7) za opisivanje farmakokinetike karbamazepina koristili parametre koji karakterišu jednodimenzionalni model, dok su Zhang i saradnici (9) smatrali da se dispozicija karbamazepina nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem najbolje može opisati dvodimenzionalnim modelom i, u skladu sa tim, odgovarajućim farmakokinetičkim parametrima. Pored toga, greška predviđanja modela Kovačevića i saradnika i Zhanga i saradnika je procenjena u odnosu na podatke dobijene iz različitih *in vivo* studija. Samim tim su se i razvijeni modeli apsorpcije CBZ u izvesnom stepenu razlikovali.

Cilj ovog rada je da se: i) proceni mogućnost primene GastroPlus™ programskog paketa za *in silico* predviđanje apsorpcije karbamazepina i identifikovanje profila *in vivo* oslobađanja koji će služiti kao osnova za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije, ii) identifikuju biorelevantne specifikacije za brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Da bi se procenila validnost i robustnost razvijenog modela za *in silico* predviđanje apsorpcije karbamazepina, dobijeni rezultati su

upoređeni sa rezultatima dve prethodno publikovane, nezavisne studije u kojima su za predviđanje apsorpcije ove supstance korišćeni različiti setovi ulaznih podataka.

## Ekperimentalni deo

### Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta

Brzina rastvaranja karbamazepina iz komercijalno dostupnih tableta sa trenutnim oslobađanjem, jačine 200 mg (označeni kao preparati CBZ1 i CBZ2), ispitana je u aparaturi sa lopaticom, pri brzini od 75 o/min i temperaturi od  $37 \pm 0.5$  °C, u 900 ml medijuma (voda) bez/sa dodatkom 0.5% i 1% surfaktanta (saharoza laurata (D1216) ili natrijum-laurilsulfata). Uzorkovanje je vršeno u toku 2 h, a količina rastvorenog karbamazepina je određena UV-spektrofotometrijski, na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ( $\lambda = 286 \pm 1$  nm). Ispitivanja su rađena sa po najmanje tri tablete, a prikazani rezultati predstavljaju njihovu srednju vrednost.

Za poređenje profila brzine rastvaranja karbamazepina iz preparata CBZ1 i CBZ2 u različitim medijumima korišćen je model nezavisni matematički pristup koji podrazumeva izračunavanje faktora sličnosti ( $f_2$ ), prema jednačini (25):

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

gde su: n – broj uzorkovanja,  $R_i$  i  $T_i$  – procenat oslobođene lekovite supstance nakon vremena t u slučaju referentnog (preparat CBZ1) i test preparata (preparat CBZ2).

### In silico predviđanje apsorpcije karbamazepina

Za *in silico* predviđanje apsorpcije CBZ korišćen je GastroPlus™ programski paket (verzija 6.1.0003, Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA) zasnovan na primeni ACAT (eng. *Advanced Compartmental Absorption and Transit*) modela apsorpcije i gastrointestinalnog transporta. Kao ulazni parametri u ovom ispitivanju korišćeni su literaturni podaci, kao i *in silico* predviđene i/ili eksperimentalno određene vrednosti (Tabela I). Vrednosti ASF faktora (eng. *Absorption Scale Factors*; faktori proporcionalnosti koji definišu brzinu apsorpcije lekovite supstance u određenom regionu gastrointestinalnog trakta) su optimizovane (koristeći GastroPlus™ modul za optimizaciju) tako da simulirani profil apsorpcije što manje odstupa od *in vivo* uočenih vrednosti (18). Svi ostali parametri koji opisuju fiziologiju humanog GIT-a u stanju „na gladno“ zadržani su na GastroPlus™ preporučenim vrednostima. Za procenu greške predviđanja pojedinačnih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ,  $PIK_{0 \rightarrow t}$ ) korišćen je sledeći izraz:

$$PE(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$



gde je PE (%) – greška predviđanja izražena u procentima, A – uočena (eksperimentalna) vrednost i B – predviđena (simulirana) vrednost.

**Tabela I** Ulazni parametri za GastroPlus™ simulaciju apsorpcije karbamazepina: primenjene vrednosti, kao i podaci korišćeni u prethodnim studijama

**Table I** Summary of input parameters for CBZ gastrointestinal absorption simulation: employed values, along with the data used in previous studies

Parametar	Primenjene vrednosti	Ref (7)	Ref (9)
molekulska masa (g/mol)	236.3		
logP	2.45 <sup>a</sup>	2.45	2.38
pK <sub>a</sub>	13.9 <sup>b</sup>	11.83	12.01
efektivna permeabilnost (x 10 <sup>-4</sup> cm/s)	4.3 <sup>c</sup>		
doza leka (mg)	400		
zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml)	250	250	240
rastvorljivost u vodi (mg/ml)	0.21 <sup>d</sup>	0.12	0.12
srednje vreme precipitacije (s)	900 <sup>e</sup>		
difuzioni koeficijent (x 10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> /s)	0.873 <sup>f</sup>	0.869	0.972
gustina čestica leka (g/ml)	1.2 <sup>e</sup>	1.2	1.5
poluprečnik čestice (μm)	25 <sup>e</sup>	25	75
telesna masa ispitanika (kg)	75.5 <sup>g</sup>	72	75
odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1.6 <sup>a</sup>	/	/
slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub> (%)	25 <sup>a</sup>	30	22
klirens, CL (L/h/kg)	0.024 <sup>h</sup>	0.024	0.015
volumen distribucije, V <sub>d</sub> (L/kg)	1.26 <sup>h</sup>	1.26	0.81
poluvreme eliminacije, t <sub>1/2</sub> (h)	36.39	36.39	43.38
volumen distribucije u perifernom tkivu, V <sub>2</sub> (L/kg)	/	/	0.121
konstanta distribucije, k <sub>12</sub> (1/h)	/	/	0.036
konstanta distribucije, k <sub>21</sub> (1/h)	/	/	0.240
vreme simulacije (h)	120	120	168
farmaceutski oblik	IR tableta <sup>i</sup> /CR <i>integral oblik<sup>i</sup></i>	IR tableta	IR tableta

<sup>a</sup> podaci iz literature (26); <sup>b</sup> podatak iz literature (12); <sup>c</sup> podatak iz literature (27); <sup>d</sup>eksperimentalno određena vrednost; <sup>e</sup>GastroPlus™ vrednosti; <sup>f</sup>*in silico* procenjena vrednost na osnovu strukture molekula (ADMETPredictor™ modul); <sup>g</sup>podatak iz literature (18); <sup>h</sup>podaci iz literature (7); <sup>i</sup>kod predviđanja apsorpcije na osnovu fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina lekovite supstance; <sup>j</sup>kod predviđanja profila koncentracije lekovite supstance u plazmi na osnovu podataka o *in vitro* brzini rastvaranja karbamazepina (CR funkcija u GastroPlus™ programu simulira oslobađanje lekovite supstance iz tableta u rastvorenom obliku, dok *integral* oblik znači da se tableta ne raspada u toku prolaska kroz GIT)

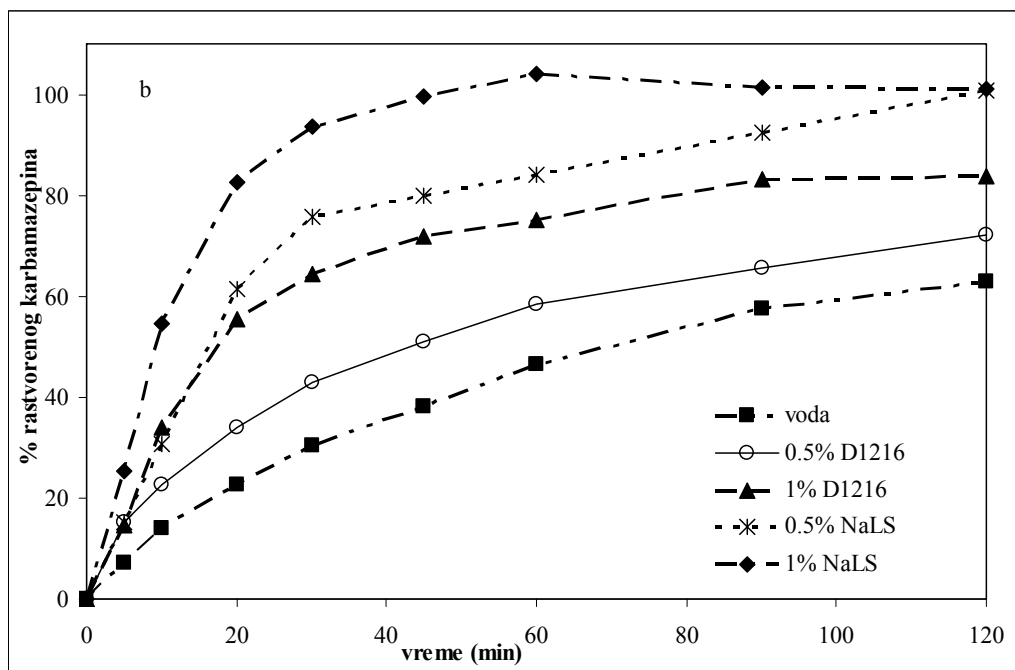
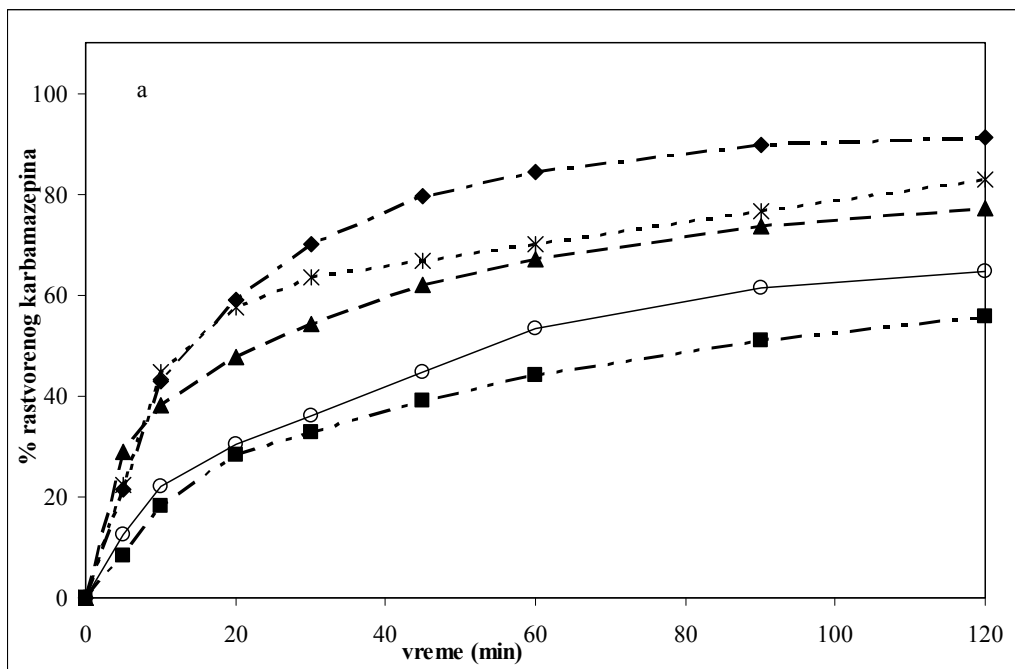
## ***In vitro-in vivo* korelacija**

Stepen korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka procenjen je primenom konvolucionog pristupa uspostavljanju IVIVK. Pri ovome su hipotetički profili koncentracije lekovite supstance u plazmi u toku vremena, predviđeni na osnovu podataka o brzini rastvaranja karbamazepina *in vitro*, primenom GastroPlus™ programa, upoređeni sa odgovarajućim profilom dobijenim u *in vivo* studiji (18). Stepen korelacije između odgovarajućih *in vitro* i *in vivo* profila procenjen je na osnovu rezultata linearne regresione analize.

## **Rezultati i diskusija**

### **Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta**

Ispitivanjem brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta u različitim medijumima dobijeni su profili prikazani na Slici 1. Prikazani podaci pokazuju da se sa dodatkom surfaktanta u medijum za ispitivanje povećava brzina rastvaranja karbamazepina, a stepen povećanja zavisi od vrste i koncentracije primenjenog surfaktanta. Takođe, uočava se da je brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta CBZ2 u svim medijumima veća u odnosu na brzinu rastvaranja iz tableta CBZ1. Slične rezultate su dobili Homšek i saradnici koji su pokazali da je rastvaranje karbamazepina iz generičkog preparata brže u odnosu na rastvaranje iz referentnog preparata i u medijumima bez (voda, puferi pH 1.2, 4.5 i 6.8), kao i medijumima sa dodatkom surfaktanta (0.5% i 1% rastvor NaLS) (18). Različito *in vitro* ponašanje ispitivanih preparata može da bude posledica razlika u sastavu formulacija (izbor pomoćnih materija), postupku izrade i/ili osobinama same aktivne supstance (veličina čestica polazne sirovine). Osim toga, uočene razlike u brzini rastvaranja bi se mogle objasniti i eventualnim razlikama u brzini prelaza anhidrovanog u hidratni, manje rastvorljivi oblik karbamazepina, što zavisi od vrste pomoćnih materija upotrebljenih za izradu tableta, odnosno, njihove sposobnosti da uspore proces transformacije karbamazepina iz anhidrovane u hidratnu formu (28, 29).



Slika 1 Brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta CBZ1 (a) i CBZ2 (b)  
 Figure 1 Dissolution data for CBZ1 (a) and CBZ2 (b) carbamazepine tablets

Iako su razlike u brzini rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanih preparata uočene u svim ispitivanim medijumima, izračunati faktori sličnosti pokazuju da su brzine rastvaranja karbamazepina u medijumima sa NaLS statistički značajne, dok su ispitivanjem u vodi, kao i u medijumima sa dodatkom D1216, razlike u kinetici rastvaranja aktivne supstance manje izražene, odnosno, dobijeni profili se mogu smatrati sličnim (Tabela II). Dobijeni rezultati se u izvesnoj meri razlikuju od rezultata Homšek i saradnika koji su pokazali da se profili brzine rastvaranja karbamazepina iz ispitivanog generičkog i referentnog preparata u medijumima sa dodatkom 0.5% i 1% NaLS statistički značajno razlikuju ( $f_2=25.06$  i  $f_2=29.72$ , redom), sa tim da su razlike u brzini rastvaranja karbamazepina uočene i kada je kao medijum za ispitivanje korišćena voda ( $f_2=17.21$ ) (18).

**Tabela II** Izračunati faktori sličnosti ( $f_2$ ) dobijeni poređenjem profila brzine rastvaranja karbamazepina iz preparata CBZ1 i CBZ2 u različitim medijumima

**Table II** Similarity factors ( $f_2$ ) for CBZ1 and CBZ2 formulations in different dissolution media

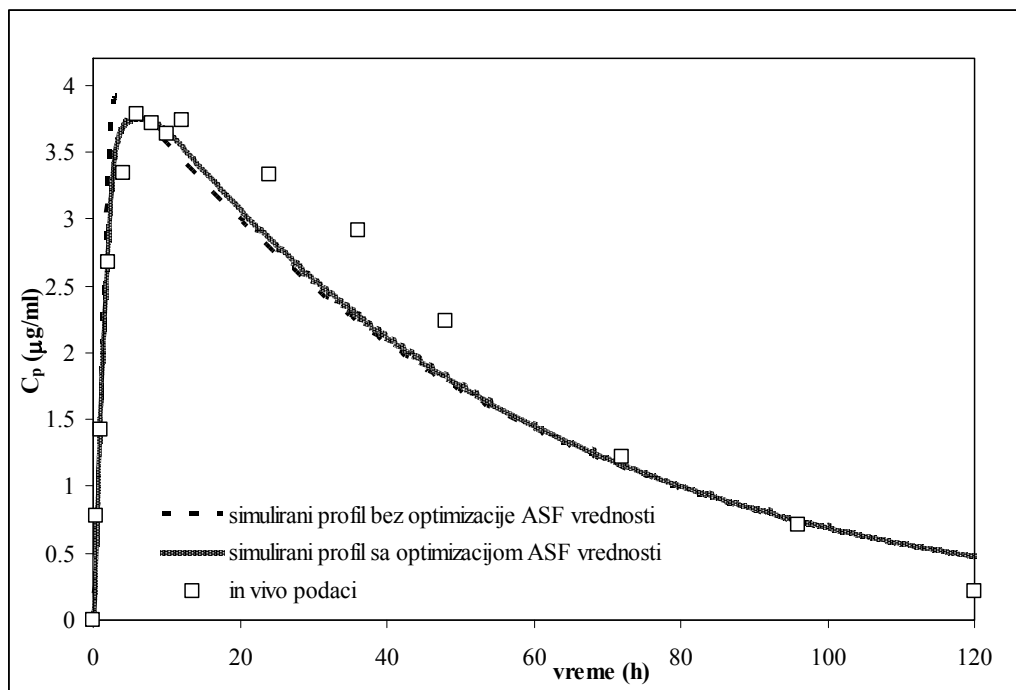
Medijum	voda	0.5% D1216	1% D1216	0.5% NaLS	1% NaLS
$f_2$	67.00	64.47	51.60	44.16	38.61

### ***In silico* predviđanje apsorpcije karbamazepina**

Profil apsorpcije karbamazepina, dobijen na osnovu ulaznih podataka navedenih u Tabeli I, kada su za predviđanje korišćene GastroPlus<sup>TM</sup> vrednosti ASF faktora, ukazao je na znatno bržu apsorpciju karbamazepina u odnosu na *in vivo* uočene vrednosti (Slika 2). Pri tome je greška predviđanja za vreme postizanja maksimalne koncentracije lekovite supstance u plazmi iznosila 43.33% (Tabela III). Da bi se postiglo što manje odstupanje predviđenog profila apsorpcije od srednjeg profila koncentracije karbamazepina u plazmi uočenog u *in vivo* studiji, optimizovane su vrednosti ASF faktora. GastroPlus<sup>TM</sup> predložene i optimizovane vrednosti ASF faktora su prikazane u Tabeli IV.

Predviđeni profil apsorpcije karbamazepina, dobijen na osnovu izabranih ulaznih podataka (Tabela I) i optimizovanih vrednosti ASF faktora, kao i podaci o koncentraciji lekovite supstance u plazmi nakon oralne primene 400 mg (2 x 200 mg) karbamazepina (18) prikazani su na Slici 2. Predviđeni nivo apsorpcije karbamazepina od 99.89% je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na dobru biološku raspoloživost ove supstance nakon oralne primene (30). Slične vrednosti od 98.02%, odnosno, 93% apsorbovanog leka su dobijene i u prethodnim studijama u kojima je za predviđanje apsorpcije CBZ primenjena gastrointestinalna simulacija (7, 9). Farmakokinetički parametri izračunati na osnovu simuliranog profila i odgovarajuće vrednosti dobijene u

*in vivo* studiji navedeni su u Tabeli III. Izračunate vrednosti za grešku predviđanja za sve posmatrane farmakokinetičke parametre su manje od 10%, što ukazuje na to da se razvijeni model može uspešno koristiti za predviđanje profila apsorpcije karbamazepina.



**Slika 2. GastroPlus™ simulirani i srednji profil koncentracije karbamazepina u plazmi *in vivo* (18) nakon oralne primene 400 mg karbamazepina**

**Figure 2. GastroPlus™ predicted and observed mean carbamazepine plasma concentration–time profiles (18) following oral administration of 400 mg CBZ**

U Tabeli III su navedeni i farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu prethodno razvijenih modela apsorpcije CBZ (7, 9). Najveće razlike u odnosu na vrednosti predviđene u ovom ispitivanju se uočavaju za  $t_{max}$  (14.8% razlike kada se uzmu u obzir vrednosti iz studije Kovačevića i saradnika (7), odnosno, 162.3% razlike prema vrednostima iz studije Zhang-a i saradnika (9)). Značajne razlike su dobijene i za PIK vrednosti kada je za predviđanje korišćen model Zhang-a i saradnika (43% i 47% razlike u vrednostima  $PIK_{0 \rightarrow \infty}$  i  $PIK_{0 \rightarrow t}$  redom). Pri ovome treba imati u vidu da su pomenuti modeli Kovačevića i saradnika i Zhang-a i saradnika validirani u odnosu na različite *in vivo* profile koncentracije leka u plazmi koji se međusobno značajno razlikuju. U ispitivanju Kovačevića i saradnika su za poređenje sa predviđenim farmakokinetičkim parametrima korišćene iste *in vivo* uočene vrednosti kao i u ovoj studiji, dok je za procenu greške predviđanja modela koji je razvio Zhang sa saradnicima korišćen *in vivo* profil koncentracije leka u plazmi na kome se uočava tzv. „apsorpcioni plato“ (u periodu između 3.7 i 41 h nakon oralne primene tablete

karbamazepina koncentracija leka u plazmi se kretala u opsegu  $\pm 20\%$  u odnosu na vrednost  $C_{max}$ ). No, ako se uzme u obzir da CBZ pokazuje varijabilnu kinetiku nakon oralne primene (npr. literaturni podaci za  $t_{max}$  se kreću u opsegu 2 do 24 h (30)), vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđene u sva tri pomenuta modela se mogu smatrati prihvatljivim. Prikazani podaci, takođe, pokazuju da forma razvijenog modela apsorpcije zavisi i od izbora vrednosti koje se koriste za procenu tačnosti predviđanja, što ukazuje na to da je pri validaciji modela potrebno razmotriti što širi opseg vrednosti farmakokinetičkih parametara dokumentovanih u literaturi.

**Tabela III** Poređenje farmakokinetičkih parametara izračunatih na osnovu srednjeg profila koncentracije CBZ u plazmi dobijenog u *in vivo* studiji (18) sa simuliranim vrednostima (PE (%) – greška predviđanja izražena u procentima), zajedno sa vrednostima dobijenim gastrointestinalnom simulacijom apsorpcije CBZ u prethodnim studijama

**Table III** Comparison of pharmacokinetic parameters between simulated and *in vivo* observed data (18) for CBZ following oral administration of a single 400 mg dose from IR tablet (PE (%) – percent prediction error), along with the values obtained by gastrointestinal simulation of CBZ absorption in previous studies

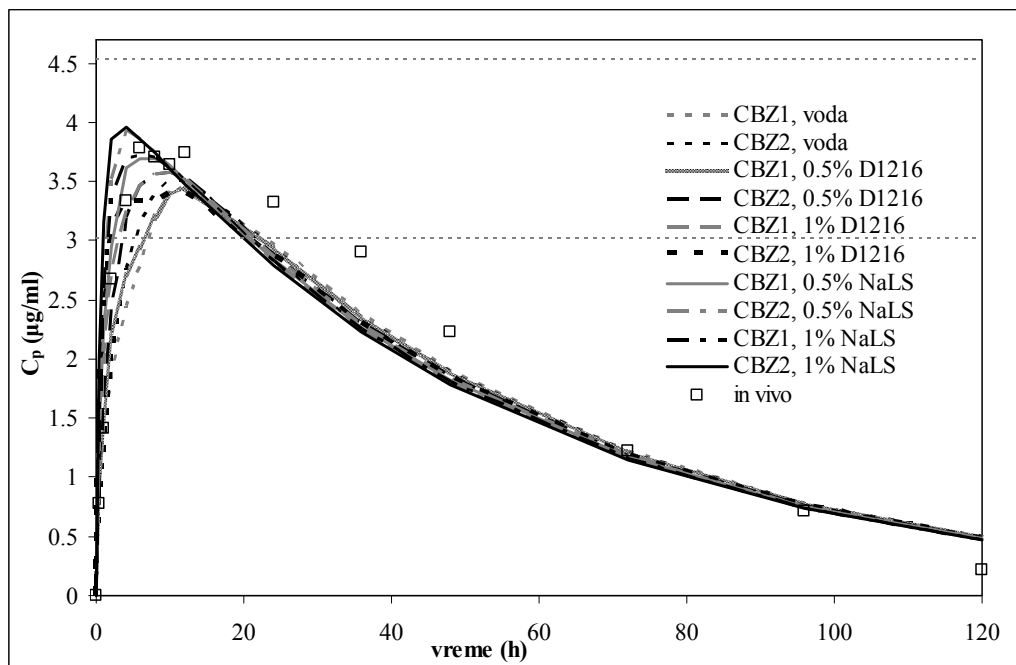
Parametar	Izračunata vrednost ( <i>in vivo</i> )	Predviđena vrednost bez optimizacije ASF vrednosti	PE (%)	Predviđena vrednost sa optimizacijom ASF vrednosti	PE (%)	Vrednost iz ref (7)	Vrednost iz ref (9)
$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	3.78	3.92	-3.77	3.75	0.75	3.76	3.71
$t_{max}$ (h)	6.00	3.40	43.33	6.10	-1.67	7.00	16.00
$PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	229.08	227.15	0.84	231.28	-0.96	226.90	330.00
$PIK_{0 \rightarrow t}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	224.58	201.98	10.06	205.28	8.59	201.20	301.60

**Tabela IV** GastroPlus™ predložene i optimizovane vrednosti ASF faktora  
**Table IV** GastroPlus™ default and optimized ASF values

Deo GIT-a	GastroPlus™ vrednost	Optimizovana vrednost
Želudac	0	0
Duodenum	2.769	30.600
Jejunum 1	2.720	1.063
Jejunum 2	2.705	1.000
Ileum 1	2.668	4.398
Ileum 2	2.624	0.025
Ileum 3	2.559	0.036
Cekum	0.066	0.198

### ***In vitro-in vivo* korelacija**

GastroPlus™ simulirani, hipotetički profili koncentracije karbamazepina u plazmi, predviđeni na osnovu različitih profila brzine rastvaranja lekovite supstance *in vitro* (prikazanih na Slici 1), zajedno sa odgovarajućim *in vivo* uočenim profilom koncentracije karbamazepina u plazmi (18) prikazani su na Slici 3.



**Slika 3** Hipotetički profili koncentracije karbamazepina u plazmi predviđeni na osnovu različitih profila brzine rastvaranja lekovite supstance *in vitro*, zajedno sa *in vivo* uočenim profilom koncentracije karbamazepina u plazmi (18) (simulirani profili CBZ1 u 1% rastvoru D1216 i CBZ2 u 0.5% rastvoru D1216 se međusobno preklapaju; horizontalna isprekidana linija predstavlja 20% odstupanja u vrednosti  $C_{max}$  u odnosu na *in vivo* uočeni podatak)

**Figure 3** GastroPlus™ simulated carbamazepine *in vivo* profiles, estimated on the basis of different dissolution profiles *in vitro*, along with the actual *in vivo* data (18) (simulated profiles CBZ1 in 1% D1216, and CBZ2 in 0.5% D1216 overlap; dotted lines represent 20% deviation in  $C_{max}$  compared to the actual value observed *in vivo*)

Dobijeni rezultati pokazuju da se, bez obzira na razlike u kinetici rastvaranja lekovite supstance *in vitro*, simulacijom dobijaju slični farmakokinetički profili, koji se po vrednosti PIK i  $C_{max}$ , kao osnovnim parametrima za procenu biološke raspoloživosti/biološke ekvivalentnosti preparata, ne razlikuju značajno od *in vivo* uočenih vrednosti (Tabela V). Značajne razlike su uočene samo u vremenu postizanja maksimalne koncentracije lekovite supstance u plazmi ( $t_{max}$ ), čije su se vrednosti kretale u opsegu od 3.18 h u slučaju hipotetičkog profila CBZ2 u 1% NaLS do 12.9 h u slučaju profila CBZ1 u vodi.



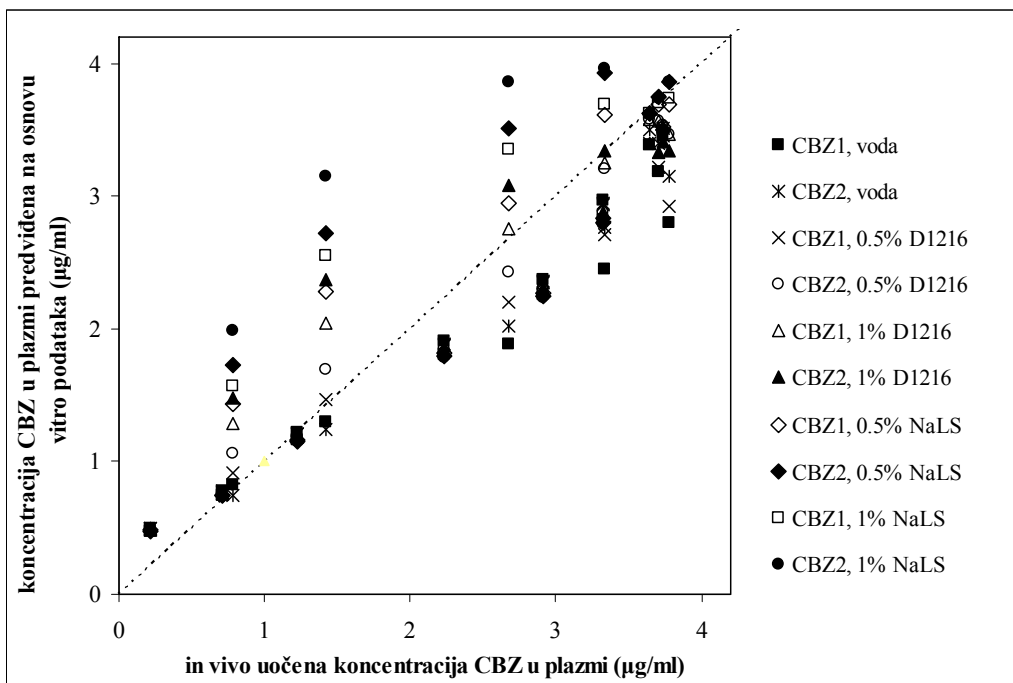
**Tabela V** Poređenje farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu različitih profila brzine rastvaranja karbamazepina *in vitro* sa *in vivo* vrednostima

**Table V** Comparison of pharmacokinetic parameters simulated on the basis of different *in vitro* dissolution profiles with *in vivo* observed values

<i>In vivo</i> vrednosti: $C_{max} = 3.78 \mu\text{g/ml}$ ; $PIK_{0 \rightarrow \infty} = 229.08 \mu\text{g h/ml}$ (18)					
<i>In vitro</i> profil	$C_{max}$			$PIK_{0 \rightarrow \infty}$	
	Predviđena vrednost ( $\mu\text{g/ml}$ )	vrednost	PE (%)	Predviđena vrednost ( $\mu\text{g h/ml}$ )	PE (%)
CBZ1, voda	3.46		-9.11	231.13	0.89
CBZ2, voda	3.52		-7.50	231.17	0.90
CBZ1, 0.5% D1216	3.46		-9.36	231.17	0.90
CBZ2, 0.5% D1216	3.59		-5.38	231.23	0.93
CBZ1, 1% D1216	3.58		-5.63	231.24	0.93
CBZ2, 1% D1216	3.41		-10.85	231.25	0.94
CBZ1, 0.5% NaLS	3.70		-2.21	231.29	0.96
CBZ2, 0.5% NaLS	3.93		3.91	231.32	0.97
CBZ1, 1% NaLS	3.74		-1.20	231.3	0.96
CBZ2, 1% NaLS	3.98		5.09	231.33	0.97

Kovačević i saradnici (7) su simulirali profil apsorpcije CBZ na osnovu podataka o brzini rastvaranja lekovite supstance *in vitro* u različitim puferima, kao i u medijumima sa dodatkom 0.1-1% NaLS i došli do sličnog zaključka da se predviđeni farmakokinetički profili međusobno ne razlikuju značajno. Ovakvi rezultati dodatno potvrđuju pretpostavku da je dispozicija karbamazepina u organizmu primarno definisana njegovim farmakokinetičkim karakteristikama (dugo poluvreme eliminacije), a ne osobinama primenjenog farmaceutskog oblika.

U cilju uspostavljanja IVIVK nivoa A između srednjeg profila koncentracije karbamazepina u plazmi uočenog u *in vivo* studiji i odgovarajućih vrednosti predviđenih na osnovu različitih *in vitro* podataka, konstruisan je korelacioni dijagram prikazan na Slici 4. Linearnom regresionom analizom zbirnog seta podataka za preparate CBZ1 i CBZ2, dobijeni su statistički parametri na osnovu kojih je procenjen stepen korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka (Tabela VI).



Slika 4 Korelacioni dijagram između *in vivo* uočenih vrednosti za koncentraciju karbamazepina u plazmi i odgovarajućih vrednosti predviđenih na osnovu različitih *in vitro* profila brzine rastvaranja (GastroPlus™ generisane vrednosti)  
 Figure 4 IVIVC plot for carbamazepine IR tablets

Tabela VI Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije  
 Table VI Statistical parameters of the obtained IVIVC

Medijum	a	r
voda	0.8031	0.9563
0.5% D1216	0.8171	0.9636
1% D1216	0.7956	0.9119
0.5% NaLS	0.8426	0.8454
1% NaLS	0.8194	0.7700

a - koeficijent pravca (nagib prave); r - koeficijent korelacije

Dobijeni rezultati pokazuju da je najveći stepen korelacije sa *in vivo* podacima postignut u slučaju profila brzine rastvaranja karbamazepina u medijumu sa 0.5% D1216 ( $r = 0.9636$ ,  $a = 0.8171$ ), mada je visok stepen korelacije postignut i u slučaju profila brzine rastvaranja u vodi ( $r = 0.9563$ ,  $a = 0.8031$ ), kao i u medijumu sa 1% D1216 ( $r = 0.9119$ ,  $a = 0.7956$ ). Najveće odstupanje od profila apsorpcije karbamazepina *in vivo* uočeno je u slučaju *in vitro* ispitivanja u medijumima sa dodatkom NaLS ( $r = 0.8454$  i  $a = 0.8426$  u medijumu sa 0.5% NaLS, odnosno,  $r = 0.77$  i  $a = 0.8194$  u medijumu sa 1% NaLS). U radu Homšek i saradnika (18) je, takođe, pokazano da se 0.5% i 1% rastvor NaLS ne mogu koristiti kao univerzalni medijumi za predviđanje ponašanja CBZ *in vivo*. Naime, u pomenutom ispitivanju je pokazano da se ispitivanjem u 1% rastvoru NaLS može uspostaviti korelacija 1:1 sa *in vivo* podacima samo u slučaju pojedinačnih tableta karbamazepina. Međutim, korelacija nivoa A za zbirni set podataka za oba ispitivana preparata u ovoj studiji nije uspostavljena.

### **Izbor biorelevantnog medijuma/specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta**

Američka farmakopeja za ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem propisuje upotrebu vode sa dodatkom 1% NaLS (900 ml), u aparaturi sa lopaticom, pri brzini od 75 o/min, pri čemu se kao zahtev postavlja da se najmanje 75% od deklarisanе količine karbamazepina rastvori za 60 min (test 1), odnosno, da se za 15 min rastvori 45-75% supstance i ne manje od 75% za 60 min (test 2) ili da se za 15 min rastvori 60-85% supstance i ne manje od 75% za 60 min izvođenja testa (test 3) (31). Međutim, dobijeni rezultati koji pokazuju da ispitivanjem brzine rastvaranja karbamazepina u medijumu sa 1% NaLS nije moguće uspostaviti IVIVK nivoa A ukazuju na to da primena ovog medijuma nije pogodna za predviđanje ponašanja karbamazepina *in vivo*. Na isti zaključak navode i rezultati uporednog ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta koji su pokazali da se profili brzine rastvaranja lekovite supstance iz međusobno biološki ekvivalentnih preparata CBZ1 i CBZ2 u 1% rastvoru NaLS ne mogu smatrati sličnim (Tabela II). Sa druge strane, dobijeni rezultati pokazuju da se ispitivanjem brzine rastvaranja karbamazepina u vodi bez/sa dodatkom 0.5% ili 1% D1216 dobijaju rezultati koji daju dobru korelaciju sa *in vivo* uočenim vrednostima. Stoga bi se ovaj medijum mogao predložiti kao biorelevantni za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. No, da bi ovaj predlog bio šire prihvaćen, potrebno je izvršiti dodatna *in vitro* ispitivanja i drugih tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem i dobijene rezultate uporediti sa odgovarajućim podacima dobijenim u kliničkim studijama. Takođe, dobijeni rezultati, kao i rezultati prethodnih studija (7, 18), navode na zaključak da se, sa ciljem obezbeđenja biološke ekvivalentnosti preparata, može uspostaviti znatno šira specifikacija za brzinu rastvaranja karbamazepina (oko 45-75% rastvorene supstance za 60 minuta ispitivanja) u odnosu na aktuelne zahteve američke farmakopeje.

## Zahvalnica

Ovaj rad je urađen u okviru projekta TR-34007: Razvoj proizvoda i tehnologija koje obezbeđuju željeno oslobađanje lekovitih supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika, finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

## Literatura

1. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413–20.
2. Yu LX, Lipka E, Crison JR, Amidon G. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 1996 ; 19: 359-76.
3. Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Computer simulations using GastroPlus™ to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 72: 91-8.
4. Norris DA, Leesman GD, Sinko PJ, Grass GM. Development of predictive pharmacokinetic simulation models for drug discovery. *J Control Release* 2000; 65: 55–62.
5. Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 50 Suppl 1: S41-67.
6. Yokoe J, Iwasaki N, Haruta S, Kadono K, Ogawara K, Higaki K *et al.* Analysis and prediction of absorption behavior of colon-targeted prodrug in rats by GI-transit-absorption model. *J Control Release* 2003; 86: 305–13.
7. Kovačević I, Parojčić J, Homšek I, Tubić-Grozdanis M, Langguth P. Justification of biowaiver for carbamazepine, a low soluble high permeable compound, in solid dosage forms based on IVIVC and gastrointestinal simulation. *Mol Pharm* 2008; 6(1): 40–7.
8. Huang W, Lee SL, Yu LX. Mechanistic approaches to predicting oral drug absorption. *AAPS J* 2009; 11(2): 217-24.
9. Zhang X, Lionberger RA, Davit BM, Yu LX. Utility of physiologically based absorption modeling in implementing quality by design in drug development. *AAPS J* 2011; 13(1): 59-71.
10. Jones HM, Gardner IB, Collard WT, Stanley PJ, Oxley P, Hosea NA *et al.* Simulation of human intravenous and oral pharmacokinetics of 21 diverse compounds using physiologically based pharmacokinetic modelling. *Clin Pharmacokinet* 2011; 50(5): 331-47.
11. Reddy MB, Connor A, Brennan BJ, Morcos PN, Zhou A, McLawhon P *et al.* Physiological modeling and assessments of regional drug bioavailability of danoprevir to determine whether a controlled release formulation is feasible. *Biopharm Drug Dispos* 2011; 32(5): 261-75.
12. Tadkaew N, Sivakumar M, Khan SJ, McDonald JA, Nghiem LD. Effect of mixed liquor pH on the removal of trace organic contaminants in a membrane bioreactor. *Bioresour Technol* 2010; 101: 1494–1500.
13. Hemenway J, Jarho P, Henri J, Nair S, Vandervelde D, Stella G. Preparation and physicochemical characterization of a novel water-soluble prodrug of carbamazepine. *J Pharm Sci* 2010; 99(4): 1810-25.
14. Loftsson T, Hreinsdóttir D. Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: a technical note. *AAPS PharmSciTech* 2006; 7(1): E4.
15. Smith JS, MacRae RJ, Snowden MJ. Effect of SBE7-b-cyclodextrin complexation on carbamazepine release from sustained release beads. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 60: 73–80.

16. Bhise SB, Rajkumar M. Effect of HPMC on solubility and dissolution of carbamazepine form III in simulated gastrointestinal fluids. *Asian J Pharm* 2008; 2(1): 38-42.
17. Lee H, Park SA, Sah H. Surfactant effects upon dissolution patterns of carbamazepine immediate release tablet. *Arch Pharm Res* 2005; 28(1): 120-6.
18. Homsek I, Parojcic J, Cvetkovic N, Popadic D, Djuric Z. Biopharmaceutical characterization of carbamazepine immediate release tablets. In vitro-in vivo comparison. *Arzneimittelforschung*. 2007; 57(8): 511-6.
19. Riad LE, Chan KK, Wagner WE. Simultaneous first and zero order absorption of carbamazepine tablets in humans. *J Pharm Sci*. 1986; 75: 897-900.
20. Meyer MC, Straughn AB, Jarvi EJ, Wood GC, Pelsor FR, Shah VP. The bioinequivalence of carbamazepine tablets with a history of clinical failures. *Pharm Res*. 1992, 9(12): 1612-6.
21. Lake OA, Olling M, Barends DM. In vitro/in vivo correlations of dissolution data of carbamazepine immediate release tablets with pharmacokinetic data obtained in healthy volunteers. *Eur J Pharm Biopharm*. 1999; 48: 13-9.
22. Jung H, Milan RC, Girard ME, Leon F, Montoya MA. Bioequivalence study of carbamazepine tablets: in vitro/in vivo correlation. *Int J Pharm*. 1997; 152: 37-44.
23. Olling M, Mensinga TT, Barends DM, Groen C, Lake OA, Meulenbelt J. Bioavailability of carbamazepine from four different products and occurrence of side effects. *Biopharm Drug Dispos*. 1999; 20: 19-28.
24. Meyer MC, Mhatre SRM, Shah VP, Williams RL, Lesko LJ. The relative bioavailability and in vivo-in vitro correlations for four marketed carbamazepine tablets. *Pharm Res*. 1998; 15: 1787-91.
25. Moore JW, Flanner HH. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm Technol* 1996; 6: 64-74.
26. Galichet LY, ed. Clarke's analysis of drugs and poisons, 3rd ed. London · Chicago: Pharmaceutical Press; 2004.
27. Dressman JB, Lennernäs H, eds. Oral drug absorption prediction and assessment. New York · Basel: Marcel Dekker, Inc; 2000.
28. Otsuka M, Ohfusa T, Matsuda Y. Effect of binders on polymorphic transformation kinetics of carbamazepine in aqueous solution. *Colloids Surfaces B: Biointerf*. 2000; 17: 145-52.
29. Prajapati T, Patel P. Influence of hydrophilic polymers on crystal property and solubility characteristics of carbamazepine. *PharmTech*. 2010; 2(1): 189-200.
30. Bauer LA. Applied clinical pharmacokinetics. 2nd ed. The McGraw-Hill Companies, Inc, 2008: 552.
31. The United States Pharmacopoeia 32/National Formulary 27, Rockville MD: United States Pharmacopoeia Convention Inc, 2009

# Mechanistic simulation of carbamazepine absorption after oral administration of immediate release tablets

Sandra Grbić, Jelena Parojčić, Zorica Đurić

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

---

## Summary

The main prerequisite to establish quantitative *in vitro-in vivo correlation* (IVIVC) and define biorelevant *in vitro* methodology is to identify drug dissolution profile *in vivo*. When intravenous data are not available due to poor drug solubility, oral drug absorption cannot be estimated by means of conventional pharmacokinetic analysis. Development of the mechanistic absorption models has therefore received widespread attention over the past few years. The objective of this study is to: i) develop drug-specific absorption model for carbamazepine using *in silico* absorption model, ii) use the generated absorption model to provide the target *in vivo* dissolution profile for IVIVC, iii) identify biorelevant dissolution specifications for carbamazepine immediate-release tablets, and iv) compare the obtained results with the results of the previous studies. GastroPlus™ software package was used for computer simulations. The required input parameters were experimentally determined, *in silico* predicted and/or taken from the literature. Convolution approach was applied to assess the relationship between the *in vitro* and *in vivo* data. The presented data demonstrated that *in silico* simulation technology can be successfully used to predict carbamazepine absorption profile, and that the generated plasma concentration profile can serve as the target profile for IVIVC and identification of biorelevant dissolution specifications for carbamazepine immediate-release tablets.

**Key words:** carbamazepine, *in silico* absorption simulation, dissolution, *in vitro-in vivo* correlation

---

## **Efekat predtretmana sa L-NAME na glutation i glutation peroksidazu u strijatumu pacova na neurotoksičnost izazvanu parakvatom**

**Mirjana Đukić<sup>1</sup>, Milica Ninković<sup>2</sup>, Ivana Stevanović<sup>2</sup>, Katarina Ilić<sup>3</sup>,  
Dragan Đurđević<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Institut za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija

<sup>3</sup> Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Autor za korespondenciju: Dr sci Mirjana Đukić, profesor

e-mail: mirjana.djukic@pharmacy.bg.ac.rs

Telefon: +381 11 3951 308, Faks: +381 11 3972840

URL: <http://www.pharmacy.bg.ac.rs/fakultet/ljudi/nastavnik/64>.

---

### **Kratak sadržaj**

Kontaktini herbicid parakvat (PK) je dipiridinsko jedinjenje, koje podleže redoks metabolizmu i svoju toksičnost ispoljava posredstvom povećanog stvaranja slobodnih radikala. Ciljni organi sistemskog toksičnog efekta PK kod čoveka su pluća i bubrezi. Mehanizam PK-indukovane neurotoksičnosti do sada još uvek nije u potpunosti rasvetljen.

Cilj našeg rada bio je da se ispita uloga azot oksida (NOx) u neurotoksičnosti PK, sa posebnim osvrtom na glutationski ciklus [glutation (GSH) i enzim glutation peroksidazu (GPx)]. U cilju da se istraži uloga NOx u oksidativnom stresu (OS) i / ili nitrosativnom stresu (NS), kao odgovoru na neurotoksičnost PK. U predtretmanu parakvatom koristili smo NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), neselektivni inhibitor azot oksid sintetaze (NOS), aplikovan je pre davanja PQ.

Studija je sprovedena na pacovima *Wistar* soja nasumice podeljenim u grupe (n = 8 za kontrolnu grupu i n = 24 za eksperimentalne grupe) u zavisnosti od tretmana. Testirana jedinjenja su intrastrijatalno (*i.s.*) aplikovana. Merenje sadržaja GSH i aktivnosti GPx izvršena su 30 min, 24 sata i 7 dana posle tretmana.

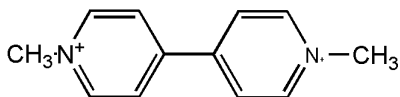
Parkinsonizam je kao simptom primećen samo u grupi pacova tretiranih PK - om. L-NAME je ispoljio zaštitni efekat kod životinja kod kojih je *i.s.* davan PK, što bi se moglo zaključiti na osnovu odsustva simptoma parkinsonizma i smanjenog OS/NS odgovora u strijatumu u grupi pretretiranoj sa L-NAME.

**Ključne reči:** parakvat, neurotoksičnost, strijatum, azot oksid, L-NAME.

---

**Skraćenice:** glutation, GSH; glutation peroksidaza, GPx; *i.s.*, intrastrijatalno; *i.p.*, intraperitonealno; MDA, malondialdehid; NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; NO<sub>x</sub>, azotni oksid; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrati; NS, nitrozativni stres; O<sub>2</sub>, molekularni kiseonik; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoksidni anjon radikal; OS, oksidativni stres; PK, parakvat; RAV, reaktivne azotove vrste; RKV, reaktivne kiseonične vrste; SOD, superoksidna dizmutaza.

## Uvod



Profesionalno ili slučajno izlaganje visokim dozama pesticida može dovesti do trovanja ili smrtnog ishoda, bez obzira na put unosa u organizam (inhalacija, ingestija ili preko kože) (1). Parakvat (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridin) (PK), je brzo delujući kontaktni herbicid. Posebno je toksičan za pluća i bubrege, a izaziva i konvulzije (2). Toksičnost PK ostvaruje se narušavanjem ćelijskog integriteta, posredstvom stvaranja visoko reaktivnih radikala, kroz proces redoks kruženja u prisustvu molekularnog kiseonika (O<sub>2</sub>) (3-5). Pošto toksične doze izazivaju oštećenja renalnih tubula, zbog neadekvatne ekskrecije dolazi do povećanja koncentracije PK u krvi i tkivima. Imajući u vidu hemijsku sličnost dipiridinskih jedinjenja sa hinonima (elektrofilna jedinjenja), koji ekskretovani u obliku konjugata sa glutationom (GSH) oštećuju renalne tubule, moguće je da se i konjugati PK sa GSH izlučuju preko bubrega (6).

Toksični efekat PK na molekularnom nivou pokrenut je stvaranjem slobodnih radikala (SR) kroz proces redukciono-oksidacionih (redoks) reakcija (7). Drugi aspekt toksičnosti PK ostvaruje se kroz iscrpljivanje enzima antioksidativne zaštite (katalaze, superoksid dizmutaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze - GPx), koji „uklanjaju“ reaktivne proizvode i utrošak ćelijskih izvora reduktivnih ekvivalenata, NADPH i GSH (donora elektrona), čime se remeti redoks homeostaza u ćeliji i promoviše stanje oksidativnog stresa (OS) (8, 9).

Dopaminergički neuroni su ciljna mesta neurotoksičnog efekta PK, zbog svoje značajne osetljivosti prema oksidativnom oštećenju, posredovanom reaktivnim vrstama kiseonika (RVK) (2, 10 - 12). Dopaminergički neuroni, lokalizovani u *substantia nigra* (SN), šalju svoje projekcije u strijatum (13).

Pored toga, izgleda da stimulacija N-metil-*d*-aspartatnih receptora (NMDA) glutamatom, koja je praćena ulaskom Ca<sup>2+</sup> u ćeliju i NMDA receptor-posredovanim oslobađanjem azot oksida (NO<sub>x</sub>) preko enzima azot oksid sintaze (NOS) ima značajnu ulogu u neurotoksičnosti PK (2, 14, 15). Parakvat stimuliše efluks glutamata, pokrećući tako ekscitotoksičnost, posredstvom reaktivnih vrsta azota (RAV) (2, 15).



NG-nitro-L-arginin metil estar (L-NAME) je kompetitivni nespecifični inhibitor azot oksid sintaze (NOS), te je moguće da smanjujući sintezu NO sprečava i razvoj OS/NS u neuronima (16). Nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ) su stabilni finalni metabolički produkti  $\text{NO}_x$ , a i drugih RAV (5, 17, 18). U cilju proučavanja uloge  $\text{NO}_x$  u neurotoksičnosti PK, testirali smo hipotezu da predtretman L-NAME-om može omogućiti razlikovanje efekata PKV od RAV na finalni odgovor strijatuma na PK - indukovanu neurotoksičnost i važnije od toga, da inhibicijom stvaranja  $\text{NO}_x$  može umanjiti oksidativno/nitrozativno oštećenje nervnih ćelija.

## **Materijal i metode**

### ***Eksperimentalne životinje***

Eksperimentalne životinje su tretirane u skladu sa vodičem za eksperimentalne studije, No. 282-12/2002 (Etički komitet Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija). Eksperimenti su izvođeni na odraslim mužjacima *Wistar* pacova težine oko 220 grama. Pacovi su bili podeljeni u tri grupe (dve kontrolne i jedna eksperimentalna) i smešteni u kavezima pod standardizovanim uslovima (temperatura sredine  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , relativna vlažnost od  $55 \pm 3\%$  i ciklus svetlo/tama 13/11 sati) i imali su slobodan pristup hrani i vodi. Svi eksperimenti su rađeni posle sedam dana adaptacije životinja na laboratorijske uslove u periodu od 9 h ujutru do 13 h popodne.

### ***Eksperimentalni dizajn***

Testirane supstance su aplikovane u pojedinačnoj dozi, intrastrijatalno (*i.s.*) u finalnoj zapremini od 10  $\mu\text{L}$ , da se nervno tkivo ne bi opteretilo volumenom. Posle adaptacije, pacovi su podeljeni u 5 grupa. Jedna grupa od 8 netretiranih životinja je odmah žrtvovana. Pacovi svih ostalih grupa su anestetizirani pentobarbital natrijumom [45 mg/kg telesne mase (TM)] intraperitonealno (*i.p.*) pre intrastrijatalne (*i.s.*) aplikacije sledećih supstanci: kontrolna grupa (n = 8) tretirana je sa 10  $\mu\text{L}$  0,9 % NaCl rastvora; PK grupa (n = 24) – životinje su trovane PK u pojedinačnoj dozi (2,5  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ); L-NAME + PK grupa (n = 24) – životinje su pretretirane sa L-NAME u jednoj pojedinačnoj dozi (10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ) 30 minuta pre davanja PK; i L-NAME grupa (n = 24) – životinje su tretirane sa L-NAME jednokratno (10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ).

Pacovi u svim eksperimentalnim grupama su dekapitovani nakon 30 minuta, 24 h i 7 dana (po 8 životinja u svakom terminu), a glavice su odmah zamrzavane u tečnom azotu i čuvane na  $-70^\circ\text{C}$  do analize. Aplikacija PK, L-NAME i NaCl je vršena Hamiltonovim špricom na stereotaksičnom instrumentu za male laboratorijske životinje i prema odgovarajućim koordinatama za strijatam (koordinate: 8,4 mm iza bregme, 2,6 mm levo od srednje linije suture i 4,8 mm ventralno od dure) (19).

Od biohemijskih parametara sadržaj ukupnog glutaciona i aktivnost glutacion peroksidaze mereni su obostrano u strijatumu posle 30 minuta, jednog dana i 7 dana nakon tretmana.

## **Reagensi**

Sve hemikalije bile su analitičke čistoće. U studiji su korišćene sledeće supstance: Parakvat - Galokson® (200 g/L) (Galenika, Zemun, Srbija); Pentobarbital natrijum – Vetanarcol® (0,162 g/mL) (Werfft - Chemie, Vienna, Austria); Glutathione reductase (EC 1.6.4.2), Type III, from yeast [9001-48-3], Sigma Chemical Co (St Luis, MO, USA) – visoko rafinisana suspenzija u 3,6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, na pH 7,0; 2500 U/1.6 mL (9,2 mg prot/mL – biuret) 170 U/mg proteina (1 jedinica redukuje 1 μmol GSSG/min, pH 7,6 na 25 °C); fiziološki rastvor (0,9 % NaCl) (Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija); glutation, glutation disulfid i NADPH (Boehringer Corp. - London, UK); NaNO<sub>3</sub> (Mallinckrodt Chemical Works - St. Louis, MO, USA); natrijum glukonat, etilendiamintetra sirćetna kiselina – EDTA (Sigma - Sr. Louis, USA); Natrijum fosfat - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, kalijum dihidrogen fosfat - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glicerol, metanol, acetonitril, trihlorsirćetna kiselina, tiobarbiturna kiselina (Merck - Darmstadt, Germany); natrijum tetraborat i borna kiselina (Zorka - Šabac, Srbija); karbonatni pufer (50 mM, pH 10,2), (SeRAV, Feinbiochemica - Heidelberg, New York); NaNO<sub>3</sub>, Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, USA); natrijum glukonat, Merck (Darmstadt, Germany); glicerol, Merck (Darmstadt, Germany); metanol, HPLC čistoće, Merck (Darmstadt, Germany); acetonitril, HPLC čistoće, Merck (Darmstadt, Germany); standardni puferi pH 7,0 i pH 10,0, HI 7710P (Vila do Conde, Portugal). Dejonizovana voda je pravljena preko Millipor mili-Q sistema za prečišćavanje vode (Waters - Millipore, Milford, MA, USA).

## **Priprema tkiva i merenja**

Homogenati selektivno osetljivih moždanih struktura pripremani su kao što je opisano ranije (20). Izolovan je ipsi i kontralateralni strijatum i sve vreme procedure držani su na ledu. Izolovani preseki su prebačeni u saharozni medijum (0.25 mol/L saharoza, 0.1 mmol/L EDTA u natrijum-kalijum fosfatnom puferu, pH 7) i homogenizovani u staklenom homogenizeru s teflonskim tučkom na 800 obrtaja/min (Tehnica Zelezniki Manufacturing, Slovenia). Nakon dva uzastopna centrifugiranja na 1000 obrtaja u minuti, u trajanju od 15 min na 4°C, odvojen je supernatant, a grubi talog je resuspendovan u 1 mL dejonizovane vode. Solubilizacija subcelularnih membrana u hipotoničnom rastvoru postignuta je Pasterovom pipetom konstantnim mešanjem od 1h. Zatim su homogenati centrifugirani na 2000 obrtaja u minuti 15 min na 4 °C, a dobijeni supernatant je korišćen za analizu. Za merenje ukupne koncentracije proteina metodom po *Lowr*-iju korišćen je kao standard kristalizovani serumski albumin govečeta (21).

**Glutation (GSH)** - Za određivanje ukupnog GSH korišćena je reciklirajuća reakcija oksidacije GSH do GSSG u prisustvu *Elman*-ovog reagensa (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina, DTNB) i specifičnost delovanja enzima glutation reduktaze prema supstratu GSSG, kada se on redukuje u GSH (22). Rezultati su izražavani u nmol GSH na mg proteina.

**Glutation peroksidaza (GPx)** - Ova metoda se zasniva na indirektnom određivanju aktivnosti GPx spektrofotometrijskim merenjem potrošnje NADPH na

340 nm. Enzim GPx katalizuje redukciju lipidnih hidroperoksida u alkohol/H<sub>2</sub>O korišćenjem redukujućih ekvivalenata GSH, koji tako postaju oksidovani. Regeneracija potrošenog GSH dešava se redukcijom GSSG u GSH, katalizovano enzimom GR, koja koristi NADPH kao donor redukujućih ekvivalenata. Za redukciju svakog mola GSSG potreban je jedan mol NADPH (23). Rezultati su predstavljeni u jedinicama (units, U) aktivnosti enzima po mg proteina: U GPx / mg proteina.

### **Statistička analiza**

Podaci su analizirani korišćenjem verzije *Statistica software 7.0 (Stat Soft, Inc.)*. Poređenje parametara OS sa kontrolnim vrednostima urađeno je korišćenjem nezavisnog *Student T*-testa. Razlike su smatrane statistički značajnim za  $p < 0,05$ .

### **Rezultati**

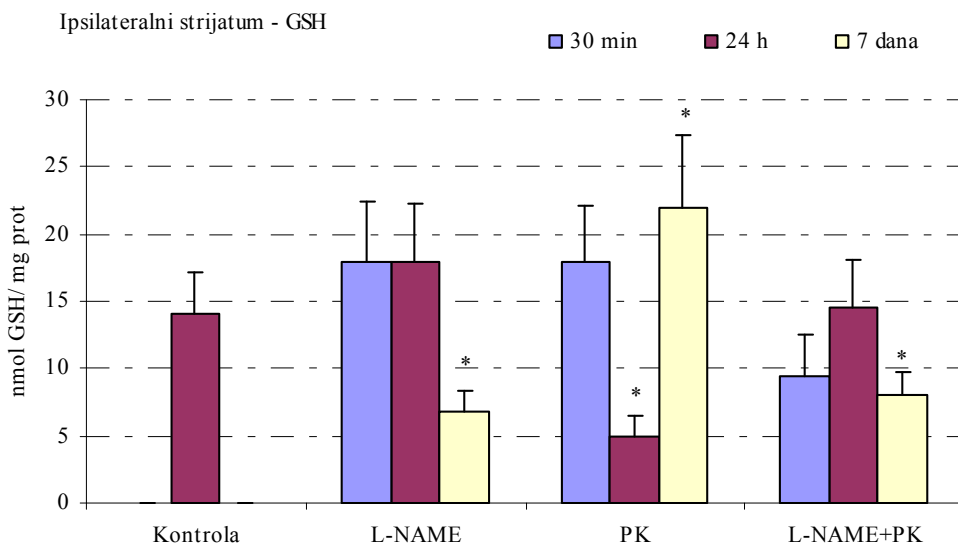
Ne postoji značajna razlika u analiziranim parametrima OS unutar kontrolnih grupa [intaktne (rezultati nisu predstavljeni) i lažno-operisane], što govori da sam tretman nije doveo do oksidativne povrede moždanog tkiva. Rezultati analiziranih biohemijskih parametara predstavljeni su grafički za obe strane strijatuma, a kontrolne vrednosti se odnose na lažno-operisane pacove. Rezultati pokazuju da je trend oksidativnih promena u strijatumu sličan za obe strane, kako tretirane (ipsilateralne) tako i suprotne, kontralateralne strane.

Eksperimentalne grupe životinja su aktivno praćene od tretmana do žrtvovanja.

Sadržaj ukupnog GSH bio je snižen višestruko 24h posle davanja PK, dok je sedmog dana bio povećan 134% u odnosu na kontrolne vrednosti. Sedam dana nakon davanja samo L-NAME ili kombinacije L-NAME sa PK, sadržaj GSH bio je obostrano smanjen u strijatumu u odnosu na kontrolne vrednosti (Grafikoni 1, 2).

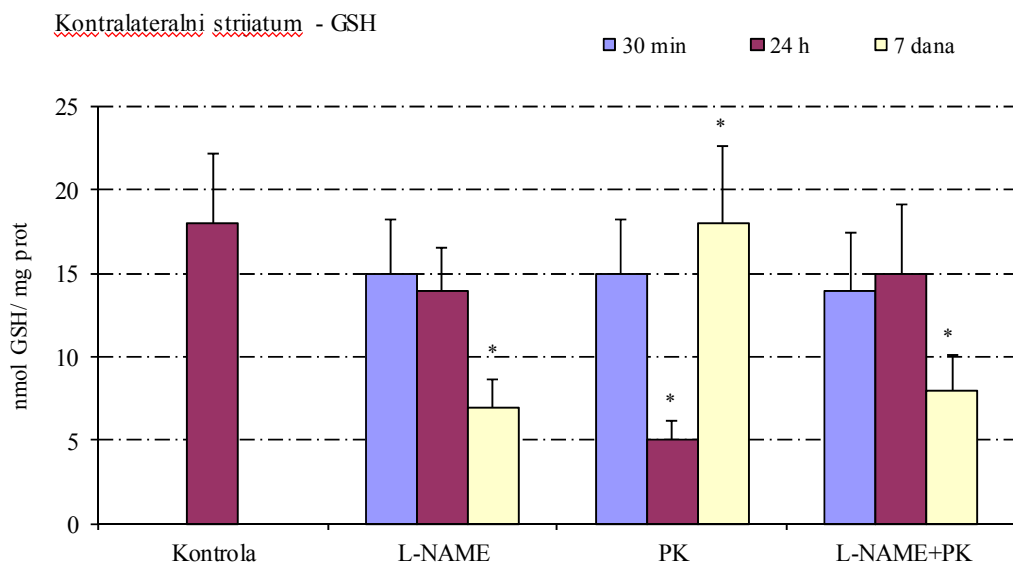
Grafik 1: Sadržaj ukupnog glutationa u ipsilateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije parakvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD i izražene su u jedinicama: nmol GSH/mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja,  $n = 8$ . Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti smatrane su statistički značajnim za  $p < 0.05$  (*Student T-test*).



Grafik 2: Sadržaj ukupnog glutationa u kontralateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije parakvata

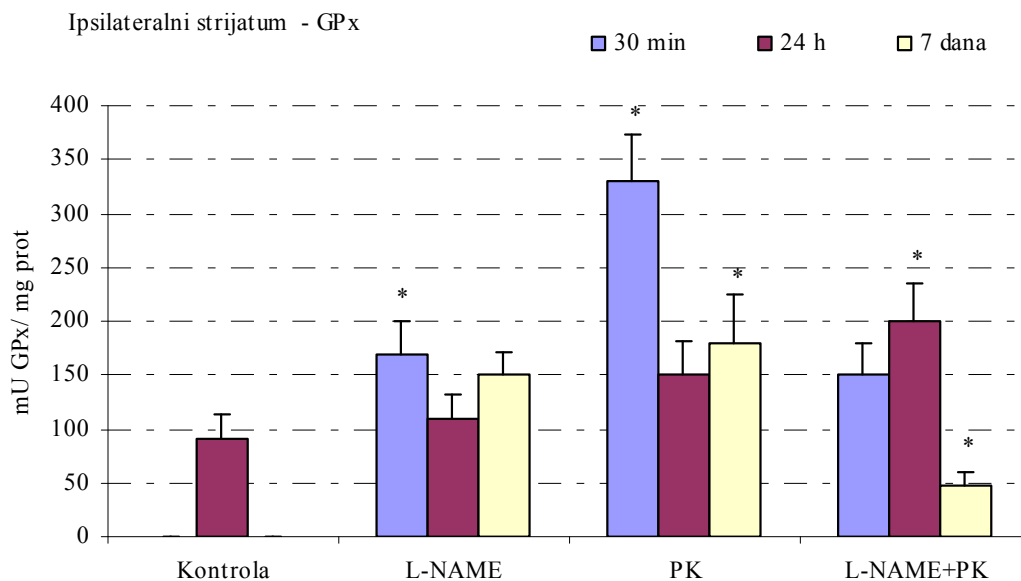
Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD i izražene su u jedinicama: nmol GSH /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja,  $n = 8$ . Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za  $p < 0.05$  (*Student T-test*).



Aktivnost GPx bila je značajno povećana u strijatumu ( $p < 0,05$ ) obostrano 30 minuta od aplikacije PK, nakon čega je postojao blagi trend sniženja aktivnosti enzima, mada je aktivnost GPx i dalje bila značajno viša od kontrolnih vrednosti (Grafikoni 3, 4). Davanje inhibitora NOS je takođe povećala aktivnost enzima bilo u kombinaciji sa PK, ili samog L-NAME, osim u terminu 7 dana nakon davanja L-NAME+PK, kada je zabeleženo značajno smanjenje aktivnosti enzima od čak 70% u odnosu na kontrolu (Grafik 3).

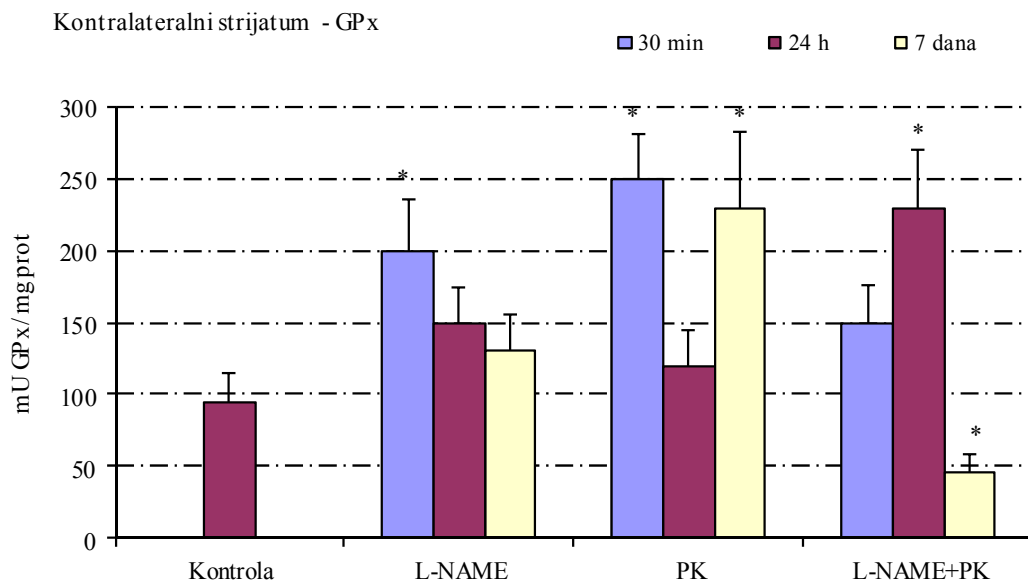
Grafik 3: Aktivnost glutation peroksidaze u ipsilateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije parakvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD i izražene su u jedinicama: mU GPx/mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja,  $n = 8$ . Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za  $p < 0.05$  (*Student T-test*).



Grafik 4: Aktivnost glutation peroksidaze u kontralateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije parakvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SD i izražene su u jedinicama: mU GPx/mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, n = 8. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za  $p < 0.05$  (*Student T-test*).



## Diskusija

Bihevioralne promene koje su se javile kod životinja nakon trovanja PK upućuju na povećanu osetljivost nigrostrijatnog dopaminskog sistema. Kod životinja je registrovano rotaciono kretanje kontralateralno od strane aplikovanja PK. Ovi simptomi su reverzibilnog karaktera i povukli su se 2-3 h od trovanja. Ovakav nalaz je u skladu sa literaturnim podacima u kojima je uočeno da se nakon *i.s.* davanja PK *Wistar* pacovima ostvaruju neurohemijski, morfološki i bihevioralni efekti (24).

U mehanizmu delovanja PK na ćelije nigrostrijatnog sistema od značaja su i neurotoksični efekti PK, koji nastaju kao posledica povećanog efluksa glutamata u sinaptičku pukotinu. Kao rezultat stimulacije receptora, putem glutamata, čiji efluks stimuliše PK, povećava se koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  u ćeliji, što kao rezultat ima aktivaciju NOS i stvaranje  $\text{NO}^{\bullet}$  iz L-arginina (25, 26). Nastali  $\text{NO}^{\bullet}$  sa  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , gradi peroksinitritni anjon ( $\text{ONOO}^-$ ), koji ostvaruje dodatne neurotoksične efekte (27, 28).

30 minuta nakon *i.s.* aplikovanja PK u strijatumu, obostrano je registrovano značajno povećanje aktivnosti GPx ( $p < 0,05$ ); (Grafikoni 3, 4). Ovako visoka aktivnost enzima nije bila praćena promenama u sadržaju ukupnog GSH (Grafikoni 1, 2). Međutim, nakon 24h u strijatumu obostrano aktivnost GPx, premda povećana u odnosu na kontrolu, značajno je bila niža u odnosu na rani termin posmatranja (30 minuta). Ovo smanjenje aktivnosti enzima, bilo je praćeno značajnim smanjenjem koncentracije ukupnog GSH. Smanjenje sadržaja GSH koje se odražava i na aktivnost GPx, može da se objasni i stvaranjem s-nitrozoglutationa (29). Smanjeni sadržaj ukupnog GSH u analiziranim strukturama mozga, ukazuje na nepotpunu oksidativnu zaštitu ćelije. U nastojanju ćelije da održi energetska ravnotežu, moguće je da jedan deo GSH podlegne razgradnji, jer razgradnjom svakog molekula GSH, oslobađaju se dva molekula ATP-a, što bi moglo biti jedno od objašnjenja sniženog sadržaja GSH u strijatumu nakon *i.s.* PK (30). Ovaj sniženi sadržaj GSH obostrano u strijatumu ukazuje i na njegovo aktivno učešće u antioksidativnoj zaštiti prilikom trovanja PK (Grafikoni 1, 2). Takođe, moguće je da se smanjenje javlja i kao posledica konjugovanja PK sa GSH, koji bi mogao da smanji toksični efekat PK u moždanoj strukturi, s obzirom da bihevioralne promene nisu registrovane nakon davanja PK reverzibilnog karaktera. Sedmog dana nakon trovanja PK, sadržaj GSH se značajno povećao, što se može tumačiti kompenzatornim povratnim mehanizmom koji je uslovljen povećanom potrebom ćelije da se zaštiti od OS-a.

Enzim GPx odgovoran je za uklanjanje  $\text{H}_2\text{O}_2$ , prekursora hidroksilnog radikala (odgovornog za inicijalnu fazu lipidne peroksidacije). Donor elektrona u reakcijama koje katalizuje GPx je GSH. U mozgu se najveći deo nastalog  $\text{H}_2\text{O}_2$  (niske koncentracije) uklanja GPx, koja je distribuirana u glija i dopaminergičnim ćelijama ili nervnim završecima u SN i *Caudo-putamenu*.

Primenom L-NAME, kompetitivnog antagoniste enzima NOS, blokira se sinteza NO u neuronima i glija ćelijama, i dolazi do nagomilavanja L-arginina, prekursora u biosintezi  $\text{NO}^{\bullet}$ , ali i ornitina, prekursora glutaminske kiseline. Iz ovog proizilazi da



inhibicija NOS delimično može doprineti nastanku ekscitotoksičnosti, ali nasuprot ovome i povećanoj antioksidativnoj zaštiti. Poznato da je glutaminska kiselina zajedno sa cisteinom i glicinom uključena u biosintezu GSH što objašnjava povećanu aktivnost GPx već 30 minuta nakon davanja L-NAME obostrano u strijatumu pacova (Grafikoni 3, 4).

Inhibicija NOS davanjem L-NAME utiče na sadržaj GSH. U našem istraživanju zapaženo je da posle trovanja PK, kada sinteza NO<sup>•</sup> nije bila inhibirana, u periodu od 24 h do sedmog dana, postojao je porast ukupnog GSH, za razliku od preostalih tretmana, kada je (ne)posredno ometena sinteza NO (Grafik 2).

Za razliku od trovanja PK, predtretman sa L-NAME doprinosi postepenom snižavanju aktivnosti enzima GPx (odgovornog za uklanjanje lipidnih hidroperoksida i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a posebno niska aktivnost GPx izmerena je sedmog dana (Grafik 3). Izmereni smanjeni sadržaj GSH je u tom slučaju verovatno bio posledica energetske iscrpljenosti tkiva, kao i manjka donora redukcionih ekvivalenata (NADPH), odnosno verovatno je aktivnost G-6PDH u ovakvim uslovima razvijenog OS, determinišući faktor. Smanjenom sintezom NO, koja nastaje nakon delovanja L-NAME, smanjuje se i aktivacija transkripcijskih faktora u ćeliji, od kojih je NFκB značajan u stimulisanju gena za sintezu GSH.

Povećanje aktivnosti GPx u ipsi i kontralateralnom strijatumu nakon delovanja L-NAME upućuje na značaj metabolizma NO u aktiviranju ovog enzima, odnosno ka usmeravanju redoks stanja prema stvaranju vodonik peroksida, što je praćeno i očuvanim sadržajem ukupnog GSH. Smanjeni sadržaj GSH obostrano u strijatumu životinja koje su dobile samo L-NAME 7. dana, može biti i posledica vremenski ograničenog delovanja L-NAME, nakon čega je obnovljeno stvaranje NO, za koji je pokazano da je medijator aktivacije faktora transkripcije koji indukuju aktivnost GPx. Povećana aktivnost enzima obostrano u strijatumu posle 30 minuta i 24 h u grupama koje su pre PK dobile L-NAME, upućuje na zaštitni efekat ovog inhibitora sinteze NO. Značajno smanjenje aktivnosti GPx koje se javlja nakon 30 minuta, u odnosu na promene koje se javljaju nakon delovanja samog PK, upućuje na verovatni značaj sintetisanog NO u aktivaciji GPx, ili pak, u indukciji gena za sintezu enzima GPx.

Rezultati naših istraživanja potvrđuju uključenost NO<sub>x</sub> u mehanizme neurotoksičnosti PK. Pacovi trovani PK ispoljili su simptome parkinsonizma, a što se tiče biohemijske analize parametara glutationskog ciklusa, pokazano je da je aktivnost GPx bila značajno povećana u ovoj grupi. Praćenje aktivnosti GPx se može smatrati veoma osetljivim i pouzdanim indikatorom oksidativnog-nitrozativnog stresa, kao odgovora na neurotoksični efekat PK. Takođe, ovom studijom je pokazano da je posle 24 časa došlo do energetskog kolapsa i masivnog narušavanja redoks homeostaze nervnih ćelija strijatuma u grupi trovanoj PK. Odsustvo bihejvioralnih promena u grupi životinja koje su predtretirane sa L-NAME pre *i.s.* davanja PK, kao i stabilizacija ćelijskih funkcija 24 časa (nije izmeren pad aktivnosti GPx i pad sadržaja GSH kao u DK grupi) potvrđuje protektivnu ulogu ovog nekompetitivnog inhibitora NOS u neurotoksičnosti izazvane PK.

## Zahvalnost

Zahvaljujemo recenzentima na sugestijama. Ovaj rad je podržan sredstvima sa projekata Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (Projekat No. III 41018) i Ministarstva odbrane Republike Srbije (Projekat No. MMA/06-10/B.3).

## Literatura

1. Badah H, Nazimek T, Kaminska IA. Pesticide content in drinking water samples collected from orchard areas in central Poland. *Ann Agric Environ Med* 2007; 14: 109-14.
2. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Sánchez Navarro A, Bastos ML, CaRAVlho F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicol* 2006; 27: 1110-22.
3. Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicol* 2002; 180: 65-77.
4. Timbrell JA. Principles of biochemical toxicology. Taylor & Francis Ltd, London, 2000.
5. Czerniczyniec A, Karadayian AG, Bustamante J, Cutrera RA, Lores-Arnaiz S. [Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction.](#) *Free Radic Biol Med* 2011; 51(7): 1428-36.
6. Ray S, Sengupta A, Ray A. [Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats.](#) *Indian J Exp Biol* 2007; 45(5): 432-8.
7. Morán JM, Ortiz-Ortiz MA, Ruiz-Mesa LM, Niso-Santano M, Bravosanpedro JM, Sánchez RG, González-Polo RA, Fuentes JM. [Effect of paraquat exposure on nitric oxide-responsive genes in rat mesencephalic cells.](#) *Nitric Oxide* 2010; 23(1): 51-9.
8. Bajo-Grañeras R, Sanchez D, Gutierrez G, González C, Do Carmo S, Rassart E, Ganfornina MD. [Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum.](#) *J Neurochem* 2011; 117(6): 949-60.
9. Rappold PM, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, Sen N, Javitch JA, Tieu K. [Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3.](#) *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(51): 20766-71.
10. Bonne-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA: Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 134: 52-6.
11. Fitsanakis V, Amarnath V, Moore J, Montine K, Zhang J, Montine T. Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate complexes in pesticides. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1714-23.
12. Lotharius J, O'Malley KL. The parkinsonism-inducing drug 1- methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *J Biol Chem* 2000; 275: 38581-8.
13. Zeng X, Shen H, Zhao J, Cai Q, Wang C, Xu Q. [Long-term changes in morphology, D\(2\)R expression and targets of regenerated dopaminergic terminals in the striatum after a partial lesion in the substantia nigra in the rat.](#) *Brain Res* 2012.
14. Miranda M, de Bruin VMS, Vale MR, Viana G. Lipid Peroxidation and Nitrite plus Nitrate Levels in Brain Tissue from Patients with Alzheimer's Disease. *Gerontol* 2000; 46: 179-84.
15. Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain Res* 2003; 976: 243-52.

16. Talas DU, Nayci A, Polat G, Atis S, Comelakoglu U, Bagdatoglu OT, Bagdatoglu C. The effects of dexamethasone on lipid peroxidation and nitric oxide levels on the healing of tracheal anastomoses: an experimental study in rats. *Pharm Res* 2002; 46: 265-71.
17. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modifications of biomolecules. *Mol Aspects Med* 1998; 19: 221-357.
18. Rubbo H, Donnell VO. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insight. *Toxicol* 2005; 208: 305-17.
19. König JFR, Klippel RA. The rat brain. The Williams and Wilkins Company A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Baltimore, USA. 1963: 53.
20. Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterisation of rat brain synaptic plasma membrane. *J Neurochem* 1974; 2: 281-90.
21. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
22. Anderson ME. Tissue glutathione. The DTNB-GSSG reductase recycling assay for total glutathione (GSH+1/2 GSSG). In: Greenwald RA. ed. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press Inc, Florida, 1986: 317-23.
23. Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 77: 1525-35.
24. Liou HH, Chen RC, Tsai YF, Chen WP, Chang YC, Tsai MC. Effects on the substantia nigra of the Wistar rats: neurochemical, histological and behavioral studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 137: 134-41.
25. Gathwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TINS* 1991; 14: 60-7.
26. Knowels R, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
27. Brecht D, Snyder S. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 3-11.
28. Gupta S, Rogers L, Smith C. Biliary excretion of lysosomal enzymes, iron and oxidized protein in Fischer-344 and Sprague-Dawley rats and the effect of diquat and acetaminophen. *Toxicol Applied Pharmacol* 1994; 125(1): 42-50.
29. Murphy M, Sies H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10860-4.
30. Gibson D, Brackett D, Squires R, Balla A, Lerner M, McCay P, Pennington L. Evidence that the large loss of glutathione observed in ischemia/reperfusion of the small intestine is not due to oxidation to glutathione disulfide. *Free Radic Biol Med* 1993; 14(4): 427-33.

#### Dozvola Etičkog odbora za rad sa životinjama

Autori su obavljali eksperiment u skladu sa institucionalnom politikom humanog i etičkog tretmana eksperimentalnih životinja, i spremni su da dostave o tome podatke i originalne materijale, ako se traži. Eksperimentalne životinje su tretirane u skladu sa Smernicama za proučavanje životinja, br 282-12/2002 (Etički komitet Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija).

#### **Izjava o originalnosti rada**

Rezultati predstavljeni u rukopisu nisu objavljeni ili predati za objavljivanje negde drugde.

#### **Izjava o sukobu interesa**

Autori izjavljuju da nema sukoba interesa.

# The effect of pre-treatment with l-name on glutathione and glutathione peroxidase in paraquat-induced neurotoxicity in rat striatum

Mirjana Đukić<sup>1</sup>, Milica Ninković<sup>2</sup>, Ivana Stevanović<sup>2</sup>, Katarina Ilić<sup>3</sup>,  
Dragan Đurđević<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology  
„Academician Danilo Soldatovic”, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Crnotravska 17, 11000  
Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology,  
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

**Author for Correspondence:** Mirjana Đukic, e-mail: mirjana.djukic@pharmacy.bg.ac.rs  
Phone (office): +381 11 3951 308 fax: +381 11 3972840  
URL: <http://www.pharmacy.bg.ac.rs/fakultet/ljudi/nastavnik/64>.

---

## Summary

Contact herbicide paraquat (DQ) is bipyridylium compound, which undergoes redox metabolism; hence enlarged in humans radical production mediated its toxicity. Target organs of systemic effect of PQ poisoning are lung and kidney. The mechanism of PQ-induced neurotoxicity is not elucidated till now.

The objective of our study was to examine the role of nitric oxide (NO<sub>x</sub>) in PQ-induced neurotoxicity, primarily focusing on glutathione cycles [total glutathione content (GSH) and glutathione peroxidase (GPx) activity]. In order to investigate the role of NO<sub>x</sub> in oxidative stress (OS) and/or nitrosative stress (NS) response to PQ neurotoxicity, we used NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) in the pretreatment of PQ administration.

Study was conducted on Wistar rats randomly divided in groups (n=8 for controls and n=24 for experimental groups) depending on the applied treatments. The tested compounds were intrastrially (*i.s.*) administered. Measuring of GSH content and GPx activity was performed at 30 min, 24 hours and 7 days after treatments.

Parkinsonism's like symptoms were observed only in the group of rats treated with PQ. The L-NAME protected animals from PQ-induced neurotoxicity, which could be concluded from the absence of Parkinsonism's like symptoms and reduced OS/NS response in the striatum of rats pretreated with L-NAME.

**Key words:** paraquat, neurotoxicity, striatum, nitric oxide, L-NAME.

---

## **Tečni farmaceutski preparati za primenu u pedijatriji izrađeni *ex tempore***

**Nataša Bubić Pajić<sup>1\*</sup>, Ivana Pantelić<sup>2</sup>, Snežana Savić<sup>2</sup>,  
Gordana Vuleta<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Medicinski fakultet – studijski program Farmacija, Katedra za farmaceutsku tehnologiju, Save Mrkalja 14, Banja Luka

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

\* Adresa autora za korespondenciju: [natasa\\_bubic@yahoo.com](mailto:natasa_bubic@yahoo.com)

---

### **Kratak sadržaj**

Mnogi lekovi koji se koriste za lečenje beba i dece nisu dostupni na tržištu u farmaceutskom obliku koji je pogodan za primenu kod ove populacije pacijenata. Štaviše, veći broj ovih lekova nije registrovan za upotrebu kod pedijatrijske grupe pacijenata. S obzirom da deca najbolje prihvataju tačne farmaceutske preparate za peroralnu primenu, ukoliko nisu dostupni na tržištu lekova, mogu se pripremati *ex tempore* za pojedinačnog pacijenta iz dostupnih registrovanih lekova. Izrada tačnih farmaceutskih oblika za peroralnu primenu iz čvrstih farmaceutskih oblika zahteva pažljivo razmatranje mnogih faktora, kao što su fizičko-hemijske osobine aktivnih i pomoćnih supstanci i kompatibilnost lekovitih supstanci sa ekscipijensima, ali i kompatibilnost pomoćnih materija međusobno. Kod izbora formulacije, uvek treba da se odabere ona za koju u stručnoj literaturi postoje podaci o stabilnosti preparata, eventualno i roku upotrebe, biološkoj raspoloživosti, efikasnosti i podnošljivosti leka koji je izrađen *ex tempore*. U ova nastojanja uključila su se i brojna ovlašćena tela donošenjem odgovarajućih dokumenata, poput Uredbe EU broj 1901/2006 koja je stupila na snagu 1.1.2007. godine, sa ciljem da se lekovi za pedijatrijsku populaciju učine dostupnijim, kao i da se osigura izrada lekova najvišeg kvaliteta s obzirom da *ex tempore* izrađeni lekovi ne prolaze kroz prekliničke i kliničke studije.

**Ključne reči:** *ex tempore* izrada lekova, farmaceutski oblici za decu, tačni farmaceutski preparati, peroralna primena

---

## Uvod

Uprkos brojnim registrovanim lekovima na tržištu, pri lečenju je ponekad potrebno propisati i izraditi magistralni lek prilagođen potrebama pojedinačnog pacijenta. Godinama su magistralni lekovi/preparati činili samo nekoliko procenata svih propisanih lekova, ali je poslednjih godina njihovo propisivanje češće, jer se povećava potreba za individualizovanom terapijom. Ona je najpotrebnija deci i posebnim grupama bolesnika, poput starijih ljudi, za koje često nema registrovanog leka u odgovarajućem farmaceutskom obliku (1).

Aktivne supstance se primenjuju kao deo farmaceutskih preparata u kojima su kombinovane sa jednom ili više pomoćnih/nelekovitih supstanci (poznatim kao farmakološki neaktivne supstance ili ekscipijensi), koje imaju različite, specijalizovane funkcije u farmaceutskom obliku. Formulacija farmaceutskog oblika zahteva razmatranje fizičkih, hemijskih i bioloških karakteristika svih aktivnih supstanci i ekscipijenasa koji će se koristiti za oblikovanje lekovitog proizvoda. Lekovite i pomoćne supstance moraju biti kompatibilne da bi se proizveo lek koji je stabilan, efikasan, prihvatljivog ukusa, koji se lako primenjuje i dobro podnosi (2,3).

Cilj ovog rada je razmatranje faktora koji utiču na *ex tempore* pripremanje farmaceutskih oblika lekova pogodnih za pedijatrijsku primenu.

## Farmaceutski oblici lekova pogodni za pedijatrijsku primenu

Deca nisu mali ljudi! Fiziološki procesi koji određuju raspoređivanje ili „sudbinu“ leka u organizmu, podležu radikalnim promenama tokom biološkog sazrevanja, naročito tokom prvih nedelja i u prvoj godini života (4). Shodno tome, menja se i način na koji se lekovi apsorbuju, raspoređuju, metabolišu i eliminišu iz organizma, što se ne može predvideti iz podataka za odrasle osobe (5). Starosna dob pacijenata za koje je lek namenjen takođe ima važnu ulogu u oblikovanju farmaceutskih preparata.

U vodiču za kliničko ispitivanje lekova za pedijatrijsku populaciju (CPMP/ICH/2711/99), pedijatrijski bolesnici su klasifikovani u sledeće četiri kategorije (6,7):

- prevremeno rođena novorođenčad
- novorođenčad rođena u terminu (0 - 27 dana starosti)
- odojčad i mala deca (1 - 23 meseca)
- deca (2 – 11 godina)
- adolescenti (12 – 16 ili 18 godina).

Bebe i deca mlađa od 5 godina starosti ne mogu da gutaju čvrste farmaceutske oblike (npr. tablete, tvrde kapsule). Čvrsti oblici koji sadrže fiksnu dozu leka (npr. 250 mg) takođe ne bi bili praktični za upotrebu kod ovakvih pacijenata jer doziranje zavisi od telesne mase (mg/kg) ili telesne površine (mg/m<sup>2</sup>) deteta. Stoga, tečni lekoviti preparati imaju prednost kod oralne primene kod odojčadi i dece u odnosu na čvrste

farmaceutske oblike. Jedan pedijatrijski tečni peroralni preparat (npr. paracetamol, sirup 120 mg/5ml ) se može koristiti kod beba i dece svih uzrasta, jer se doza leka može prilagoditi pacijentima variranjem zapremina leka (deca uzrasta do 3 meseca treba da uzimaju 5-10 mg/kg; deca od 3 meseca do 1 godine 60-120 mg (2,5-5 ml) 1-4 puta dnevno; deca od 1 do 5 godina 120-250 mg (5-10,4 ml) 1-4 puta dnevno; deca od 6 do 12 godina 250-500 mg (10,4-20,8 ml) 1-4 puta dnevno (3,8,9).

U nedostatku registrovanih lekova na tržištu, farmaceuti širom sveta (često) pribegavaju izradi tečnih preparata za peroralnu primenu iz sprasanih tableta, ili tvrdih kapsula, tako što ih disperguju (suspenduju) ili rastvaraju u odgovarajućem vehikulumu. U tim slučajevima je registrovan/gotov lek u obliku tableta ili kapsula izvor lekovite supstance i oblikovanjem u tečan farmaceutski oblik, postiže se lakše i preciznije doziranje za pacijente kojima nisu propisane standardne doze leka, kao što su bebe i mala deca, i bolja komplijansa/adherenca.

### **Registrovani lekovi za decu na tržištu i „specijalni” preparati**

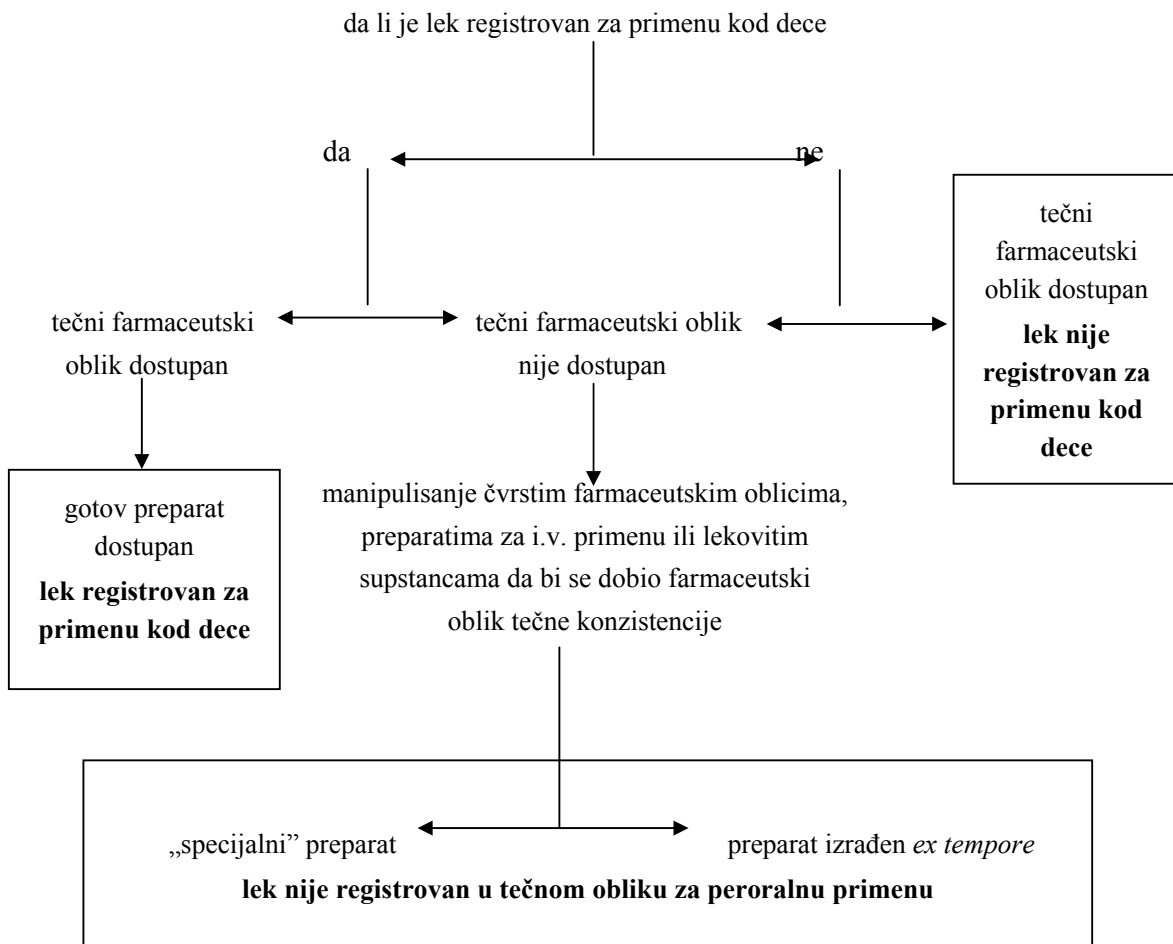
Odgovarajući farmaceutski oblici za primenu kod dece postoje za veoma mali broj komercijalno dostupnih lekova te se potreba za *ex tempore* izradom preparata stalno povećava, uzimajući u obzir da se povećava i broj registrovanih lekova za odrasle sa očekivanom upotrebom i kod dece (10). Većina lekova nije registrovana za primenu kod pedijatrijskih pacijenata zbog velikog broja razloga, izuzev kada neka bolest široko pogađa bebe i decu. Jedan od tih razloga je mnogo manje tržište za decu u odnosu na tržište za odrasle, pogotovo za lekove za česte bolesti (npr. hipertenzija). Takođe, farmaceutska industrija se nerado odlučuje da registruje lekove za bebe i decu, jer to zahteva izvođenje adekvatnih studija na pedijatrijskoj populaciji. Stoga, dodatni troškovi, ograničena finansijska dobit, potencijalno usporavanje izdavanja dozvole za stavljanje leka u promet za odrasle osobe, shvatanje da su pravna odgovornost i regulatorni zahtevi za sprovođenje studija kod dece veći nego kod studija na odraslim ljudima, prepreke su za formulisanje i registrovanje pedijatrijskih farmaceutskih oblika na tržištu (8,10).

Farmaceutski preparati izrađeni *ex tempore* nisu registrovani lekovi te ne podležu zahtevima regulatornih organa. Stoga lekar koji propisuje lek i farmaceut koji ga izrađuje ne mogu imati iste pretpostavke o kvalitetu, bezbednosti i efikasnosti tog leka, kao što bi imali za registrovane lekove (11). Sprovođenjem nekoliko studija u Velikoj Britaniji ustanovljeno je da oko 11 % lekova koji se koriste za lečenje dece nije registrovano za primenu kod ove populacije (eng. *off label*) ili uopšte nemaju dozvolu za stavljanje leka u promet (eng. *unlicensed*). Situacija je slična i u ostalim evropskim zemljama (12).

Mnogi lekovi prisutni na tržištu dostupni su samo u obliku čvrstih farmaceutskih oblika, koje deca, u zavisnosti od uzrasta, ne mogu da progutaju. Nadalje, doza koja treba da se primeni predstavlja samo deo čvrstog farmaceutskog oblika, a proporcionalno smanjivanje je teško postići. Na Slici 1 prikazane su smernice za



obezbeđivanje odgovarajućih peroralnih doza leka za decu kod kojih primena tableta ili kapsula nije pogodna (5).



Slika 1 Smernice za obezbeđenje odgovarajućih peroralnih doza leka za decu kod kojih primena tableta ili kapsula nije pogodna (5)

Figure 1 Decision pathway for providing oral doses to children for whom whole tablets/capsules are unsuitable (5)

U nekim zemljama, određeni preparati se ponekad izrađuju *ex tempore* u većim količinama. Izrada ovakvih preparata se vrši u laboratorijama i bolničkim apotekama koje primenjuju standarde Dobre proizvođačke prakse (eng. skraćenica GMP), a registrovanje i inspekciju njihovih aktivnosti obavljaju agencije za lekove. U Velikoj Britaniji, Agencija za kontrolu lekova (eng. *Medicines Control Agency*) može da izda

dozvolu za stavljanje u promet za preparate izrađene u ovim laboratorijama i ovakvi preparati se označavaju kao „specijalni” preparati. Izradom „specijalnih” preparata i njihovim plasmanom na tržište mogu se baviti i veće kompanije. Farmaceut koji nabavlja specijalitet (a ne lekar koji ga propisuje) odgovoran je za kvalitet preparata. Nabavka treba da se obavlja prema specifikaciji preparata i uz savetovanje sa farmaceutima koji su zaduženi za obezbeđenje kvaliteta pri nacionalnoj zdravstvenoj službi (eng. *National Health Service*) (5,12).

Farmaceutski oblici za decu koji se najčešće izrađuju *ex tempore* razlikuju se od države do države. Na primer, u Velikoj Britaniji, Norveškoj i Švedskoj preparati izbora su tačni lekoviti oblici za peroralnu primenu, u Francuskoj i Španiji kapsule, dok se u Italiji i Finskoj najčešće izrađuju praškovi za peroralnu primenu. Lek koji se u jednoj zemlji izrađuje *ex tempore*, u drugoj može biti registrovan na tržištu. Zbog ograničenih podataka o dostupnosti ovakvih lekova, uvoz lekova je otežan ili gotovo nemoguć (12).

Formulacija tačnih preparata za peroralnu primenu kod dece zahteva pažljivo razmatranje mnogih faktora koji obezbeđuju izradu lekova optimalnog kvaliteta i efikasnosti. Izradu ovih preparata iz sprasjenih tableta treba primenjivati samo ako postoje adekvatni podaci o stabilnosti proizvoda, i treba uvek imati na umu da često postoje jednostavnije i pouzdanije metode za pripremu farmaceutskog oblika (13). Rizici povezani sa *ex tempore* izradom lekova, upotrebom lekova koji nisu registrovani za primenu kod dece, uključuju korišćenje pogrešnih proskripcija i proračuna, izbor neodgovarajućih ekscipijenasa, korišćenje pogrešnih količina supstanci i formulisanje nestabilnih proizvoda. Posledice mogu biti fatalne. Jedna beba je umrla u Engleskoj 2000. godine, nakon što je primila preparat koji je *ex tempore* izrađen iz leka koji nije registrovan za decu, a finalni/konačni preparat koji je izdat sadržavao je hloroform. Naime, u *ex tempore* izrađen preparat pogrešno je uključen koncentrovani rastvor hloroforma (eng. *Chloroform Water Concentrate*) umesto hloroform vode dvostruke jačine (eng. *Chloroform Water Double Strength*) (14).

O registrovanim lekovima za decu na svetskom tržištu i *ex tempore* izradi preparata za pedijatrijske pacijente, kao i o problemu u vezi sa njihovom stabilnošću, odgovarajućim pakovanjem i primenom, diskutovano je tokom predavanja na osmom Svetskom kongresu o farmaceuticima, biofarmaceuticima i farmaceutskoj tehnologiji (eng. *8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*), održanom u Istanbulu, od 19. do 22. marta 2012. godine. Između ostalog, obrazložen je sadržaj nacрта novog Vodiča za razvoj farmaceutskih preparata za primenu u pedijatriji (eng. *Guideline on Pharmaceutical Development of Medicines for Paediatric Use*, EMA/CHMP/QWP/180157/2011) (15,16). Kada je reč o tačnim farmaceutskim preparatima, u Vodiču se favorizuje primena rastvora pre nego suspenzija za peroralnu primenu, kad god je to moguće, s obzirom da je primena suspenzija povezana sa potencijalnim rizikom od pogrešnog doziranja, bilo usled neodgovarajućeg mućkanja preparata pre primene ili kao posledica nestabilnosti preparata (aglomeracija, flokulacija, flotacija ili sedimentacija, kao najčešće pojave

nestabilnosti farmaceutskih suspenzija). Iako se primenom oralnih kapi (tečnih farmaceutskih preparata koji se doziraju na kapi) obezbeđuje pouzdanije doziranje, u nacrtu Vodiča se navodi da na ambalaži u tom slučaju mora biti naveden najveći broj kapi koji se može uneti kao pojedinačna doza, kao i da to ne bi trebalo da bude više od 10 kapi (tj. oko 0,5 ml) preparata. Tekst Vodiča dostupan je za komentare stručne javnosti do kraja 2012. godine (16).

### **Izrada tečnih farmaceutskih preparata za peroralnu primenu**

U Tabeli I su prikazani primeri lekova koji nisu dostupni na tržištu u obliku koji je pogodan za primenu kod beba i male dece (3,8). Kao što se vidi, veći broj lekovitih supstanci iz različitih farmakoterapijskih grupa, a najviše su zastupljeni lekovi koji se koriste za lečenje kardiovaskularnih bolesti, bolesti nervnog sistema i antineoplastici, nije dostupan u adekvatnom obliku za primenu kod ove populacije pacijenata.

U apotekama, uključujući i apoteke u bolnicama i domovima za negu dece, izrađuje se nekoliko stotina različitih preparata za primenu kod dece. Neki od njih imaju monografije u farmakopejama ili su podaci o njima objavljeni u relevantnoj stručnoj literaturi. Oralne/peroralne kapi, sirupi i oralne/peroralne suspenzije su pogodne za primenu kod novorođenčadi, beba i male dece, dok su tablete ili kapsule prihvatljive za stariju decu i adolescente (8).

Farmaceuti mogu da pripremaju tečne lekovite preparate iz komercijalno dostupnih tableta i tvrdih kapsula. Iako bi neke od ovih preparata mogli da pripremaju i staratelji deteta, farmaceut bi trebalo da ih izrađuje kako bi se smanjila mogućnost nastajanja grešaka u doziranju. Postupak izrade podrazumeva najčešće prevođenje registrovanih lekova u oblik koji pacijent može lako da primeni peroralnim putem. Većina lekova se ne rastvara potpuno u vodi, zbog čega najviše *ex tempore* izrađenih tečnih preparata iz tableta ili kapsula, predstavljaju suspenzije za peroralnu primenu/peroralne suspenzije (3).

**Tabela I** Primeri lekovitih supstanci koji na tržištu nisu dostupni u farmaceutskom obliku koji je pogodan za primenu kod beba i male dece (3,8)

**Table I** Examples of medications not available in a suitable dosage form (eg. a liquid formulation) for infants and young children (3,8)

acetazolamid	fenobarbiton	metotreksat	prokarbazon
albendazol	fenoksibenzamin	meflokvin	propafenon
amiodaron	glutamin	metilfenidat	riboflavin
amitriptilin	hidroksiurea	metimazol	sakvinavir
arginin	holestiramin	minoksidil	sertralin
aspartat	irbesartan	natrijum-benzoat	sildenafil
biotin	kaptopril	neomicin	skopolamin
bupropion	karbenicilin	nikardipin	sotalol
busulfan	klindamicin	nimodipin	spirinolaktan
cink-sulfat	klobazam	ofloksacin	testosteron
dantrolen	klonazepam	olanzapin	tiagabin
deksametazon	klonidin	paramomicin	topiramat
enalapril	lanzoprazol	piridoksin	ursodiol
etambutol	leukovorin	prazosin	varfarin
etionamid	lizinopril	primidon	verapamil
famciklovir	lomustin	probenecid	vigabatrin

U Tabeli II su prikazani primeri odabranih formulacija/receptura za *ex tempore* izradu tečnih lekovitih preparata za peroralnu primenu (1,2,11).

Iako ne postoji zvaničan protokol za *ex tempore* izradu tečnih preparata iz tableta ili kapsula, postupak obično uključuje sprašivanje tableta ili pražnjenje sadržaja kapsula u tarionik. Zatim se prašku dodaje mala količina izabranog vehikuluma i uz mešanje izradi glatka pasta. Ostatak vehikuluma se dodaje postepeno, uz mešanje. Smeša se potom prenese u menzuru. Tarionik se ispere malom količinom vehikuluma te se i taj sadržaj doda u menzuru, i menzura dopuni vehikulomom do potrebne količine/zapremine preparata (1,2). U ove preparate se mogu dodavati i ekscipijensi kao što su konzervansi, sredstva za suspendovanje i korigensi ukusa. Često se koristi vehikulum koji predstavlja smešu glicerola ili sirupa, sa metilcelulozom kao sredstvom za suspendovanje i parabenima kao konzervansima (13). Komercijalno dostupni vehikulumi za suspendovanje (npr. Ora-Plus<sup>®</sup>, Paddock Laboratories, Minneapolis, SAD) se mogu kombinovati sa jednakom zapreminom sirupa (Ora-Sweet<sup>®</sup>, Paddock Laboratories). Vehikulum koji sadrži metilcelulozu se takođe priprema *ex tempore*, s obzirom da na tržištu nije registrovan. Ipak, treba imati u vidu da se pH vrednost ovih vehikuluma razlikuje: Ora-Plus<sup>®</sup>/Ora-Sweet<sup>®</sup> imaju pH vrednost oko 4,2 do 4,4, dok 1 % suspenzija metilceluloza/sirup ima pH vrednost oko 6,8 (3).

**Tabela II** Odabrane formulacije za *ex tempore* pripremu tečnih preparata za peroralnu primenu iz komercijalno dostupnih (registrovanih) lekova (1,11)

**Table II** Oral liquid dosage forms prepared by modification of commercial medications (1,11)

Farmaceutski preparat	Sastav	Uslovi čuvanja	Rok upotrebe
amiodaron, oralna suspenzija 40 mg/ml (11)	amiodaron hidrohlorid, tableta 200 mg x 20 Ora-Plus® 50 ml Ora-Sweet SF® do 100 ml	u frižideru, u tamnoj staklenoj boci	28 dana
kaptopril, rastvor za oralnu primenu 1 mg/ml (1)	kaptopril, tableta 12,5 mg x 8 natrijum-askorbat, injekcija 500 mg sterilna voda za irigaciju do 100 ml	u frižideru, u tamnoj boci	56 dana
kaptopril, oralna suspenzija 1 mg/ml (11)	kaptopril, tableta 25 mg x 4 Ora-Plus® do 50 ml Ora-Sweet® do 100 ml	u frižideru, u tamnoj staklenoj boci	7 dana
klonidin, oralna suspenzija 0,1 mg/ml (1)	klonidin, tableta 0,2 mg x 15 sterilna voda za irigaciju 1-2 ml obični sirup (USP) do 30 ml	u frižideru, u tamnoj boci	28 dana
piridoksin hidrohlorid, oralna suspenzija 10mg/ml (11)	piridoksin hidrohlorid, tableta 50 mg x 20 ksantan guma 0,5% rastvor (Keltrol®) do 100 ml	u frižideru, u tamnoj staklenoj boci	28 dana
spirinolakton, oralna suspenzija 2,5 mg/ml (1)	spirinolakton, tableta 25 mg x 12 sterilna voda za irigaciju 5 ml Sirup od višnje (NF) do 120 ml	na sobnoj temperaturi ili u frižideru, u tamnoj boci	28 dana

U formulaciju nekih preparata se prema stručnoj literaturi (1,11) mogu uključiti i vehikulumi koji su oficinalni u farmakopejama (USP30/NF25). U Tabeli III su prikazani neki oficinalni (prema USP30/NF25) i neki komercijalno dostupni vehikulumi i njihov sastav (1,10,17,18).

**Tabela III** Primeri vehikuluma za *ex tempore* izradu tečnih lekovitih preparata**Table III** Examples of vehicles for extemporaneous liquid dosage forms

Vehikulum	Sastav	Proizvođač
Sirup od višnje Cherry Syrup NF (14)	sok od višnje, saharoza, etanol, prečišćena voda	
Sirup od narandže Orange Syrup NF (14)	tinktura kore slatke narandže, limunska kiselina, talk, saharoza, prečišćena voda	
Ora-Plus® (1,10)	prečišćena voda, mikrokristalna celuloza, karmeloza-natrijum, ksantan guma, korigens ukusa, limunska kiselina, trobazni natrijum- fosfat, simetikon, metil paraben, kalijum-sorbat	Paddock Laboratories, SAD
Ora-Sweet® (1,10)	prečišćena voda, saharoza, glicerol, sorbitol, korigens ukusa, limunska kiselina, trobazni natrijum-fosfat, metil paraben, kalijum-sorbat	Paddock Laboratories, SAD
Ora-Sweet SF® (1,10)	prečišćena voda, glicerol, sorbitol, saharin-natrijum, ksantan guma, korigens ukusa, limunska kiselina, natrijum-citrat, metil paraben, propil paraben, kalijum-sorbat	Paddock Laboratories, SAD
Bicitra® (10)	natrijum-citrat, dihidrat (500 mg /5 ml); limunska kiselina, monohidrat (334 mg/5 ml)	Draxis Pharma, SAD

Ponekad se u recepturu mogu uključiti i alternativni rastvarači kao što je etanol, naročito kad je lek teško rastvorljiv u vodi, i puferi kojima se podešava pH na vrednost optimalnu za stabilnost aktivne supstance ili aktivnost konzervansa. Iako se formulacije tečnih preparata koji se izrađuju iz čvrstih farmaceutskih oblika čine jednostavne, one su veoma često kompleksna smeša vehikuluma i rastvora ili suspenzije ekscipijenasa i lekovite supstance. Ukoliko je aktivna supstanca rastvorena, nerastvorni ekscipijensi bi se mogli ukloniti filtracijom, ali bi moglo doći i do gubitka značajnih količina leka, ako je njegovo rastvaranje iz preparata nepotpuno. Suspendovani ekscipijensi mogu da utiču negativno na izgled preparata, a rastvoreni mogu da umanje stabilnost leka, npr. menjanjem pH vrednosti preparata. Zato se preporučuje upotreba samih čistih aktivnih supstanci, koje su često teško dostupne, umesto korišćenje registrovanih preparata (13).

S obzirom da deca odbijaju da peroralno uzimaju lekove koji nemaju prijatan miris i ukus, u preparate se često dodaju ekscipijensi koji koriguju ove osobine tečnih preparata. Takođe, upotreba ekscipijensa je neophodna da bi se obezbedila ujednačenost sadržaja leka, povećala stabilnost i sprečio rast mikroorganizama za vreme čuvanja i upotrebe preparata. Za razliku od aktivnih supstanci, status ekscipijensa nije regulisan u većini zemalja, iako neki od njih mogu da budu štetni za decu (5). Stoga, veoma je važno da se prilikom izbora formulacije/recepture razmotre mogući neželjeni efekti ekscipijensa za izradu preparata.

Za korigovanje ukusa preparata mogu se koristiti prirodni i veštački zaslađivači. Upotreba saharoze, glukoze i fruktoze može dovesti do povećanja nivoa šećera u krvi, kao i do nastanka karijesa, pogotovo ako se koriste rastvori sa više od 10 % saharoze. Deca koja imaju naslednu netoleranciju na fruktozu, mogu da razviju značajne simptome nakon uzimanja saharoze. Sorbitol i manitol mogu da izazovu osmotsku dijareju. U vezi sa primenom veštačkih zaslađivača kao što su saharin, ciklamat i aspartam, postoje podaci o neželjenim efektima koji još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Karcinogeni potencijal saharina i ciklamata pokazan u ispitivanjima na životinjama, nije dokazan i kod ljudi. Primena aspartama, koji je izvor fenilalanina, može da izazove fenilketonuriju. Sa njegovom upotrebom se takođe povezuje hiperaktivnost kod dece, ali to još nije potvrđeno (3,19-21).

Etanol se često upotrebljava kao korastvarač u vodi teško rastvornih lekovitih supstanci, te je moguće da dovede do pojave akutnih i hroničnih toksičnih neželjenih efekata (hipoglikemija, letargija, stupor, koma, depresija disanja i kardiovaskularni kolaps). Komisija za lekove američkog udruženja pedijatara (*The Committee on Drugs of the American Academy of Pediatrics*) preporučuje da lekovi namenjeni za decu budu formulisani bez upotrebe etanola. Ukoliko je dodatak etanola neophodan, zbog stabilnosti i/ili rastvorljivosti aktivne supstance, njegova koncentracija u preparatu ne sme da bude veća od 5 % (V/V). Ovo udruženje takođe preporučuje da pakovanje preparata sa etanolom treba da bude što manje kako bi se sprečilo uzimanje letalnih doza, ukoliko bi dete popilo celo pakovanje (13,20,22).

Glicerol i propilenglikol se takođe upotrebljavaju kao korastvarači u tečnim lekovitim preparatima za primenu kod dece. Blago su slatkog ukusa. Kada se glicerol primeni u visokim koncentracijama (40 %) i zapreminama, može da prouzrokuje mukozitis u stomaku. Zbog higroskopskih osobina i osmotskog delovanja, može da dovede do dijareje i disbalansa elektrolita (19). Propilenglikol se smatra manje toksičnim od ostalih glikola. Međutim, njegova toksičnost je procenjena na jednu trećinu toksičnosti etanola. Primena propilenglikola je povezana sa kardiovaskularnim, hepatičkim, respiratornim i neželjenim efektima na centralnom nervnom sistemu, posebno kod novorođenčadi kod kojih je njegovo biološko poluvreme eliminacije produženo (~17h) u poređenju sa odraslima (5h) (5,7,20).

Primena estara parahidroksibenzojeve kiseline (parabeni), benzojeve kiseline i natrijum-benzoata može da prouzrokuje reakcije hipersenzitivnosti i izazove simptome

astme (13,21). Osim toga, smatra se da benzoati i parabeni mogu pogoršati neonatalnu hiperbilirubinemiju vezujući se za proteine plazme umesto bilirubina, ali ovaj efekat još nije dokazan *in vivo* (13).

### **Nedostaci *ex tempore* izrađenih tečnih farmaceutskih preparata za peroralnu primenu**

Uobičajen problem u vezi sa *ex tempore* izradom lekovitih preparata je nedostatak podataka o njihovoj fizičkoj i hemijskoj stabilnosti. Ovi podaci nedostaju čak i u priručnicima koji su objavljivani kao vodiči za pripremu tečnih farmaceutskih preparata za decu. Prvi takvi priručnici su predstavljali skup formulacija/receptura/proskripcija koje su izrađivane u bolnicama i formulacija koje su preporučile farmaceutske kompanije, sa malim osvrtom na objavljene naučne podatke (13). U poslednje tri decenije naučnici širom sveta su sprovodili ispitivanja stabilnosti *ex tempore* izrađenih preparata iz komercijalno dostupnih farmaceutskih oblika. Predviđanje roka upotrebe ovakvih preparata se uglavnom zasnivalo na podacima o hemijskoj stabilnosti, koji su dobijeni HPLC analizom. U većini slučajeva testovi stabilnosti nisu uključivali ispitivanje fizičke i mikrobiološke stabilnosti, i nisu oponašali uslove kojima su preparati izloženi za vreme čuvanja i upotrebe (5).

U stručnoj literaturi su dostupni podaci o stabilnosti preparata koji su *ex tempore* izrađeni iz čistih aktivnih supstanci. Pretpostavke da i preparati izrađeni iz tableta ili kapsula iste aktivne supstance imaju istu stabilnost mogu biti veoma opasne. U istraživanju u kojem je ispitivana stabilnost tečnog preparata izoniazida izrađenog iz tableta prema propisu BPC (*British Pharmaceutical Codex*) je pokazano da je degradacija leka nakon tri dana čuvanja preparata na 4°C i 25 °C bila značajna ( $\geq 10\%$ ), dok su kontrolni uzorci (izrađeni sa samim izoniazidom) ostali pod istim uslovima stabilni nakon 30 dana. Utvrđeno je da je laktoza prisutna u tabletama prouzrokovala brzu degradaciju leka. BPC za *ex tempore* izrađenu suspenziju izoniazida navodi rok upotrebe od 28 dana. Pokazano je da ovaj rok upotrebe važi samo za suspenziju izrađenu od čiste aktivne supstance, ali ne i za suspenziju izrađenu iz tableta. To pokazuje koliko je važno da se vrši procena stabilnosti kada se postojeće formulacije menjaju na bilo koji način (10,23,24).

Prema tome, kada je neophodno da se farmaceutski preparati izrađuju *ex tempore* iz komercijalno dostupnih lekova, najbolje je da se izrađuju prema formulaciji za koju postoje podaci o stabilnosti, koja je procenjena odgovarajućim analitičkim metodama. U preglednom članku koji su Glass i Haywood objavili 2006. godine (10) obrađena su 83 *ex tempore* izrađena tečna farmaceutska preparata iz registrovanih lekova, gdje je pokazano da je samo 7,2% od analiziranih formulacija diskutabilne stabilnosti. Taj relativno mali broj *ex tempore* izrađenih lekova se odnosi na: kaptopril, hidralazin-hidrohlorid, izoniazid, levotiroksin-natrijum, fenoksibenzamin-hidrohlorid i tetraciklin-hidrohlorid. Na osnovu iznetih podataka u ovom radu, kao i brojnih informacija koje se



moгу pronaći u stručnoj literaturi, u Tabeli IV su prikazani korisni izvori informacija o farmaceutskim preparatima za decu.

**Tabela IV** Korisni izvori informacija o farmaceutskim preparatima za decu (2,11,25-30).  
**Table IV** Useful sources of information about pediatric formulations (2,11,25-30).

British National Formulary for Children, British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society, London: Pharmaceutical Press, 2011-2012
Costello I, Long P, Wong I, Tulen C, Yeung V. Pediatric Drug Handling, London: Pharmaceutical Press, 2007
Nahata MC, Pai V. Pediatric drug formulations. 6th ed. Sinsinati: Harvey Whitney Books Co., 2011
Sagraves R. Pediatric Dosing and Dosage Forms, U: Swarbrick J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (3rd ed), London: Informa Healthcare, 2006
Taketomo C, Hodding J, Kraus D. Pediatric dosage handbook (13th ed), Hadson: Lexi-Comp Inc, 2006
Trissel LA. Stability of compounded formulations. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000
Jakševac Mikša M. Magistralni pripravci. Zagreb: Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2008
Jackson M, Lowey A. Handbook of extemporaneous preparation: a guide to pharmaceutical compounding, London: Pharmaceutical Press, 2010
Jew RK, Soo-HooW, Erush SC. Extemporaneous Formulations for Pediatric, Geriatric, and Special Needs Patients. 2nd ed. Bethesda, MD: American Society for Health-System Pharmacists; 2010

Još jedan problem koji postoji u vezi sa *ex tempore* izradom preparata iz komercijalno dostupnih lekova je i nedostatak podataka o biološkoj raspoloživosti aktivne supstance, nakon njihove primene u konačnom (finalnom) obliku koji će se primeniti, a koja može da bude nepredvidiva. Kada se za izradu preparata koriste tablete ili tvrde kapsule sa trenutnim oslobađanjem leka, pretpostavlja se da biološka raspoloživost leka neće biti promenjena. Međutim, pri upotrebi oblika sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, koji ima posebne osobine, treba imati u vidu da se način oslobađanja potpuno menja kada se tableta spravi i od nje izradi tečni oblik kao što je npr. peroralni rastvor ili suspenzija (5,8).

Za većinu *ex tempore* izrađenih preparata ne izvode se farmakokinetičke, farmakodinamičke i studije biološke raspoloživosti zbog visokih troškova i složenosti samog izvođenja studija. Stoga terapiju ovakvim lekovima treba pažljivo nadgledati i pratiti njihovu efikasnost i podnošljivost, kada se primene na ovaj način (8). Problemi izazvani nedostatkom lekova odgovarajućih za primenu kod dece uslovlili su donošenje različitih dokumenata od strane regulatornih agencija. U zemljama članicama Evropske

unije od januara 2007. godine na snazi je Uredba broj 1901/2006 o lekovima za primenu u pedijatriji (31), dok je u SAD donet dokument pod nazivom *Best Pharmaceuticals for Children Act*, usvojen zajedničkim naporima Američke uprave za hranu i lekove (FDA) i Nacionalnog instituta za zdravlje dece (eng. *National Institute of Child Health and Human Development*, NICHD). Ovim putem ovlašćena tela su definisala zahteve koje treba da ispuni 'idealni' farmaceutski preparat koji se primenjuje u pedijatriji: da se primenjuje kao rastvor ili rastvara u ustima; da je bez ukusa; pruža mogućnost podešavanja doze pacijentima najnižih uzrasta; sadrži minimalan broj ekscipijenasa; stabilan je pod uticajem svetlosti, vlage i toplote; kao i da omogućava nesmetano oslobađanje lekovite supstance (32).

## Zaključak

Iako su lekovi za decu još pre više od 30 godina opisani kao „lekovi siročad“, stvari se još uvek nisu značajno promenile. Mnogi lekovi koji se široko upotrebljavaju za lečenje odraslih nisu registrovani za primenu kod dece. Iako se neki od takvih lekova opravdano propisuju, njihova optimalna doza ili učestalost primene kod dece često nije poznata, naročito u prvih nekoliko godina nakon registracije leka za odrasle. U nedostatku registrovanih lekova za primenu u dečijoj populaciji, izrada *ex tempore* preparata je i dalje prisutna u praksi. S obzirom da efikasnost i bezbednost lekova koji nisu namenjeni za lečenje dece nije adekvatno proučena, *ex tempore* izradi tečnih lekovitih oblika treba uvek pristupati sa naročitim oprezom. Iskustva nakon primene *ex tempore* izrađenih farmaceutskih preparata u bolnicama treba da budu zabeležena u literaturi što bi omogućilo izradu vodiča za optimalnu primenu lekova u pedijatrijskoj populaciji.

U radu su, između ostalog, prikazani podaci o *ex tempore* izradi odabranih peroralnih tečnih farmaceutskih preparata za decu, preporučenim vehikulumima, uslovima čuvanja i rokovima upotrebe, kao i korisni izvori informacija o farmaceutskim preparatima za decu.

## Literatura

1. Jew RK, Mullen RJ, Soo-Hoo W. Extemporaneous formulations. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, Inc, 2003.
2. Jakševac Mikša M, ed. Magistralni pripravi. Zagreb: Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2008.
3. Nahata MC, Allen LV. Extemporaneous Drug Formulations. Clin Ther. 2008;30(11):2112-9.
4. Pokrajac M. Farmakokinetika. Beograd: Grafolik, 2002.
5. Standing JF, Tuleu C. Paediatric formulations – Getting to the heart of the problem. Int J Pharm. 2005;300:56-66.
6. International Conference on Harmonisation. The guideline on clinical investigation of medicinal products in the paediatric population. CPMP/ICH/2711/99. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Efficacy/E11/Step4/E11\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E11/Step4/E11_Guideline.pdf)
7. European Medicines Agency. Reflection paper: Formulations of choice for the paediatric population. London, 2006.

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003782.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003782.pdf)

8. Patel VP, Desai TR, Chavda BG, Katira RM. Extemporaneous dosage form for oral liquids. *Pharmacophore*. 2011;2(2):86-103.
9. Registar lijekova Bosne i Hercegovine. Agencija za lijekove i medicinska sredstva Bosne i Hercegovine, 2012.
10. Glass BD, Haywood A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2006;9(3):398-426.
11. Jackson M, Lowey A. *Handbook of extemporaneous preparation: a guide to pharmaceutical compounding*. 1st. ed. London: Pharmaceutical Press, 2010.
12. Nunn AJ. Making medicines that children can take. *Arch Dis Child*. 2003;88:369-71.
13. Woods DJ. Extemporaneous formulations of oral liquids - a guide. <http://www.pharminfotech.co.nz/manual/Formulation/extemprep.pdf> (poslednji pristup 13.03.2012.)
14. Kairuz TE, Gargiulo D, Bunt C, Garg S. Quality, safety and efficacy in the „off-label” use of medicines. *Curr Drug Saf*. 2007;2(1):89-95.
15. Sam T. New dosage forms and devices for children. 8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul, 19-22. mart 2012.
16. Guideline on Pharmaceutical Development of Medicines for Paediatric Use (Draft). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), EMA/CHMP/QWP/180157/2011.
17. The United States Pharmacopoeia 30, The National Formulary 25, Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.
18. Freed AL, Silbering SB, Kolodsick KJ, Rossi DT, Mahjour M, Kingsmill CA. The development and stability assessment of extemporaneous pediatric formulations of Accupril. *Int J Pharm*. 2005;304(1-2):135-44.
19. Pawar S, Kumar A. Issues in the formulation of drugs for oral use in children: Role of excipients. *Pediatr Drugs* 2002;4(6):371-9.
20. World Health Organisation. Training workshop. Pharmaceutical excipients – an overview including considerations for paediatric dosing. 2010 June 21-25; Beijing. [http://apps.who.int/prequal/trainingresources/pq\\_pres/workshop\\_China2010/english/22/002-Excipients.pdf](http://apps.who.int/prequal/trainingresources/pq_pres/workshop_China2010/english/22/002-Excipients.pdf)
21. Stoltenberg I, Winzenburg G, Breitreutz J. Solid dosage forms for children – formulations, excipients and acceptance issues. *European Industrial Pharmacy*. 2011;8(2):4-7.
22. Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare USA Inc, 2007.
23. Haywood A, Glass B. Paediatric mixtures. *Australian Pharmacist*. 2010;29(4):316
24. Lund W. *The Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics*. 12th ed. London: Pharmaceutical Press, 1994.
25. *British National Formulary for Children*, British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society, London: Pharmaceutical Press, 2011-2012.
26. Costello I, Long P, Wong I, Tulen C, Yeung V. *Pediatric Drug Handling*. London: Pharmaceutical Press, 2007.
27. Nahata MC, Pai V. *Pediatric drug formulations*. 6th ed. Sinsinati: Harvey Whitney Books Co, 2011.
28. Takemoto C, Hodding J, Kraus D. *Pediatric dosage handbook*. 13th ed. Hadson: Lexi-Comp Inc, 2006.
29. Trissel LA. *Stability of compounded formulations*. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

30. Jew RK, Soo-Hoo W, Erush SC. Extemporaneous Formulations for Pediatric, Geriatric, and Special Needs Patients. 2nd ed. Bethesda, MD: American Society for Health-System Pharmacists, 2010.
31. Regulation No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council on medicinal products for paediatric use, Strasbourg, 12. decembar 2006.
32. Best Pharmaceuticals for Children Act, Pediatric Formulation Initiative Working Meeting, Inter-Agency Agreement between the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) and the FDA, Bethesda, 2007.

## **Liquid extemporaneous pharmaceutical preparations for pediatric patients**

**Bubić Pajić Nataša<sup>1\*</sup>, Pantelić Ivana<sup>2</sup>, Savić Snežana<sup>2</sup>,  
Vuleta Gordana<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Medicine – studies of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Save Mrkalja 14, Banja Luka

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

---

### **Summary**

Many drugs used for the treatment of babies and children are not available in the market in dosage forms appropriate for this population. Moreover, a considerable number of these drugs are not registered for pediatric use. Since liquid oral dosage forms are considered most acceptable for children, if not available in the market, they can be extemporaneously prepared from available registered drug preparations. Preparation of such liquid oral dosage forms from solid dosage forms demands meticulous consideration of many factors, such as physicochemical characteristics of both active substances and excipients, along with drug-excipient and excipient-excipient compatibility. When deciding on a formulation, the one with literature background concerning stability data, recommended expiry date, expected bioavailability, efficacy and tolerability of the *ex tempore* prepared drug should preferably be selected. Many regulatory bodies have recognized the importance of these issues, and introduced suitable guidelines such as Regulation of the EU No 1901/2006 that became mandatory on 1.1.2007., with the purpose to make pediatric drugs more available, as well as to ascertain the preparation of drugs of outmost quality, having in mind that extemporaneous drugs are not submitted through preclinical and clinical trails.

**Key words:** extemporaneous drug preparation, pediatric dosage forms, liquid pharmaceutical preparations, oral application

---

## **Prilozi - Contributions**

### **Izveštaj sa 57. simpozijuma Saveza farmaceutskih udruženja Srbije**

*Naziv stručnog skupa: 57. simpozijum SFUS*

Organizator: Savez farmaceutskih udruženja Srbije

Vreme i mesto: Vrnjačka Banja, 20-22. oktobar 2011.

**Kursevi se održavaju u** kongresnoj dvorani, Kongresni centar „Zvezda”

21.10.2011

#### **Kurs 1.**

#### **Gojaznost - prevencija i lečenje globalne epidemije**

Rešenje broj:153-02-278/2011-01 od 16.08.2011

Oznaka kursa: B-309/11

Broj bodova za predavače: 12

Broj bodova za slušaoce: 6

Ciljevi kursa:

1. Sagledavanje značaja epidemioloških podataka za gojaznost
2. Upoznavanje sa lekovima koji utiču na povećan apetit i izazivaju gojaznost
3. Upoznavanje sa savetovanjem gojaznih pacijenata o promeni načina života i primeni balansirane dijetete
4. Upoznavanje sa uticajem gojaznosti na farmakokinetiku lekova
5. Upoznavanje sa primenom biljnih proizvoda za regulaciju povećane telesne mase

## PROGRAM KURSA 1.

Moderator: Radica Stepanović Petrović

Satnica	Tema	Metod obuke	Predavač
08.30 - 09.00	Epidemiologija, dijagnostika i osnovni principi u terapiji gojaznosti	predavanje	Prof. dr Draga Plečaš
09.00 - 9.30	Dobro balansirana dijeta u regulisanju telesne mase	predavanje	Doc. dr Brižita Đorđević
9.30 - 10.00	Uticao lekova na apetit i telesnu masu	predavanje	Prof. dr Radica Stepanović Petrović
10.00 - 10.30	Gojaznost kao faktor farmakokinetičke varijabilnosti	predavanje	Doc. dr Sandra Vezmar Kovačević Asist. dr sci. Katarina Vučićević
10.30 - 11.00	Primena biljnih proizvoda za regulaciju povećane telesne mase	predavanje	Prof. dr Nada Kovačević, Doc. dr Tatjana Kundaković
11.00 - 12.00	Diskusija		
12.00 –13.00	Pauza za ručak		
13.00 –15.00	Tema radionice: Proizvodi namenjeni za regulaciju telesne mase na tržištu – prikaz i kritički osvrt	radionica	Doc. dr Tatjana Kundaković Prof. dr Ivan Stanković Doc. dr Brižita Đorđević
15.00 –15.30	test Evaluacija kursa		

### **Predavanje po pozivu**

Petak, 21.10.2011.

Kongresna dvorana Hotel „Zvezda”

17.00-18.00 **Farmaceutska komora Srbije**

Apotekarski sektor Srbije danas

22.10.2011.

### **Kurs 2.**

**Aktivnosti i odgovornost farmaceuta u savremenoj terapiji i kontroli dijabetesa**

Rešenje broj:153-02-278/2011-01 od 16.08.2011

Oznaka kursa: B-310/11

Broj bodova za predavače: 12

Broj bodova za slušaoc: 6

Ciljevi kursa

1. Sagledavanje značaja epidemioloških podataka za dijabetes
2. Upoznavanje sa savremenim aspektima terapije dijabetesa
3. Upoznavanje sa koracima u sprovođenju farmaceutske zdravstvene zaštite u terapiji dijabetesa
4. Upoznavanje farmaceuta sa strukturiranim pristupom samokontroli
5. Upoznavanje sa neželjenim dejstvima lekova koji se koriste u terapiji dijabetesa

## PROGRAM KURSA 2.

Moderator: Miroslav Savić

Satnica	Tema	Metod obuke	Predavač
08.30 - 09.00	Dijabetes, dijagnostikovanje i epidemiologija	predavanje	Doc. dr Katarina Lalić
09.00 - 9.30	Farmakologija insulina	predavanje	Prof. dr Nenad Ugrešić
9.30 - 10.00	Farmakologija oralnih hipoglikemijskih lekova	predavanje	Prof. dr Miroslav Savić
10.00 - 10.30	Farmaceutska zdravstvena zaštita u terapiji dijabetesa	predavanje	Doc. dr Sandra Vezmar Kovačević Prof. dr Branislava Miljković
10.30 - 11.00	Farmakovigilanca lekova u terapiji dijabetesa	predavanje	Dipl. farm. spec. Tatjana Šipetić
11.00 - 12.00	Diskusija		
12.00 –13.00	Pauza za ručak		
13.00 –15.00	U toku radionice biće obuhvaćeni praktični aspekti insulinske terapije, strukturirani pristup samokontroli terapije dijabetesa, upravljanje kvalitetom u apoteci – prijemom, skladištenjem i čuvanjem insulina.	radionica	kolege iz prakse Dipl. farm. spec. Milana Dučić Dipl. farm. spec. Jelena Milošević Dipl. farm. spec. Tatjana Mikić Dipl. farm. spec. Mirjana Knjeginjić Dipl. farm. Nada Šarik
15.00 –15.30	test Evaluacija kursa		

Svi radovi su objavljeni u časopisu Arhiv za farmaciju 4/2011

Simpozijumu je prisustvovalo **390** učesnika, od kojih **316** sa uplaćenom kotizacijom.

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

Posebnu zahvalnost dugujemo članovima sekcije Mladi farmaceuti:

*Valentini Gnjiđić, Katarini Irić, Katarini Jokićević i Mariji Milutinović*, za veliku pomoć u distribuciji štampanog materijala, registraciji učesnika, izdavanju uverenja.

Zahvaljujemo 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 57. SIMPOZIJUMU

UKUPNO REGISTROVANIH UČESNIKA 316

### (1) Šta Vas je opredelilo da dođete na Simpozijum?

1. Tema	83
2. Bodovi	39
3. Predavači	4
4. Mesto održavanja	8
5. Edukacija	6
6. Druženje	24
<b>Ukupno</b>	<b>164</b>
<b>Nije odgovorilo</b>	<b>67</b>

### (2) Šta vam se najviše dopalo?

1. Tema i predavanja	61
2. Predavači	14
3. Radionica	4
4. Organizacija	10
5. Druženje	3
6. Štandovi	12
<b>Ukupno</b>	<b>104</b>
<b>Nije odgovorilo</b>	<b>127</b>

### (3) Šta Vam se nije dopalo?

1. Sala	1
2. Organizacija	1
3. Konceptija predavanja	2
4. Malo praktičnih predavanja, više teorije	2
<b>Ukupno</b>	<b>6</b>
<b>Nije odgovorilo</b>	<b>225</b>

### (4) Da li imate neke primedbe na „Zbornik radova“?

1. nema primedbi

**OCENE PREDAVAČA - KURS 1**

PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	RANG
DRAGA PLEČAŠ	103	74	29	9	3	4,22	8
BRIŽITA ĐORĐEVIĆ	115	69	27	10	3	4,26	7
RADICA STEPANOVIĆ	190	23	10	1	1	4,78	1
SANDRA VEZMAR	137	70	14	0	1	4,54	3
NADA KOVAČEVIĆ	167	42	11	1	1	4,68	2
NADA KOVAČEVIĆ- Radionica	99	60	13	3	2	4,42	4
IVAN STANKOVIĆ Radionica	110	66	14	4	4	4,38	6
BRIŽITA ĐORĐEVIĆ Radionica	116	64	15	2	5	4,41	5

Registrovanih učesnika: **316**

Opšta ocena Kurasa 1: **4,3**

**OCENE PREDAVAČA - KURS 2**

PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	RANG
KATARINA LALIĆ	160	40	7	2	0	4,71	3
NENAD UGREŠIĆ	183	25	3	0	0	4,85	1
MIROSLAV SAVIĆ	170	28	10	0	0	4,77	2
SANDRA VEZMAR	148	44	6	1	0	4,70	4
TATJANA ŠIPETIĆ	118	52	10	5	1	4,51	8
MILANA DUČIĆ	146	51	9	4	0	4,61	7
JELENA MILOŠEVIĆ	149	48	10	4	0	4,62	6
TATJANA MIKIĆ	148	49	10	3	0	4,63	5
MIRJANA KNJEGINJIĆ	148	51	9	3	0	4,63	5
NADA ŠARIK	145	48	9	4	0	4,62	6

Registrovanih učesnika: **316**

Opšta ocena Kurasa 2: **4,45**

## 57. SIMPOZIJUM SFUS - PREDLOG TEMA

hipertenzija	oboljenja štitne žlezde
terapija u trudnoći	astma, bronhitis
antikoagulantni lekovi	interakcije lekova
prevencija moždanog udara	bolesti zavisnosti
anoreksija	alergije
hormoni	venska insuficijencija
neracionalna primena antibiotika	kontracepcija
kardiovaskularne bolesti	homeopatija u pedijatriji
autoimune bolesti	biljni antidepresivi
terapija kožnih bolesti	farmaceutski otpad
prevencija karcinoma dojke i materice	teme iz psihijatrije
terapija depresije	citostatici
karcinom pluća	reumatizam
oftalmološka terapija	imunitet
homeopatija	osteoporoza

Beograd, 1.11.2011.

Stručni i Organizacioni odbor 57. simpozijuma SFUS

**SPISAK RECENZENATA RADOVA**  
**objavljenih u Arhivu za farmaciju u toku 2011. godine**

	<b>Ime i prezime recenzenta</b>	<b>Ustanova</b>
1.	Doc. dr Anđelija Malenović	Farmaceutski fakultet u Beogradu
2.	Prof. dr Biljana Antonijević	Farmaceutski fakultet u Beogradu
3.	Prof. dr Bosiljka Plećaš	Farmaceutski fakultet u Beogradu
4.	Prof. dr Branislava Miljković	Farmaceutski fakultet u Beogradu
5.	Prof. dr Danica Agbaba	Farmaceutski fakultet u Beogradu
6.	Dr. sci Dragan Đurović	Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije
7.	Doc. dr Dragana Vasiljević	Farmaceutski fakultet u Beogradu
8.	Prof. dr Dubravko Bokonjić	Vojnomedicinska akademija
9.	Prof. dr Elka Stefanova	Medicinski fakultet u Beogradu
10.	Prof. dr Gordana Vuleta	Farmaceutski fakultet u Beogradu
11.	Dr. sci Igor Popović	Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije
12.	Dr. sci Ivana Aljančić	Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
13.	Prof. dr Jela Milić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
14.	Prof. dr Katarina Karljković-Rajić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
15.	Dr. sci Katarina Nikolić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
16.	Doc. dr Katarina Vučković	Farmaceutski fakultet u Beogradu
17.	Doc. dr Maja Tomić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
18.	Prof. dr Marija Primorac	Farmaceutski fakultet u Beogradu
19.	Dr. sci Milica Pešić	Biološki fakultet u Beogradu
20.	Van. prof. Miroslav Savić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
21.	Prof. dr Nada Kovačević	Farmaceutski fakultet u Beogradu
22.	Doc. dr Nataša Bogavac	Farmaceutski fakultet u Beogradu
23.	Dr. sci Olivera Laban-Božić	Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije
24.	Prof. dr Radica Stepanović-Petrović	Farmaceutski fakultet u Beogradu
25.	Doc. dr Rada Baošić	Hemijski fakultet u Beogradu
26.	Doc. dr Sandra Kovačević	Farmaceutski fakultet u Beogradu
27.	Prof. dr Silva Dobrić	Vojnomedicinska akademija
28.	Prof. dr Silvana Petrović	Farmaceutski fakultet u Beogradu
29.	Prof. dr Slađana Šobajić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
30.	Doc. dr Slavica Erić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
31.	Prof. dr Slobodanka Tamburić	College of Fashion, University of the Arts, London
32.	Doc. dr Snežana Savić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
33.	Prof. dr Sonja Vesić	Medicinski fakultet u Beogradu
34.	Prof. dr Sonja Vučković	Medicinski fakultet u Beogradu
35.	Prof. dr Sote Vladimirov	Farmaceutski fakultet u Beogradu
36.	Van. prof. Svetlana Ibrić	Farmaceutski fakultet u Beogradu
37.	Doc. dr Veselin Maslak	Hemijski fakultet u Beogradu
38.	Doc. dr Zorica Bulat	Farmaceutski fakultet u Beogradu

**Najsrdajnije zahvaljujemo svim recenzentima!**

**U ARHIVU ZA FARMACIJU 6/2011 GREŠKOM JE OBJAVLJENO  
DA SU RADOVI AUTORA:**

- **Smilja Matijašević, Miroslav M. Savić**

Lekovi za retke bolesti: primer modifikovane glukocerebrozidaze  
Drugs for rare diseases: an example of modified glucocerebrosidase

i

- **Nada Kovačević, Tatjana Kundaković**

Mogućnost primene biljnih droga i sastojaka biljaka za regulaciju povećane  
telesne mase

Herbal drugs and herbal substances for regulation of the body weight

**obeleženi kao pregledni, a pripadaju kategoriji stručni radovi.**

# ARHIV ZA FARMACIJU

2011, Vol 61, N° 6

## SADRŽAJ – CONTENTS

### **Pregledni radovi – Review articles**

- Jelena Parojčić, Aleksandra Stojković, Zorica Đurić 539

Biofarmaceutski aspekti interakcije ciprofloksacina i jona metala  
Biopharmaceutical aspects of ciprofloxacin interactions with metallic ions

### **Stručni radovi - Professional papers**

- Smilja Matijašević, Miroslav M. Savić 558

Lekovi za retke bolesti: primer modifikovane glukocerebrozidaze  
Drugs for rare diseases: an example of modified glucocerebrosidase

- Nada Kovačević, Tatjana Kundaković 570

Mogućnost primene biljnih droga i sastojaka biljaka za regulaciju povećane telesne mase

Herbal drugs and herbal substances for regulation of the body weight

### **Prilozi – Contributions**

- Spisak recenzenata radova 585

### **Obaveštenja – Information**

- Uputstvo za autore 587

- Instructions to authors 533

# Lekovi za retke bolesti: primer modifikovane glukocerebrozidaze

Smilja Matijašević<sup>1</sup>, Miroslav M. Savić<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Klinički centar Srbije, Služba za farmaceutsku delatnost i snabdevanje, Pasterova 2, Beograd

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakologiju, Vojvode Stepe 450, Beograd

---

## Kratak sadržaj

Do danas je definisano oko 5000 retkih bolesti, od kojih u zbiru boluje približno 6% populacije. Razvoj lekova za retke bolesti suočen je sa ograničenim znanjima o njima i otežanim obezbeđivanjem pacijenata za klinička ispitivanja. Dodatno, farmaceutska industrija nema jasan ekonomski motiv da investira u ova istraživanja. Ipak, podsticajna regulativa, uvedena u SAD 1983. godine, a u Evropskoj uniji 1999. godine, doprinela je da više od 200 retkih bolesti dobije specifično razvijene lekove. Mnogi među njima imaju veliku molekulska masu i dobijeni su rekombinantnom biotehnologijom. Ovo je i primer modifikovane glukocerebrozidaze, koja obezbeđuje enzimsku supstituciju kod Gaucher-ove bolesti. Naime, u poređenju sa prirodnim enzimom, modifikacija terminalnih ostataka bočnih glikozilovanih lanaca enzima, na način da sadrže manozu, obezbeđuje specifično prepoznavanje enzima od strane makrofaga i kliničku delotvornost kod oblika bolesti bez neuroloških deficita. Nakon algluceraze, koja je dobijana iz placenti i stoga bila teško dostupna, razvijeni su imigluceraza kao standardni lek, a zatim i velagluceraza alfa i taligluceraza alfa, koji uz sigurnije snabdevanja tržišta u uslovima eventualnih proizvodnih akcidenata mogu da obezbede i smanjenje cene terapije.

**Ključne reči:** lekovi-siročići; Gaucher-ova bolest; imigluceraza; velagluceraza alfa; taligluceraza alfa

---

\* Autor za korespondenciju: Dr Miroslav M. Savić, Tel.:+381-11-3951280  
Fax: +381-11-3972840, E-mail adresa: miroslav@pharmacy.bg.ac.rs

# Mogućnost primene biljnih droga i sastojaka biljaka za regulaciju povećane telesne mase

Nada Kovačević\*, Tatjana Kundaković

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakognoziju,  
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

---

## Kratak sadržaj

U tretmanu gojaznosti, najvažniji cilj je smanjiti unos hranljivih materija i/ili povećati potrošnju energije. Postoje različiti načini kako se to može postići: smanjenje apetita, uzimanje manje količine hrane ili hrane sa manjom nutritivnom (energetskom) vrednošću. Takođe, moguće je i smanjiti apsorpciju hranljivih sastojaka iz digestivnog trakta.

Hrana sa više dijetnih vlakana (povrće, voće), ili proizvodi sa derivatima celuloze, pektinom, biljnim sluzima ili gumama (agensi koji povećavaju zapreminu) mogu da utiču na zapreminu hrane koja se uzima tokom obroka. To se događa zbog osobine ovih sastojaka da bubre u želucu i crevima i daju osećaj sitosti. S druge strane, veći deo ovih materija se sastoji iz nesvarljivih ugljenih hidrata, što utiče na volumen i skraćuje vreme zadržavanja sadržaja u crevima. Sredstva za povećanje zapremine imaju mali efekat na transport u tankom crevu, ali utiču na transport u kolonu. Pored toga, polisaharidi iz biljaka se mogu delimično rastvoriti u vodi i formirati viskoznan rastvor, koji će obložiti intestinalnu sluznicu i smanjiti resorpciju hranljivih sastojaka iz hrane. Dalje, za regulaciju telesne mase, mogu biti korišćeni stimulatívni laksansi (biljne droge sa antranoidima). Koriste se same ili sa drugim biljnim drogama koje poboljšavaju varenje, ali i sa diureticima. Veliki broj biljnih čajeva, instant čajeva ili kapsula sa ovakvom kombinacijom sastojaka može se naći na tržištu. Upotreba ovakvih proizvoda, u kombinaciji sa niskokaloričnom ishranom, može biti efikasna, ali nekontrolisana i duga primena donosi određene opasnosti (npr. disbalans elektrolita).

Neki prirodni proizvodi i preparati se mogu koristiti za ubrzavanje metaboličkih procesa, naročito metabolizma lipida (povećavaju termogenezu). U poslednje vreme, proizvodi sa kofeinom, efedrinom, bromelainom, lecitinom ili karnitinom, veoma su popularni kao dodatak tretmanu za regulaciju telesne mase. Nova istraživanja pokazuju da neka prirodna jedinjenja (*cis* izomer gugalsterona) mogu ispoljiti efekat na mršavljenje inhibicijom diferencijacije preadipocita, indukujući apoptozu, kao i ubrzavajući lipolizu razvijenih adipocita.

Određeni biljni proizvodi umanjuju apetit (droge sa taninima, velike količine gorkih materija...) tako što deluju na sluznicu želuca. U poslednje vreme, međutim, mnogo više se govori o supstancama prirodnog porekla koje mogu da smanje apetit centralnim delovanjem i utiču na osećaj sitosti i gladi. Neke od tih supstanci se mogu naći u nekim cvetovima i plodovima (hidroksilimunska kiselina, *p*-sinefrin) ili u nekim masnim uljima (pinolenska kiselina iz semena *Pinus koraiensis*) i mogu se bezbedno koristiti u tačno određenim dozama. Neka druga jedinjenja su veoma moćna sredstva za supresiju apetita tako što deluju na hipotalamus (steroidni glukozidi iz *Hoodia sp.*) sa nedovoljnom potvrdom o bezbednosti primene u tretmanima za gubitak mase koje planira sam korisnik.

**Ključne reči:** gojaznost, sastojci biljaka, uticaj na varenje i resorpciju, uticaj na metaboličke procese, smanjenje apetita.

---

\* Kovačević N., Tel. +381113951399; Fax. +381113972840;  
E-mail. [nada.kovacevic@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:nada.kovacevic@pharmacy.bg.ac.rs).