

## **Polne razlike u kliničkoj slici i terapiji multiple skleroze**

**Mirjana Nacka-Aleksić\***

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

\*Autor za korespondenciju, e-mail: mnacka@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: +381 11 3951209)

---

### **Kratak sadržaj**

Multipla skleroza (MS) se češće javlja kod žena nego kod muškaraca i disproporcija između obolevanja žena i muškaraca od ove bolesti pokazuje tendenciju stalnog rasta. Pol ima kritičnu ulogu u razvoju, progresiji, kliničkim manifestacijama MS i odgovoru na terapiju. Ove razlike su, najverovatnije, posledica delovanja genetskih, epigenetskih i hormonskih faktora, razlika u izloženosti pojedinim sredinskim faktorima, kao i bioloških razlika između imunskog i nervnog sistema žena i muškaraca. Polne razlike u svim ovim aspektima se moraju uzeti u obzir prilikom dizajniranja i tumačenja rezultata istraživanja vezanih za patogenezu MS, a posebno prilikom razvoja novih terapijskih strategija i kliničkih istraživanja lekova namenjenih lečenju ove bolesti. Razumevanje mehanizama koji stoje u osnovi polnih razlika u patogenezi i/ili odgovoru na terapiju u MS bi moglo biti relevantno i za širi spektar autoimunskih bolesti u kojima je izražen polni dimorfizam u incidenci i prevalenci i/ili kliničkim manifestacijama bolesti.

**Ključne reči:** polne razlike, multipla skleroza, DMT

---

## **Polne razlike u autoimunskim bolestima**

Epidemiološki podaci ukazuju da su incidenca i prevalenca autoimunskih bolesti u svetu u kontinuiranom porastu (1). Procenjuje se da približno 78% svih obolelih od autoimunskih bolesti čine žene (2). Žene češće obolevaju od organ-specifičnih autoimunskih bolesti, kao što su Graves-Basedowljeva bolest, Hashimoto tireoiditis, multipla skleroza (MS), ali i od generalizovanih autoimunskih bolesti (npr. sistemski eritematozni lupus) (3). Iako osnova ovog biološkog fenomena nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da bi polno specifične razlike u imunskim funkcijama mogle da budu od značaja (4). Imunski sistem žena i muškaraca (5), kao i većine životinjskih vrsta (6) se značajno razlikuju. Generalno, jedinke ženskog pola karakteriše veća imunska reaktivnost, što se ogleda u efikasnijem imunskom odgovoru u infektivnim i pojedinim neinfektivnim bolestima (7,8). Pored polnih razlika u efikasnosti protektivnog imunskog odgovora, pokazane su polne razlike i u aberantnom imunskom odgovoru (3,4). Žene imaju 1,7 puta više T-ćelija specifičnih za sopstvene antigene nego muškarci (9), što verovatno doprinosi većoj incidenci i prevalenci autoimunskih bolesti kod žena.

## **Uticaj genetskih, sredinskih i hormonskih faktora na polne razlike u etiopatogenezi MS**

MS je hronična, inflamatorna, demijelinizirajuća bolest centralnog nervnog sistema (CNS) i jedna od najčešćih organ-specifičnih autoimunskih bolesti. Pored toga, MS je najčešća neurološka bolest i najčešći uzrok onesposobljenosti mladih odraslih osoba (10). Karakteriše je postojanje jasno ograničenih polja demijelinizacije (plakovi) u kojima je, u aktivnoj fazi bolesti, prisutan inflamatorni infiltrat koji se sastoji od CD4+ i CD8+ T-limfocita, B-limfocita, makrofaga i aktivisanih ćelija mikroglije (11). Lezije su diseminovane u beloj masi mozga i kičmene moždine, što dovodi do pojave različitih neuroloških ispada. Klinički tok MS i njeni simptomi su takođe heterogeni, odražavajući razlike u vremenskoj i prostornoj diseminaciji lezija u CNS-u. Najčešću formu MS (85% obolelih) karakteriše inicijalna epizoda neurološkog deficita praćena periodom poboljšanja (remisija), posle čega slede naizmenične smene pogoršanja (relapsa) i remisija (relapsno-remitentni oblik MS, RRMS) (11). Vremenom, neurološka oštećenja se akumuliraju i oko 80% obolelih razvija sekundarno progresivni oblik MS (SPMS) (11). Umesto karakterističnih inflamatornih lezija, javlja se neurodegeneracija, atrofija tkiva i gubitak aksona, što se klinički manifestuje ireverzibilnim neurološkim deficitom.

Tačan uzrok MS je još uvek nepoznat a mehanizmi nastanka nedovoljno razjašnjeni. Smatra se da se bolest javlja kod genetski predisponiranih osoba, a penetraciju bolesti omogućavaju različiti stohastički i sredinski faktori (12). Razvoj MS je usko povezan sa prevalencom specifičnih polimorfizama HLA gena, a posebno HLA-

DRB1 alela, koji se smatra najznačajnijim genetskim faktorom rizika za razvoj MS (13). Neki od rizičnih HLA alela (DRB1\*1501) se češće nalaze kod osoba ženskog pola (14), što bi se moglo povezati sa većom incidencom MS kod žena. Polimorfizam gena koji kodiraju  $\alpha$ -lanac receptora za IL-2 i IL-7, takođe može imati ulogu u obolevanju od MS (12,15). Pokazano je da su rizični polimorfizmi i ovih gena češći kod žena nego kod muškaraca obolelih od MS (16). Genetski faktori, osim što utiču na predispoziciju za obolevanje od MS, mogu da budu determinativni i za težinu bolesti, utičući na patogenetske mehanizme oštećenja, ali i na osetljivost nervnog tkiva na oštećenje i/ili njegov reparatorni kapacitet (17). Budući da je ekspresija gena koji su potencijalno odgovorni za osetljivost ćelija na oštećenje u mozgu polno dimorfna (18,19), može se zaključiti da su genetski faktori važni ne samo za polne razlike u obolevanju od MS, već i za polne razlike u težini bolesti.

Pored genetskih, sredinski faktori imaju važnu ulogu u razvoju MS (20). Aberantnu aktivaciju neuroantigen-specifičnih T- i B-limfocita najčešće uzrokuju virusi (Epstein–Barr virus, humani herpes virus tip 6, kao i retrovirusi) (21). Osim virusnih infekcija, geografska širina, izlaganje određenim ksenobiotcima, pušenje, dijeta i deficit vitamina D značajno koreliraju sa obolevanjem od MS (22,23,24). Pretpostavlja se da su polne razlike u izloženosti ili osetljivosti na delovanje sredinskih faktora, kao i promena načina života kod žena u proteklih 50 godina, odgovorni za porast incidence MS kod žena (25,26), s obzirom na to da se genetski „makeup” populacije kroz generacije smatra stabilnim (27). U prilog toj pretpostavci ide i zapažanje da se polne razlike u obolevanju od MS gube sa promenom izloženosti određenim sredinskim faktorima (25).

Pored genetskih i sredinskih faktora, smatra se da bi za polni dimorfizam u razvoju MS mogli biti važni i hormoni, pre svega polni dimorfizam u koncentraciji polnih steroida. O značaju ženskih gonadnih hormona za patogenezu MS govore i podaci koji ukazuju na značajnu povezanost između odnosa koncentracije progesterona i estradiola tokom lutealne faze menstrualnog ciklusa i broja i zapremine lezija kod žena sa MS (28). Takođe, poznato je da u graviditetu dolazi do remisije bolesti, posebno u drugom i trećem trimestru, kada su koncentracije cirkulišućih estrogena i progesterona veoma visoke (29). Prilikom razmatranja uloge polnih hormona u patogenezi MS, moraju se uzeti u obzir i polne razlike u ekspresiji receptora za polne steroidne hormone, ne samo u/na imunskim ćelijama (30), nego i ćelijama CNS-a (31). Osim toga, treba imati u vidu da polni steroidni hormoni i njihovi metaboliti mogu uticati na težinu neuroinflamacije i stepen oštećenja ciljnog tkiva ne samo posredstvom receptora za polne hormone, već i drugih tipova receptora (32,33). Naime, gonadni i lokalno sintetisani steroidni hormoni i njihovi metaboliti mogu da ostvaruju brze, negenomske efekte u CNS-u, interakcijom sa ligand-zavisnim jonskim kanalima (npr. GABA<sub>A</sub> receptori) i drugim membranskim receptorima (34,35,36).

## **Polne razlike u epidemiološkim i kliničkim karakteristikama MS**

Kao što je već rečeno, MS se češće javlja kod žena nego kod muškaraca (37). Aproksimativno, na tri obolele žene dolazi jedan muškarac (37). Tokom poslednjih 50 godina uočen je trend stalnog povećanja prevalencije MS kod žena u odnosu na muškarce (38), što bi moglo da ukazuje na veće povećanje učestalosti bolesti u ženskoj populaciji. Međutim, ova disproporcija između žena i muškaraca bi mogla biti posledica manjeg porasta obolevanja muškaraca, njegove stagnacije ili čak smanjenja tokom istog perioda, na šta ukazuju pojedine studije (39). Pored toga, prvi simptomi se kod žena javljaju se u nešto ranijem uzrastu u poređenju sa muškarcima (40).

Osim na prevalenciju, pol utiče i na klinički tok, težinu i simptomatologiju MS (37,41). Naime, iako su žene podložnije obolevanju od MS, one češće imaju benigniji tok bolesti (RRMS), dok muškarci češće boluju od MS sa primarno progresivnim tokom (PPMS) (14). Pored toga, kod muškaraca se brže nego kod žena razvija teška onesposobljenost (42,43). S druge strane, žene pokazuju predispoziciju za češću pojavu relapsa, ali je oporavak posle ataka bolji u odnosu na muškarce (44,45). Bolest se kod žena češće inicijalno manifestuje senzornim, a kod muškaraca cerebelarnim simptomima ili poremećajima funkcije moždanog stabla (46). Motorni simptomi se češće javljaju kod muškaraca i udruženo sa kasnijim početkom bolesti (47). Kognitivni poremećaji su takođe češći i teži kod muškaraca (48), dok su senzitivni simptomi, kao što su bolni sindromi (neuralgija n. trigemina, periferni neuropatski bol), češći kod žena (49). S druge strane, i žene i muškarci osećaju zamor i fizičku slabost sa sličnom učestalošću (50,51). Osećaj kognitivne iscrpljenosti je takođe slično zastupljen kod žena i muškaraca (52).

Slično kao kod MS, polne razlike u incidenciji i težini bolesti pokazane su i u najzastupljenijem animalnom modelu MS - eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (53,54).

## **Polne razlike u terapiji MS**

Usled velike patogenetske i kliničke heterogenosti MS, njeno lečenje predstavlja veliki izazov. Rano otpočinjanje terapije koja modifikuje tok bolesti (*engl.* disease modifying therapy, DMT) je neophodno kako bi se redukovao broj relapsa i neurološki deficiti i sprečila ili odložila progresija onesposobljenosti. Imajući u vidu prethodno opisane faktore koji utiču na polne razlike u patogenezi, toku i simptomatologiji MS, moglo bi se pretpostaviti da bi se ove polne razlike odrazile i na odgovor na terapiju MS. Međutim, polne razlike u odgovoru na DMT za MS su ispitivane samo u malom broju studija, najčešće na nedovoljno velikim uzorcima (55,56) i sa konfliktnim rezultatima. Smatra se da su glavna prepreka za velike kliničke studije u kojima bi se ispitivale polne razlike u odgovoru na DMT veliki finansijski zahtevi ovakvih studija

(57). Kao mogući razlog za konfliktne rezultate randomiziranih kontrolisanih studija navodi se nepostojanje objektivnih prediktivnih biomarkera terapijskog odgovora (58).

Prvi lekovi iz grupe DMT za koje je dokazana uspešnost (*engl.* evidence based) u terapiji MS su interferon (IFN)- $\beta$ 1b za supkutanu primenu, IFN- $\beta$ 1a za intramuskularnu primenu, IFN- $\beta$ 1a za supkutanu primenu i glatiramer acetat (GA) (58). Mehanizmi kojima IFN- $\beta$ 1 ostvaruje svoje efekte nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se smatra da oni, između ostalog, uključuju: inhibiciju aktivacije i proliferacije T-ćelija, apoptozu autoreaktivnih T-ćelija, indukciju diferencijacije regulatornih T-ćelija, inhibiciju migracije leukocita kroz krvno-moždanu barijeru, modulaciju delovanja citokina i antivirusnu aktivnost (59). Studija u kojoj je kohorta od 2570 bolesnika sa RRMS tretirana preparatima IFN- $\beta$  i prospektivno praćena tokom 7 godina sugerije da odgovor na terapiju IFN- $\beta$  nije bio isti kod oba pola (60). Naime, muškarci u grupi sa malim brojem ataka pre početka tretmana su pokazali značajno manji rizik od prvog relapsa i napredovanja onesposobljenosti za 1 stepen proširene skale stepena onesposobljenosti (*engl.* Expanded Disability Status Scale, EDSS) (60). S druge strane, muški pol je bio faktor rizika za progresiju bolesti u podgrupi sa odloženim početkom tretmana (57). Kod bolesnika sa SPMS, tretman IFN- $\beta$  je efikasnije sprećavao progresiju onesposobljenosti i neuroradioloških parametara bolesti kod žena nego kod muškaraca (61). Slični rezultati su dobijeni i u jednoj evropskoj studiji za IFN- $\beta$ 1b (62). Postoji više objašnjenja za polno dimorfne nalaze pomenutih studija. Jedno od ponuđenih objašnjenja za polne razlike u terapijskom odgovoru na IFN- $\beta$  je aktivacija različitih signalnih puteva od strane ovog citokina (63). Naime, smanjenje progresije bolesti i razvoja onesposobljenosti (prema EDSS) se pripisuje aktivaciji signalnog puta IL-6 kod žena, a IFN- $\gamma$  kod muškaraca sa MS (64). Sudeći prema neuroradiološkim ispitivanjima, kod muškaraca, za razliku od žena obolelih od MS, češće su vidljive lezije koje su patohistološki manje inflamatorne, a više neurodegenerativne (65) i koje su indikativne za ireverzibilnu demijelinizaciju i gubitak aksona (66). Ovi podaci bi mogli da objasne manji rizik od relapsa kod muškaraca tokom tretmana IFN- $\beta$  (60). Kao što je ranije pomenuto, poznato je da polni hormoni modulišu aktivnost bolesti i oštećenje nervnog tkiva (67,68). Budući da terapija IFN- $\beta$  dovodi do ushodne regulacije ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora, razlike u osetljivosti nervnog tkiva na delovanje polnih hormona bi takođe mogle da imaju ulogu u različitom odgovoru žena i muškaraca na terapiju (69,70,71). Međutim, treba istaći da efekti DMT na hormonski status obolelih od MS (i *vice versa*, uticaj hormonskog statusa na DMT), nisu ispitani ni u jednoj kliničkoj studiji.

GA je smeša sintetskih polipeptida koji su sastavljeni od četiri aminokiseline. Ovaj sintetski kopolimer pokazuje brojne antigenske sličnosti sa glavnom komponentom mijelina - baznim proteinom mijelina (*engl.* myelin basic protein, MBP) i modifikuje imunski odgovor na mijelin. Naime, GA pokazuje veliki afinitet za

vezivanje za molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) i, sledstveno, kompeticiju sa različitim mijelinskim antigenima za njihovu prezentaciju T-ćelijama. Pored toga, GA indukuje promenu u procentualnoj zastupljenosti, citokinskom profilu i efektorskim funkcijama antigen-specifičnih CD4+ i CD8+ T-limfocita. Uz sve ovo, GA indukuje diferencijaciju Th2 limfocita na periferiji, njihovu migraciju u CNS i *in situ* supresiju neuroinflamatornog procesa (55). Pojedine studije sugerišu da muškarci sa PPMS pokazuju bolji odgovor na GA od žena. Međutim, radiološki ishod terapije GA se nije razlikovao između žena i muškaraca sa PPMS, kao ni klinički odgovor na GA kod bolesnika sa RRMS (55).

Bolesnicima sa RRMS koji nisu odgovorili na prvu liniju DMT ili koji imaju veoma aktivnu bolest (dva ili više relapsa godišnje) se preporučuje korišćenje visoko specifičnog humanizovanog monoklonskog antitela natalizumab (58). Ovo antitelo je usmereno protiv  $\alpha$ 4-subjedinice integrina (prisutnog na većini leukocita) i onemogućava interakciju sa njegovim ligandom, adhezivnim molekulom na endotelnim ćelijama krvnih sudova mozga i kičmene moždine. Na taj način, natalizumab sprečava migraciju leukocita kroz krvno-moždanu barijeru u CNS i time sprečava otpočinjanje imunskog/inflamatornog odgovora. Efikasnost natalizumaba ispitivana je u dve velike, randomizirane kontrolisane studije (72,73). Nađeno je da njegova primena smanjuje učestalost relapsa i kod žena i kod muškaraca, ali da odlaže progresiju onesposobljenosti samo kod žena (74). Mehanizmi odgovorni za ovaj fenomen nisu razjašnjeni.

S obzirom na podatke koji sugerišu da upotreba pojedinih DMT, u zavisnosti od oblika bolesti, rezultuje različitim terapijskim odgovorom kod žena i muškaraca obolelih od MS, opravdano je razmišljati o terapijskom pristupu koji bi bio polno specifičan, i kao takav, efikasniji i sa manje neželjenih dejstava.

## **Zaključak**

Pol utiče na incidencu, klinički tok, histopatologiju, simptomatologiju i odgovor na terapiju u MS. Iako se najveći broj studija fokusira na značaj polnih hormona za polni dimorfizam u MS, pokazano je da su i drugi faktori relevantni za ove polne razlike. One predstavljaju rezultantu složenih interakcija između genetskih, epigenetskih i hormonskih faktora, razlika u izloženosti i/ili osetljivosti na delovanje sredinskih faktora, kao i intrizičnih bioloških razlika u imunskom i nervnom sistemu žena i muškaraca. Dalja istraživanja iz oblasti imunologije, genetike, neurobiologije i endokrinologije, udružena sa rafinisanim epidemiološkim metodama, neophodna su u cilju rasvetljavanja i razumevanja činilaca i ćelijskih i molekularnih mehanizama koji doprinose polnim razlikama u obolevanju, patogenezi i manifestacijama ove bolesti, što bi omogućilo i optimizaciju DMT, odnosno, terapiju personalizovanu prema polu bolesnika. Mogućnost polno specifične DMT-MS, koja bi bila klinički efikasnija,

bezbednija i jeftinija, čini ovo pitanje krucijalnim za razmatranje u budućnosti, ne samo kada je u pitanju MS, već i druge organ-specifične autoimunske bolesti u kojima postoji izražen polni dimorfizam u obolevanju i/ili kliničkoj slici.

## Zahvalnica

Izrada ovog rada podržana je od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Projekat br. 175050.

## Literatura:

1. Lerner A, Jeremias P, Matthias T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease*. 2015;3(4):151-155.
2. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose N. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. *The American Journal of Pathology*. 2008;173(3):600-609.
3. Ngo S, Steyn F, McCombe P. Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2014;35(3):347-369.
4. Zandman-Goddard G, Peeva E, Shoenfeld Y. Gender and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2007;6(6):366-372.
5. McCombe P, Greer J. Female reproductive issues in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2012;19(4):392-402.
6. McKean K, Nunney L. Bateman's principle and immunity: phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences. *Evol*. 2005;59(7):1510-1517.
7. Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*. 1985;121:531-551.
8. Hewagama A, Patel D, Yarlaga S, Strickland F, Richardson B. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes and Immunity*. 2009;10(5):509-516.
9. Su L, Kidd B, Han A, Kotzin J, Davis M. Virus-Specific CD4+ Memory-Phenotype T Cells Are Abundant in Unexposed Adults. *Immunity*. 2013;38(2):373-383.
10. Rolak L. Multiple Sclerosis: It's Not The Disease You Thought It Was. *Clinical Medicine & Research*. 2003;1(1):57-60.
11. Pender M, Greer J. Immunology of multiple sclerosis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7(4):285-292.
12. Dendrou C, Fugger L, Friese M. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-558.

13. Oksenberg J, Barcellos L. Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes and Immunity*. 2005;6(5):375-387.
14. Bove R, Chitnis T. The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2014;20(5):520-526.
15. Hartmann F, Khademi M, Aram J, Ammann S, Kockum I, Constantinescu C et al. Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nature Communications*. 2014;5:5056. doi: 10.1038/ncomms6056
16. Majdinasab N, Hosseini Behbahani M, Galehdari H, Mohaghegh M. Association of interleukin 7 receptor gene polymorphism rs6897932 with multiple sclerosis patients in Khuzestan Iran. *J Neurol*. 2014;13(3):168–171.
17. Hill N, Hulcrantz M, Sarvetnick N, Flodström-Tullberg M. The target tissue in autoimmunity – an influential niche. *European Journal of Immunology*. 2007;37(3):589-597.
18. Du L, Bayir H, Lai Y, Zhang X, Kochanek P, Watkins S et al. Innate Gender-based Proclivity in Response to Cytotoxicity and Programmed Cell Death Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(37):38563-38570.
19. Davies W, Wilkinson L. It is not all hormones: Alternative explanations for sexual differentiation of the brain. *Brain Research*. 2006;1126(1):36-45.
20. Kuusisto H, Kaprio J, Kinnunen E, Luukkaala T, Koskenvuo M, Elovaara I. Concordance and heritability of multiple sclerosis in Finland: study on a nationwide series of twins. *European Journal of Neurology*. 2008;15(10):1106-1110.
21. Kakalacheva K, Münz C, Lünemann J. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2011;1812(2):132-140.
22. Franklin G, Nelson L. Environmental risk factors in multiple sclerosis: Causes, triggers, and patient autonomy. *Neurology*. 2003;61(8):1032-1034.
23. Handunnetthi L, Ramagopalan S, Ebers G. Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1\*15. *Neurology*. 2010;74(23):1905-1910.
24. Lauer K. Environmental risk factors in multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2010;10(3):421-440.
25. Setlow V. Gender differences in susceptibility to environmental factors. Washington: National Academy Press, 1998.
26. Voskuhl R, Gold S. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nature Reviews Neurology*. 2012;8(5):255-263.
27. Koch-Henriksen N, Sørensen P. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology*. 2010;9(5):520-532.
28. Pozzilli C, Falaschi P, Mainero C, Martocchia A, D'Urso R, Proietti A et al. MRI in multiple sclerosis during the menstrual cycle: Relationship with sex hormone patterns. *Neurology*. 1999;53(3):622-622.



29. van Walderveen M, Tas M, Barkhof F, Polman C, Frequin S, Hommes O, Valk J. Magnetic resonance evaluation of disease activity during pregnancy in multiple sclerosis. *Neurology*. 1994;44(2):327-327.
30. Kovats S, Carreras E, Agrawal H. Sex Steroid Receptors in Immune Cells. In: Klein SL, Roberts CW, editors. *Sex Hormones And Immunity To Infection*. Berlin: Springer-Verlag, 2010:53-92.
31. Jung-Testas I, Baulieu E. Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998;65(1-6):243-251.
32. Giatti S, D'Intino G, Maschi O, Pesaresi M, Garcia-Segura L, Calza L, Caruso D, Melcangi R. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis induces sex dimorphic changes in neuroactive steroid levels. *Neurochem Int*. 2010;56(1):118-127.
33. Luchetti S, van Eden C, Schuurman K, van Strien M, Swaab D, Huitinga I. Gender differences in multiple sclerosis: induction of estrogen signaling in male and progesterone signaling in female lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73(2):123-135.
34. Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog Neurobiol*. 2003;71:67-80.
35. Melcangi RC, Panzica GC. Neuroactive steroids: old players in a new game. *Neuroscience*. 2006;138:733-739.
36. McEwen B. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12:141-147.
37. Bove R, Chitnis T. Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol*. 2013;149(2):201-210.
38. Trojano M, Lucchese G, Graziano G, Taylor BV, Simpson S Jr et al. MS base study group and the New Zealand MS prevalence study group. Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(10):e48078.
39. Bentzen J, Flachs EM, Stenager E, Brønnum-Hansen H, Koch-Henriksen N. Prevalence of multiple sclerosis in Denmark 1950--2005. *Mult Scler*. 2010;16(5):520-525.
40. Paty DW, Noseworthy JH, Ebers GC. Diagnosis of multiple sclerosis. In: Paty DW, Ebers GC, editors. *Multiple sclerosis*. Philadelphia: FA Davis Company, 1997:48-51.
41. Tomassini V, Pozzilli C. Sex hormones, brain damage and clinical course of Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci*. 2009;286(1-2):35-39.
42. Weinshenker BG, Rice GP, Noseworthy JH, Carriere W, Baskerville J et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain*. 1991;114(Pt 2):1045-1056.
43. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: anamnestic process. *Brain*. 2003;126(Pt 4):770-782.
44. Held U, Heigenhauser L, Shang C, Kappos L, Polman C. Predictors of relapse rate in MS clinical trials. *Neurology*. 2005;65(11):1769-1773.
45. Tremlett H, Zhao Y, Joseph J, Devonshire V. Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2008;79(12):1368-1374.

46. Tremlett H, Paty D, Devonshire V. The natural history of primary progressive MS in British Columbia, Canada. *Neurology*. 2005;65(12):1919-1923.
47. Hawkins S, McDonnell G. Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;67(2):148-152.
48. Benedict RH, Zivadinov R. Risk factors for and management of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2011;7:332-342.
49. Osterberg A, Boivie J, Thuomas KA. Central pain in multiple sclerosis—prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain*. 2005;9(5):531-542.
50. Bakshi R. Fatigue associated with multiple sclerosis: diagnosis, impact and management. *Mult. Scler*. 2003;9(3):219-227.
51. Chwastiak LA, Gibbons LE, Ehde DM, Sullivan M, Bowen JD et al. Fatigue and psychiatric illness in a large community sample of persons with multiple sclerosis. *J. Psychosom. Res*. 2005;59(5):291-298.
52. Savettieri G, Messina D, Andreoli V, Bonavita, S, Caltagirone C et al. Gender -related effect of clinical and genetic variables on the cognitive impairment in multiple sclerosis. *J. Neurol*. 2004;251(10):1208-1214.
53. Nacka-Aleksić M, Djikić J, Pilipović I, Stojić-Vukanić Z, Kosec D, Bufan B et al. Male rats develop more severe experimental autoimmune encephalomyelitis than female rats: Sexual dimorphism and diergism at the spinal cord level. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015;49:101-118.
54. Nacka-Aleksić M, Pilipović I, Stojić-Vukanić Z, Kosec D, Bufan B, Vujnović I et al. Sexual dimorphism in the aged rat CD4+ T lymphocyte-mediated immune response elicited by inoculation with spinal cord homogenate. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2015;152:15-31.
55. Wolinsky J, Shochat T, Weiss S, Ladkani D. Glatiramer acetate treatment in PPMS: Why males appear to respond favorably. *Journal of the Neurological Sciences*. 2009;286(1-2):92-98.
56. Kalincik T, Vivek V, Jokubaitis V, Lechner-Scott J, Trojano M, Izquierdo G et al. Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain*. 2013;136(12):3609-3617.
57. Voskuhl R. Sex difference in autoimmune disease. *Biol Sex Differ*. 2011;2(1):1. doi: 10.1186/2042-6410-2-1
58. Wiendl H, Toyka K, Rieckmann P, Gold R, Hartung H, Hohlfeld R. Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: Current therapeutic recommendations. *Journal of Neurology*. 2008;255(10):1449-1463.
59. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74 Suppl 1:S 17-24.
60. Trojano M, Pellegrini F, Paolicelli D, Fuiani A, Zimatore G, Tortorella C et al. Post-marketing of disease modifying drugs in multiple sclerosis: An exploratory analysis of gender effect in interferon beta treatment. *Journal of the Neurological Sciences*. 2009;286(1-2):109-113.

61. Li D, Zhao G, Paty D. Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: MRI results. *Neurology*. 2001;56(11):1505-1513.
62. SPECTRIMS. Randomized controlled trial of interferon- beta-1a in secondary progressive MS: Clinical results. *Neurology*. 2001;56(11):1496-1504.
63. Charbit H, Benis A, Geysheis B, Karussis D, Petrou P, Vaknin-Dembinsky A et al. Sex-specific prediction of interferon beta therapy response in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2015;22(6):986-989.
64. Contasta I, Totaro R, Pellegrini P, Del Beato T, Carolei A, Berghella A. A gender-related action of IFNbeta-therapy was found in multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):223. doi: 10.1186/1479-5876-10-223.
65. Pozzilli C, Tomassini V, Marinelli F, Paolillo A, Gasperini C, Bastianello S. „Gender gap” in multiple sclerosis: magnetic resonance imaging evidence. *Eur J Neurol*. 2003;10(1):95-97.
66. Sahraian MA, Radue EW, Haller S, Kappos L. Black holes in multiple sclerosis: definition, evolution, and clinical correlation. *Acta Neurol Scand*. 2010;122(1):1-8.
67. Sicotte NL, Liva SM, Klutch R, Pfeiffer P, Bouvier S, Odesa S, Wu TC, Voskuhl RR. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol*. 2002;52:421–428.
68. Tomassini V, Onesti E, Mainero C, Giugni E, Paolillo A et al. Sex hormones modulate brain damage in multiple sclerosis: MRI evidence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(2):272-275.
69. Sica G, Iacopino F, Lama G, Amadori D, Baroni M et al. Steroid receptor enhancement by natural interferon-beta in advanced breast cancer. *Eur J Cancer*. 1993;29A(3):329-333.
70. De Cicco Nardone F, Rossiello F, Iacopino F, Benedetto MT, Cinque B et al. Effects of interferon-beta on steroid receptors, prostaglandins and enzymatic activities in human endometrial cancer. *Anticancer Res*. 1996;16(1):161-169.
71. Barak V, Kalickman I, Nisman B, Farbstein H, Fridlender ZG et al. Changes in cytokine production of breast cancer patients treated with interferons. *Cytokine*, 1998;10(12):977-983.
72. Polman C, O'Connor P, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller D et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(9):899-910.
73. Rudick R, Stuart W, Calabresi P, Confavreux C, Galetta S, Radue E et al. Natalizumab plus Interferon Beta-1a for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(9):911-923.
74. Hutchinson M, Kappos L, Calabresi P, Confavreux C, Giovannoni G, Galetta S et al. The efficacy of natalizumab in patients with relapsing multiple sclerosis: subgroup analyses of AFFIRM and SENTINEL. *Journal of Neurology*. 2009;256(3):405-415.

# **Sex differences in the clinical presentation and therapy of multiple sclerosis**

**Mirjana Nacka-Aleksić\***

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

\*Corresponding autor; e-mail: mnacka@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: +381 11 3951209)

---

## **Summary**

Multiple sclerosis (MS) is more prevalent in women than in men, with the female to male ratio in the prevalence of MS constantly increasing. Besides, sex appears to affect the development, progression, clinical manifestation and therapy response in MS. These sex differences, most likely, emerge from the genetic, epigenetic and hormonal differences between the sexes, differences in environmental exposure and/or susceptibility to certain factors, as well as from the biological differences in the female and male immune and nervous system. Therefore, sex differences in all of these aspects need to be taken into consideration when designing and interpreting research findings related to MS, and particularly in development of new therapeutic strategies and designing of clinical drug trials. Understanding the mechanisms underlying sex differences in the pathogenesis and/or therapy response in MS could also narrow the gap in our knowledge of the pathogenesis/therapy of a broad spectrum of other autoimmune diseases that are characterized by sexual dimorphism in the prevalence and/or clinical presentation.

**Key words:** sex differences, multiple sclerosis, DMT.

---

# **Praćenje građenja kompleksa aktivne farmaceutske supstance i $\beta$ -ciklodekstrina kao aditiva mobilne faze primenom masene spektrometrije**

**Andela Milenković, Dragana Miljić, Jelena Mitrović\*, Ana Protić, Biljana Otašević**

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,  
Vojvode Stepe 450, 11 152 Beograd

\*e-mail:mitrovic.jelena92@gmail.com

---

## **Kratak sadržaj**

Poslednjih godina sve više se teži smanjenju upotrebe toksičnih rastvarača u hromatografskim metodama. U te svrhe često se upotrebljavaju beta-ciklodekstrini ( $\beta$ -CD) kao modulatori retencije supstanci. Povećavanjem njihove koncentracije u mobilnoj fazi uglavnom dolazi do smanjenja retencije analita i, posledično, do smanjenja udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Cilj rada bio je ispitivanje načina formiranja inkluzionih kompleksa  $\beta$ -CD i odabranih lekova iz grupe sartana, sa posebnim osvrtom na uticaj pH vrednosti vodene faze, molarnog odnosa leka i  $\beta$ -CD i vrste organskog rastvarača na formiranje kompleksa. Primenom metode masene spektrometrije, na triplkvadрупolskom masenom analizatoru, vršena je karakterizacija formiranog kompleksa  $\beta$ -CD i leka pri različitom molarnom odnosu lek: $\beta$ -CD (1:1, 1:2, 1:5 i 1:10) i pri pH vrednostima vodene faze 5, 7 i 9. Mobilna faza i rastvarač u kome su formirani kompleksi bila je smeša acetonitrila i vode, kao i smeša metanola i vode (50:50, V/V). Merenja intenziteta signala nagrađenih kompleksa nakon elektrosprej jonizacije vršena su u negativnom modu. Uočene su  $m/z$  vrednosti koje potiču od masa kompleksa leka i  $\beta$ -CD u odnosu 1:1 pri svim pH vrednostima vodene faze i nezavisno od vrste organskog rastvarača i udela  $\beta$ -CD. Uočeno je da intenzitet signala nastalog kompleksa raste jedino povećanjem udela  $\beta$ -CD.

**Ključne reči:** masena spektrometrija, inkluzionni kompleksi, beta-ciklodekstrin, sartani.

## 1. Uvod

U novije vreme sve više se teži ka primeni principa zelene hemije u analitici lekova, posebno u toku razvoja metoda tačne hromatografije. S obzirom da se u farmaciji hromatografske metode koriste kako tokom istraživanja i razvoja, tako i u rutinskim ispitivanjima i kontroli kvaliteta farmaceutskih proizvoda, potrebno je obratiti posebnu pažnju na karakteristike metode sa stanovišta bezbednosti analitičara i uticaja na životnu sredinu. U cilju smanjenja količine otpada koji potiče od upotrebljenih organskih rastvarača u farmaceutskoj industriji, intenzivno se razmatraju nova ekološki prihvatljivija rešenja. Najšire je prihvaćeno pravilo 3R (eng. *Reduce - Replace - Recycle*) koje podrazumeva razvoj hromatografskih metoda sa smanjenom upotrebom toksičnih rastvarača ili njihovom zamenom manje toksičnim rastvaračima, odnosno rastvaračima koji se mogu lako prerađivati (1-3).

U literaturi se pominje upotreba ciklodekstrina (CD) kao jedan od načina smanjenja količine organskih rastvarača u hromatografskoj analizi (4). U hromatografskim metodama CD se koriste za razdvajanje enantiomera i kao modifikatori mobilne faze u cilju smanjenja retencije supstanci uz istovremeno smanjenje udela organskog rastvarača. Primećeno je da što je veća količina CD u mobilnoj fazi manja je retencija analita i, posledično, smanjuje se udeo organskog rastvarača (5,6).

Ciklodekstini su oligosaharidi dobijeni enzimskom razgradnjom skroba i sadrže 6 ( $\alpha$ -CD), 7 ( $\beta$ -CD) ili 8 ( $\gamma$ -CD) jedinica D-glukoze, povezanih  $\alpha$ -1,4 glikozidnim vezama (7). Zahvaljujući svojoj strukturi  $\beta$ -CD sa mnogim supstancama mogu da grade nekovalentne inkluzione komplekse rastvorljive u vodi. Imaju oblik zarubljene kupe, pri čemu je spoljašnjost kupe hidrofilna, dok se u unutrašnjosti nalazi šupljina koja je relativno hidrofobna i prekrivena je glikozidnim etarskim mostovima i C-H grupama (4). Uži spoljašnji obod kupe je obložen primarnim alkoholnim grupama, a širi obod je obložen sekundarnim alkoholnim grupama. Prilikom stvaranja kompleksa sa  $\beta$ -CD manje polarni deo molekule „gosta” se uvlači u šupljinu, dok su polarnije grupe u kontaktu sa polarnim rastvaračem (8). Tako, fenil grupe molekule „gosta” kao hidrofobne lako se uklapaju u šupljinu  $\beta$ -CD, a amino, alkoholne, fenolne i karbonilne grupe omogućavaju interakcije sa hidrofilnim grupama na spoljašnjoj površini  $\beta$ -CD formiranjem vodoničnih veza, omogućavajući na taj način dodatnu stabilizaciju nagrađenog kompleksa (9). Uklapanje molekula u šupljinu  $\beta$ -CD, odnosno komplementarnost između njihovih veličina, određuje stabilnost kompleksa i selektivnost procesa kompleksiranja (10,11).  $\beta$ -CD i molekul „gost” mogu da formiraju komplekse u različitim odnosima (9).

Niz različitih fizičko-hemijskih metoda se pominje u literaturi za ispitivanje formiranja kompleksa i karakteristika kompleksa malih molekula sa  $\beta$ -CD. Neke od tih

metoda su: NMR, konduktometrijska titracija, spektrofotometrijske i fluorometrijske tehnike (12). Međutim, sve navedene metode mogu dovesti do pogrešnih zaključaka te je za analizu formiranih kompleksa primenjena masena spektroskopija (MS) (9). Prednost MS u odnosu na druge analitičke metode je pre svega u većoj osetljivosti i jednostavnosti, kao i mogućnosti utvrđivanja stehiometrije, budući da daje podatke o molekularnoj masi. MS elektrosprej jonizacija (ESI-MS) spada u relativno meke tehnike jonizacije, zbog čega ne dovodi do raskidanja slabih nekovalentnih veza u kompleksima koji nastaju između leka i  $\beta$ -CD (13,14).

Cilj ovog rada bio je ispitivanje formiranja kompleksa  $\beta$ -CD i leka iz grupe sartana (losartan, valsartan, eprosartan, irbesartan, telmisartan i olmesartan) i njihove stabilnosti na različitim pH vrednostima mobilne faze, pri različitim odnosima leka i  $\beta$ -CD i različitom sastavu mobilne faze.

## 2. Eksperimentalni deo

Standardi losartana, valsartana, eprosartan-mesilata, irbesartana, telmisartana i olmesartana su dobijeni od Sigma-e (Taufkirchen, Nemačka). Acetonitril HPLC čistoće i metanol HPLC čistoće su nabavljeni od Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen Nemačka). Prečišćena voda, koja je korišćena za pripremu mobilne faze, dobijena je iz Simplicity 185 sistema za prečišćavanje, Millipore (Billerica, MA, USA). Sirćetna kiselina i amonijum-hidroksid, koji su korišćeni za podešavanje pH vrednosti vodene faze, nabavljeni su od Sigma Aldrich (Taufkirchen, Nemačka). pH vodene faze je podešen pomoću PH M210 standardnog pH-metra (Radiometer Analytical SAS, Francuska) opremljenog staklenom elektrodom. Pre upotrebe, mobilna faza je filtrirana kroz najlonski membranski filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Osnovni rastvori odabranih sartana pravljani su u koncentraciji od 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  u smeši acetonitrila i vode (50:50, *V/V*) i u smeši metanola i vode (50:50, *V/V*). Osnovni rastvor  $\beta$ -CD napravljen je u koncentraciji 2,5  $\text{mmol L}^{-1}$  u vodi.

Pipetirane su određene zapremine osnovnih rastvora odabranih sartana i  $\beta$ -CD tako da molarni odnos lek:  $\beta$ -CD bude 1:1, 1:2, 1:5 i 1:10, a da pritom koncentracija odabranog sartana u dobijenom rastvoru bude 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kao rastvarač korišćena je smeša acetonitril:voda (50:50, *V/V*) za prvi set ispitivanja, odnosno smeša metanol:voda (50:50, *V/V*) za drugi set ispitivanja. Kako bi se sprečila kontaminacija između merenja, kapilara i špric za injektovanja ispirani su acetonitriplom.

Mobilna faza se sastojala od acetonitrila-vodene faze pH 5 (50:50, *V/V*), acetonitrila-vodene faze pH 7 (50:50, *V/V*), acetonitrila-vodene faze pH 9 (50:50, *V/V*), metanola-vodene faze pH 5 (50:50, *V/V*), metanola-vodene faze pH 7 (50:50, *V/V*), metanola-vodene faze pH 9 (50:50, *V/V*).

MS analiza je vršena korišćenjem Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max (Thermo Fisher Scientific Inc.) trostrukog kvadrupolskog masenog analizatora. Podešavanje masenog spektrometra, odnosno optimizacija negativnog moda ESI izvora, izvedena je rastvorima standarda odabranih lekova i  $\beta$ -CD pri koncentracijama od  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Oba standardna rastvora su unošena u sistem direktno pomoću špric pumpe pri protoku od  $3 \mu\text{L min}^{-1}$  pri definisanim sastavima mobilne faze. MS analiza je vršena primenom elektrosprej jonizacije u negativnom modu (-ESI) pri naponu raspršivanja od 4000 V, temperaturi isparavanja od  $325^\circ\text{C}$ , pritisku gasa od 40 psi i temperaturi kapilare od  $211^\circ\text{C}$ . Kao kolizionni gas korišćen je argon. Pozitivan mod nije bio korišćen jer kompleksi  $\beta$ -CD i lekova nisu bili detektovani. Kompleksi su bili detektovani jedino u negativnom modu zbog čega je on korišćen za dalja ispitivanja. Opseg skeniranja vrednosti  $m/z$  odnosa je podešen na 100-3000  $m/z$ , mada iznad vrednosti  $m/z$  odnosa 2000 ni u jednom slučaju nije bilo izraženih pikova, te je zaključeno da se grade samo inkluzioni kompleksi lek:  $\beta$ -CD u odnosu 1:1, a ne i u odnosu 2:1 ili 1:2.

Radi utvrđivanja načina vezivanja leka za molekul  $\beta$ -CD, što bi bilo od velike koristi u daljem razvoju hromatografske metode, urađena je *Docking* analiza pomoću programa Auto Dock v4.2.6 (15), The Scripps Research Institute, CA, U.S.A. Strukture ispitivanih sartana kao liganada dobijene su primenom Chem Office v7.0. Ultra software package i optimizovane primenom semi-empirijskog modela MOPAC/AM1 do konformera sa minimalnim sadržajem energije. Svaki doking eksperiment sastojao se od 50 doking ranova sa maksimalnim brojem energetskih iteracija od 10 000. Za ostale parametre, koje koristi program, zadržane su osnovne vrednosti. Istraživanje je sprovedeno u mreži koja se sastojala od 40 linija u mreži (za x, y i z osu) sa razmakom od 0,375 između linija u okviru mreže. Centriranje je izvršeno u odnosu na mesto vezivanja liganada, u ovom slučaju  $\beta$ -CD.

### 3. Rezultati i diskusija

Podešavanje parametara masenog spektrometra vršeno je rastvorima standarda odabranih sartana i  $\beta$ -CD. Pri tome su uočene sledeće vrednosti  $m/z$  odnosa molekulskih jona: 421 za losartan, 434 za valsartan, 422 za eprosartan, 427 za irbesartan, 515 za telmisartan, 557 za olmesartan, i 1133 za  $\beta$ -CD. Radi potvrde strukture  $\beta$ -CD rađena je njegova fragmentacija i dobijeni su fragmenti sledećih vrednosti  $m/z$  odnosa: 1013, 851, 681 i 527.

#### 3.1. Analiza kompleksa lek- $\beta$ -CD

U cilju ispitivanja formiranja inkluzionih kompleksa leka i  $\beta$ -CD, kao i ispitivanja u kom odnosu lek -  $\beta$ -CD formiraju kompleks, kroz MS su propuštani rastvori u kojima su lek i  $\beta$ -CD bili u molarnom odnosu 1:1, 1:2, 1:5 i 1:10 pri pH vrednostima mobilne faze 5, 7 i 9. Potvrda formiranja inkluzionih kompleksa bila je vrednost  $m/z$  odnosa koja

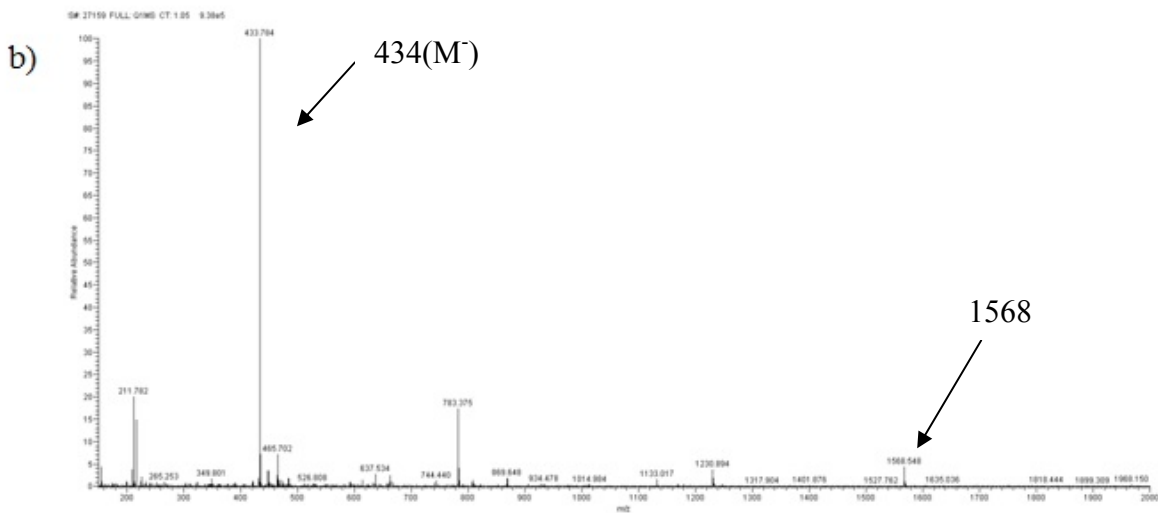
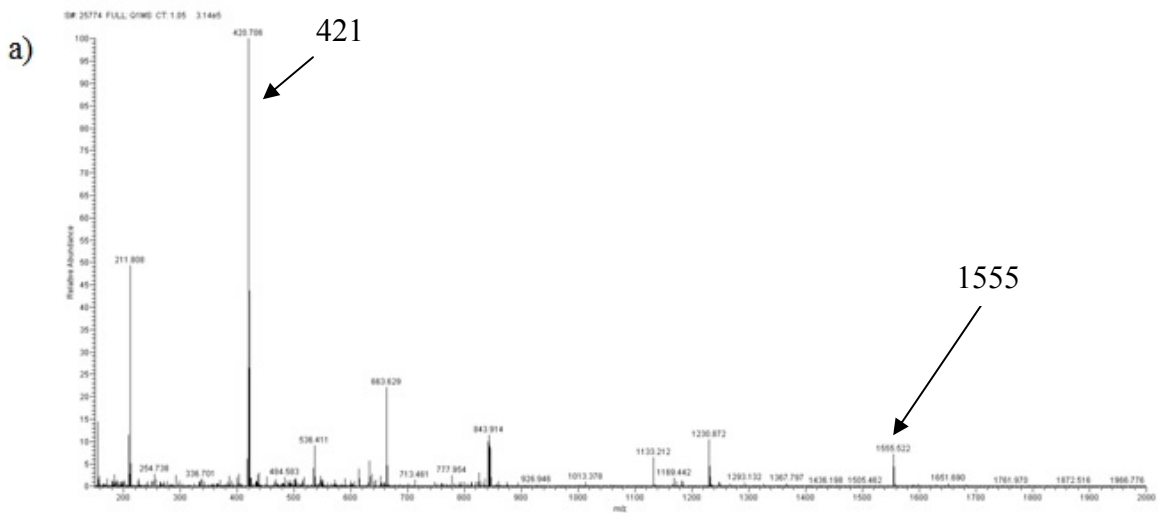


odgovara zbiru masa  $\beta$ -CD i odgovarajućeg molekuskog jona leka (losartan –  $\beta$ -CD 1555; valsartan –  $\beta$ -CD 1568; eprosartan –  $\beta$ -CD 1558; irbesartan –  $\beta$ -CD 1562; telmisartan –  $\beta$ -CD 1647 i olmesartan –  $\beta$ -CD 1692) (Slika 1, 2 i 3). Poznato je da se u MS spektru mogu uočiti ne samo mase koje odgovaraju kompleksu leka i  $\beta$ -CD, već i elektrostatičkim aduktima koji se formiraju tokom procesa elektrosprej jonizacije (14). Ostali signali polimera u prikazanim MS spektrima potiču od nečistoća i nagrađenih adukt jona, što je potvrđeno analizom standardnih rastvora. Važno je pomenuti da su kompleksi formirani već pri odnosu lek -  $\beta$ -CD 1:1, a stabilnost njihovog signala se povećava sa povećanjem udela  $\beta$ -CD u rastvoru, tako da se najbolje uočavaju kompleksi pri analizi rastvora u kojima je odnos lek: $\beta$ -CD 1:10.

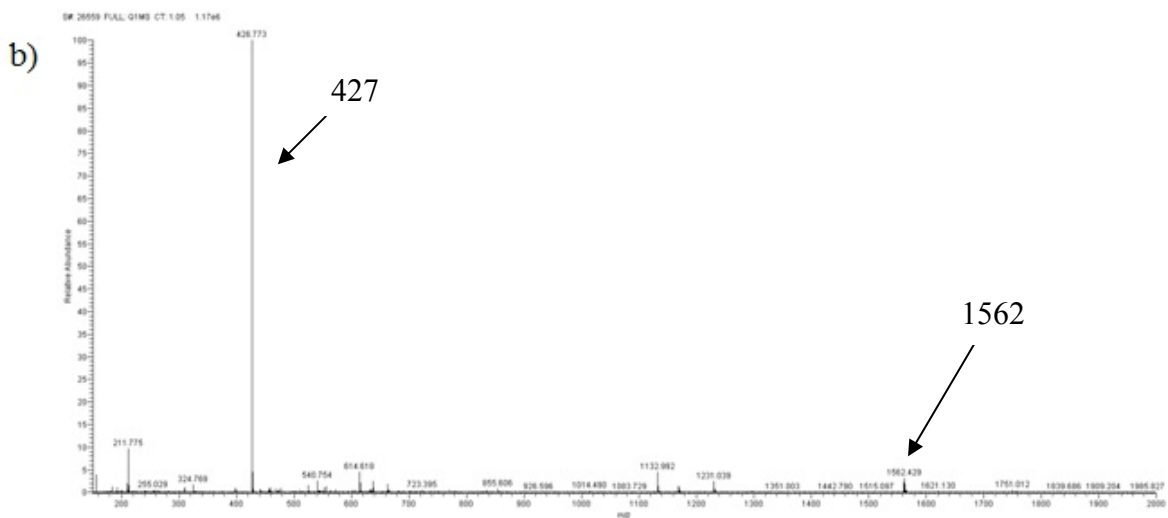
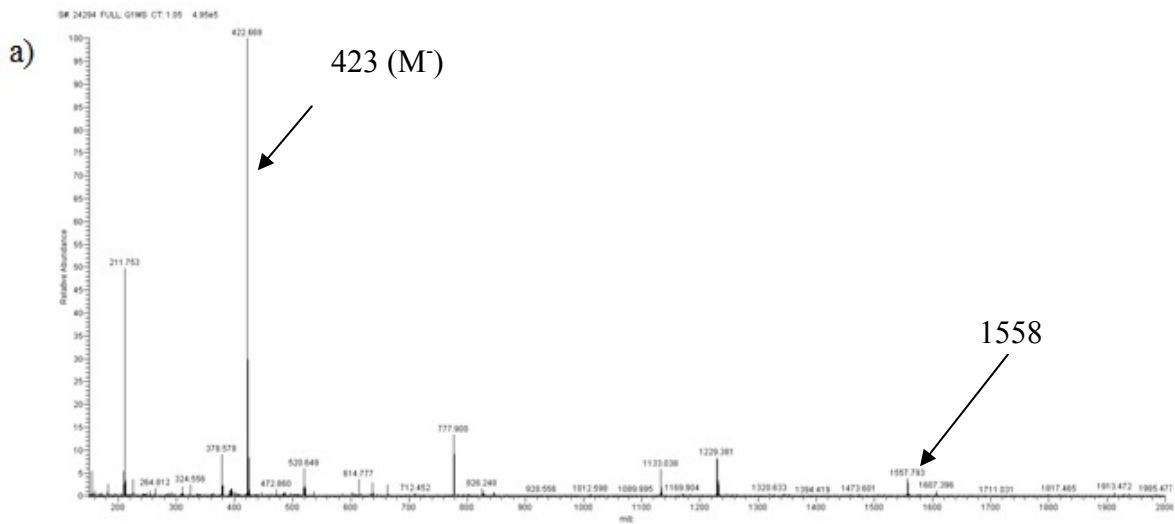
Promena pH vrednosti mobilne faze nema značajniji uticaj na intenzitet signala kompleksa verovatno zbog toga što su lekovi u rastvorima na pomenutim pH vrednostima u anjonskom ili molekuskom obliku koji se potom jonizuje u jonskom izvoru. Kompleksi i sam  $\beta$ -CD se bolje vide kada se kroz sistem ne propušta mobilna faza, a stajanjem rastvora tokom 24h nije došlo do promene signala.

Slični eksperimenti su rađeni u smeši metanol:voda kao mobilnoj fazi pri pH 5, ali se dobijaju isti signali kao korišćenjem smeše acetonitril:voda, s tim što je primećen veći broj adukt jona. Konstantovano je i da se kompleksi bolje uočavaju uz propuštanje ove mobilne faze kroz sistem.

Kao još jednu značajnu činjenicu treba istaći da su u MS spektru pored kompleksa pri svim pomenutim uslovima, prisutni i signali koji potiču od slobodnog leka i  $\beta$ -CD, pri čemu se intenzitet signala samog  $\beta$ -CD povećava povećanjem njegove količine u rastvoru.

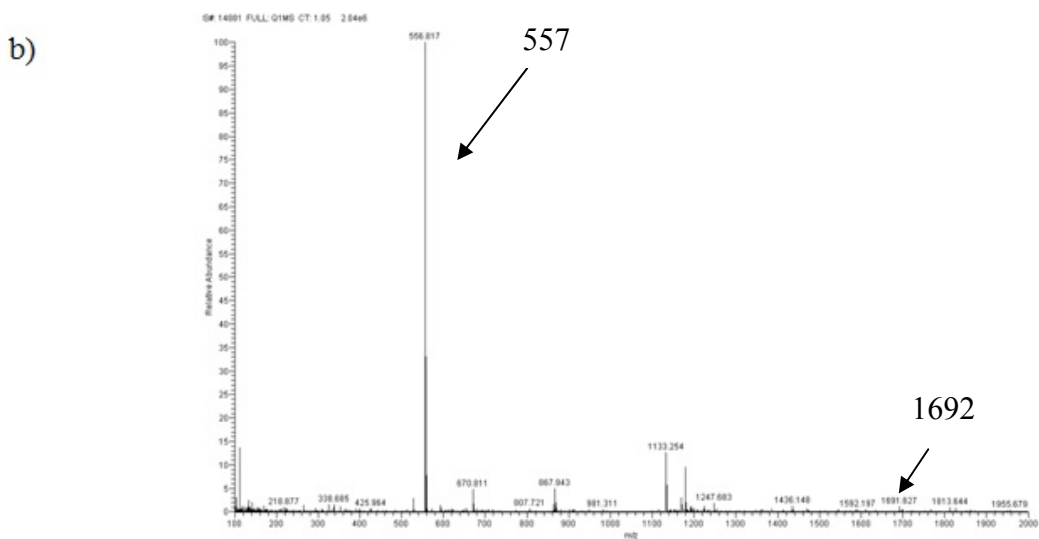
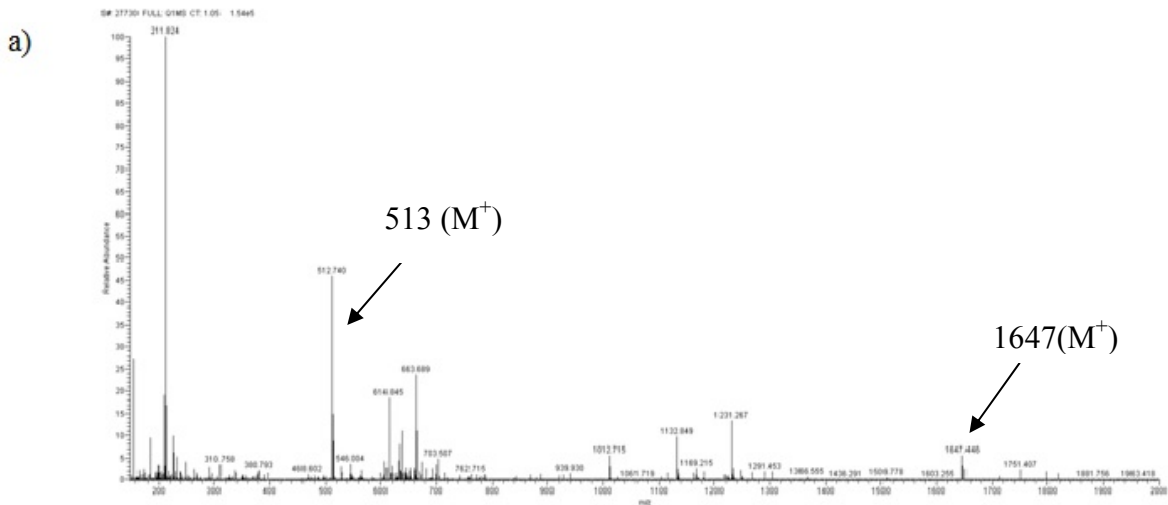


Slika 1. MS spektri rastvora leka i  $\beta$ -CD u odnosu 1:10 na pH 5: a) losartan; b) valsartan  
 Figure 1. The MS spectra of the drug solution and  $\beta$ -CD in ratio of 1:10 at pH 5  
 a) losartan; b) valsartan



Slika 2: MS spektri rastvora leka i  $\beta$ -CD u odnosu 1:10 na pH 5: a) eprosartan; b) irbesartan

Figure 2: The MS spectra of the drug solution and  $\beta$ -CD in ratio of 1:10 at a pH 5: a) eprosartan; b) irbesartan



Slika 3: MS spektri rastvora leka i  $\beta$ -CD u odnosu 1:10 na pH 5: a) telmisartan; b) olmesartan.

Figure 3: The MS spectra of the drug solution and  $\beta$ -CD in ratio of 1:10 at pH 5: a) telmisartan; b) olmesartan.

### 3.2. Docking analiza posmatranih kompleksa

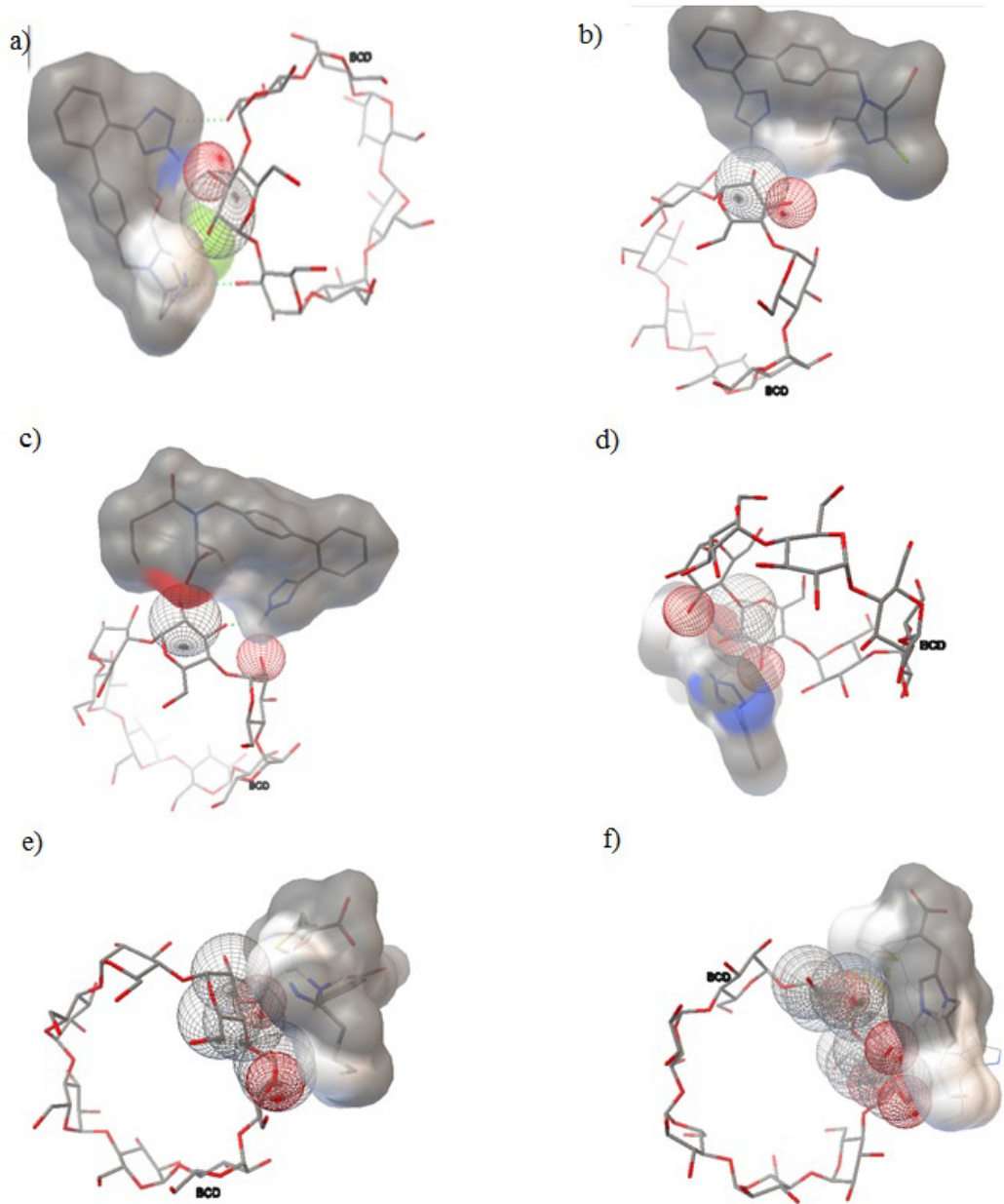
Nakon uradene *Docking* analize, primećeno je da svi lekovi, osim telmisartana koji je u obliku cviterjona, grade komplekse sa  $\beta$ -CD sa spoljašnje strane u odnosu 1:1 (Slika 4 i 5). Razlog za ovakvo vezivanje je verovatno prisustvo velikog broja funkcionalnih grupa koje mogu ostvarivati vodonične veze i elektrostatičke interakcije sa primarnim i sekundarnim hidroksilnim grupama  $\beta$ -CD. Dodatno, dianjonski oblik eprosartana je hidrofilan ( $\log D$  -1,64) na pH 9 što već navodi na zaključak da će se vezati sa spoljašnje strane. Svi analizirani lekovi su ostvarivali veliki broj hidrofobnih i polarnih interakcija, sem losartana koji se najslabije vezao, a ovo zapažanje potvrđuje i visoka energija vezivanja koja je iznosila 1,05 (Tabela I). Telmisartan se na pH 5 nalazi u cviterjonskom obliku i veoma je lipofilan ( $\log D$  5,06) pa se jednim delom uvlači u šupljinu  $\beta$ -CD i formira inkluzioni kompleks (Slika 4). Kao što se vidi na Slici 4 u šupljini se nalazi fenil ostatak benzimidazola, a inkluzioni kompleks je dodatno stabilizovan polarnim interakcijama. Snažno vezivanje je potvrđeno i merenjem energije vezivanja koja je iznosila -4,92. Zanimljivo je da telmisartan u anjonskom obliku na  $\text{pH}>5$  gradi kompleks sa spoljašnje strane verovatno zbog nedovoljne lipofilnosti ( $\log D < 5$ ).

Prema energijama vezivanja se može zaključiti da su stabilniji oni kompleksi koji imaju nižu energiju vezivanja ili bolje rečeno potencijalno stabilniji jer su energije vezivanja izračunate u okviru greške koju pravi Autodock program. Prema energijama vezivanja može se zaključiti da se potencijalno stabilniji kompleksi formiraju kada su lekovi u anjonskom obliku, na  $\text{pH}>5$ , osim u slučaju telmisartana. Međutim, na osnovu rezultata dobijenih analizom na MS spektrometru pokazano je da pH vrednost mobilne faze nema uticaja na stabilnost formiranih kompleksa.

**Tabela I** Energije vezivanja  $\beta$ -ciklodekstrina i leka.

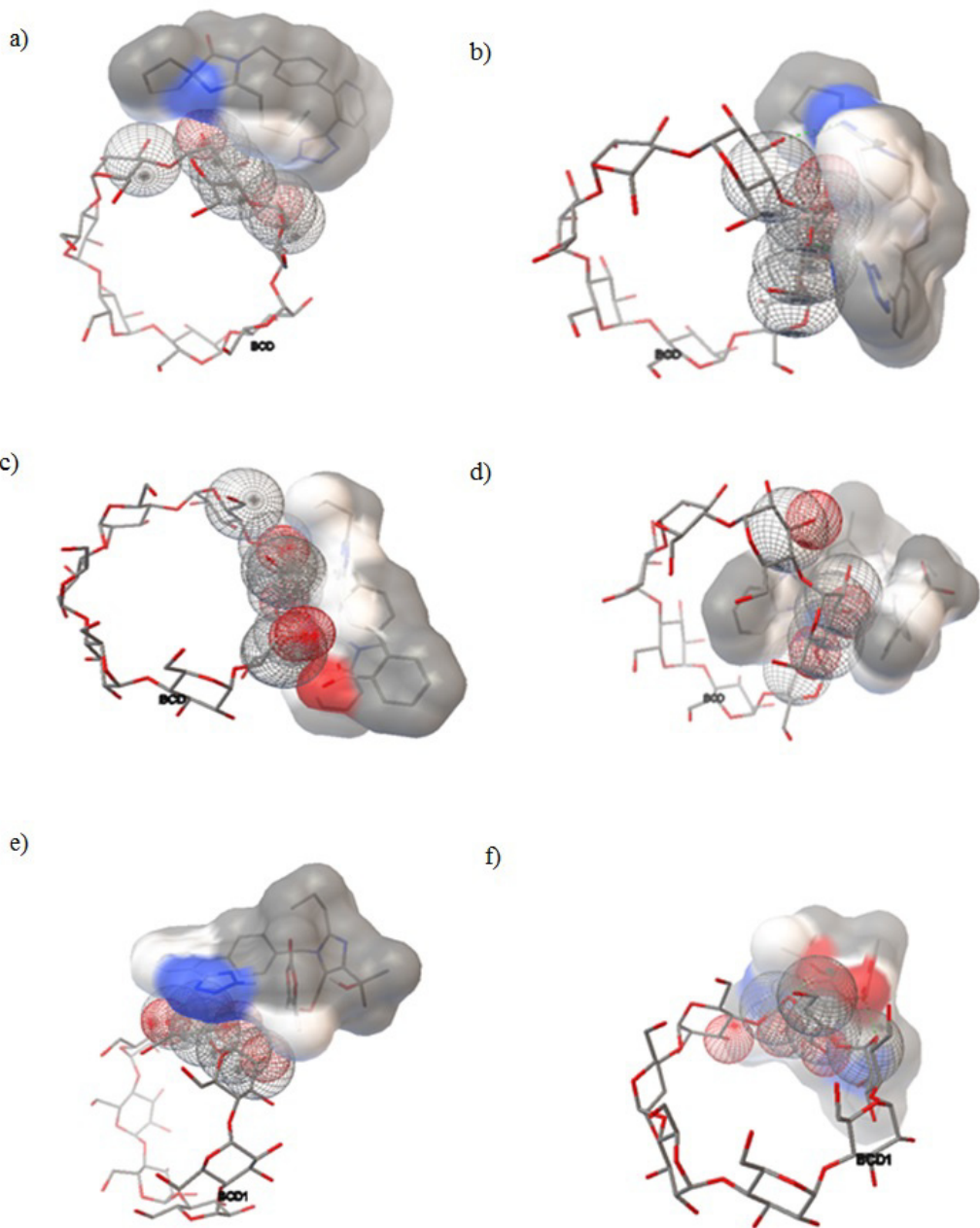
**Table I** The binding energy of  $\beta$ -cyclodextrin and drug.

Lek	Energija vezivanja (kcal/mol)
Eprosartan (cviterjonski oblik)	-0,03
Eprosartan (dianjonski oblik)	-0,73
Irbesartan (molekulski oblik)	-1,38
Irbesartan (anjonski oblik)	-2,87
Telmisartan (anjonski oblik)	-3,29
Telmisartan (cviterjonski oblik)	-4,92
Valsartan (anjonski oblik)	0,68
Valsartan (dianjonski oblik)	-0,44
Losartan (molekulski oblik)	-0,01
Losartan (anjonski oblik)	1,05
Olmесartan (molekulski oblik)	0,02
Olmесartan (anjonski oblik)	-2,04



Slika 4. Kompleksi  $\beta$ -ciklodekstrina i leka: a) losartan (molekulski oblik); b) losartan (anjonski oblik); c) valsartan (anjonski oblik); d) valsartan (dianjonski oblik); e) eprosartan (cviterjonski oblik); f) eprosartan (dianjonski oblik).

Figure 4. The complex between  $\beta$ -cyclodextrin and drug: a) losartan (molecular form); b) losartan (anionic form); c) valsartan (anionic form); d) vlasartan (dianionic form); e) eprosartan (zwitterionic form); f) eprosartan (dianionic form).



Slika 5. Kompleksi  $\beta$ -ciklodekstrina i leka: a) irbesartan (molekulski oblik); b) irbesartan (anjonski oblik); c) telmisartan (anjonski oblik); d) telmisartan (cviterjonski oblik); e) olmesartan (molekulski oblik); f) olmesartan (anjonski oblik).  
 Figure 5. The complex between  $\beta$ -cyclodextrin and drug: a) irbesartan (molecular form); b) irbesartan (anionic form); c) telmisartan (anionic form); d) telmisartan (zwitterionic form); e) olmesartan (molecular form); f) olmesartan (anionic form).

## 4. Zaključak

Kompleks leka i  $\beta$ -CD nastaje u odnosu 1:1 pri svim ispitivanim uslovima, nezavisno od pH vrednosti vodene faze i vrste organskog modifikatora mobilne faze. Intenzitet signala kompleksa zavisi od molarnog odnosa lek: $\beta$ -CD i bio je najveći pri molarnom odnosu 1:10. *Docking* analizom pokazano je da se kompleksi najverovatnije stvaraju ostvarivanjem interakcija na spoljašnjoj strani  $\beta$ -CD, osim u slučaju cviterjonskog oblika telmisartana koji formira inkluzioni kompleks.

## Zahvalnica

Ovaj rad predstavlja deo rezultata naučno-istraživačkog projekta broj 172033 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

## Literatura:

1. Welch C, Wu N, Biba M, Hartman R, Brkovic T, Gong X, Helmy R, Schrafer W, Cuff J, Pirzada Z, Zhou L. Green analytical chromatography. *T Anal Chem.* 2010; 29: 667-680.
2. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. Green Analytical Chemistry. *T Anal Chem.* 2008; 27 (6): 497- 511
3. Cielecka-Piontek J, Zalewski P, Jelinska A, Garbacki P. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia.* 2013; 76:1429-1437
4. Otašević B, Protić A, Golubović J, Zečević M. Primena koncepta razvoja ekološki prihvatljivih metoda tečne hromatografije u analitici lekova. *Arh.farm.* 2015; 65: 178-190.
5. Marks D. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of LY309887 (thenyl-5,10-dideazatetrahydrofolate) stereoizomers using  $\beta$ -cyclodextrin as a mobile phase additive. *J Chromatogr Sci.* 1997; 35: 201-205.
6. Chen D, Jing S, Chen Y, Hu Y. HPLC determination of sertraline in bulk drug, tablets and capsules using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrinas mobile phase additive. *J. Pharm Biomed Anal.* 2004; 34: 239-245
7. Gabelica V, Galic N, De Pauw E. On the Specificity of Cyclodextrin Complexes Detected by Electrospray Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002; 13: 946-953.
8. Rekharsky M V, Inoue Y. Complexation Thermodynamic of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* 1998; 98: 1875-1917.
9. Dotsikas Y, Loukas Y L. Efficient Determination and Evaluation of Model Cyclodextrin Complex Binding Constants by Electrospray Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003; 14: 1123-1129.



10. Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 1998; 98: 1743-1753.
11. Connors K A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem Rev.* 1997; 97: 1325-1357.
12. Loukas Y L. Multiple Complex Formation of Fluorescent Compounds with Cyclodextrins: Efficient Determination and Evaluation of the Binding Constant with Improved Fluorometric Studies. *J Phys Chem.* 1997; B 101: 4863-4866.
13. Arakawa R, Yamaguchi T, Takahashi A, Fujimoto T, Kaneda T. Identification of Face-to-Face Inclusion Complex Formation of Cyclodextrin Bearing an Azobenzene Group by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003; 14: 1116-1122.
14. Cunniff J B, Vouros P. False Positives and the Detection of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Electrospray Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1995; 6: 437-447.
15. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 1998, 19, 1639-1662.

# Monitoring of complex forming of the active pharmaceutical substance and $\beta$ -cyclodextrin as an additive of the mobile phase using mass spectrometry

Andela Milenković, Dragana Miljić, Jelena Mitrović\*, Ana Protić, Biljana Otašević

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

\*e-mail:mitrovic.jelena92@gmail.com

---

## Summary

In recent years, there is aim to reduce toxic solvents use in chromatographic techniques. Beta-cyclodextrins ( $\beta$ -CD) are commonly used for this purpose, as substance retention modulators. By increasing their concentration in the mobile phase, generally there is a decrease in analyte retention time, and consequently, a decrease in the organic solvent ratio in the mobile phase. The aim of this study was to investigate  $\beta$ -CD and selected sartans inclusion complexes formation. The emphasis was on the influence of the aqueous phase pH value, the drug- $\beta$ -CD molar ratio and the organic solvent type on complex formation. The mass spectrometry investigation included characterization of the formed complex drug: $\beta$ -CD at different molar ratios (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10), and at different pH values of the aqueous phase (5, 7 and 9) using triple quadrupole mass analyzer. The mobile phase and solvent in which the complexes were formed consisted of acetonitrile and water mixture (50:50, v/v) and methanol and water mixture (50:50, v/v). Measurements of these complexes signal intensity after electrospray ionization in negative mode. Observed  $m/z$  values indicated formation of drug- $\beta$ -CD in 1:1 ratio at all pH values of water phase and independently of organic solvent type and  $\beta$ -CD ratio. It was noted that formed complex signal intensity increased only by increasing  $\beta$ -CD ratio.

**Keywords:** mass spectrometry, inclusion complex, beta-cyclodextrins, sartans.

---

## **Bezbednost primene lekova koji se koriste u terapiji HIV infekcije**

**Milena Anđelković<sup>1</sup>, Aleksandra Buha<sup>2</sup>, Predrag Vukomanović<sup>3</sup>,  
Vesna Matović<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> Zdravstveni centar „Kosovska Mitrovica”, Aneri Dinana bb,  
38220 Kosovska Mitrovica, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za toksikologiju „Akademik  
Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

<sup>3</sup> ZUA „LEKO-VITA”, Kralja Petra I 248, 11400 Mladenovac, Srbija

\*Autor za korespondenciju: Vesna Matović, e-mail: vevodi@pharmacy.bg.ac.rs  
tel: +381 113951251

---

### **Kratak sadržaj**

Virus humane imunodeficijencije, izolovan zahvaljujući istraživačima Paster Instituta 1983. godine, uzročnik je milionskih žrtava u XXI veku. Kako inicijalna monoterapija nije uspela da pokaže zavidne rezultate, razvojem visoko aktivne antiretrovirusne terapije započeta je nova era HIV terapije. Nov pristup lečenju produžio je životni vek obolelih, smanjio pojavu rezistencija kao i stopu morbiditeta i mortaliteta obolelih. Antiretrovirusna terapija je doživotna i nosi sa sobom ozbiljne neželjene i toksične efekte. Mitohondrijska toksičnost može se ispoljiti kao periferna lipoatrofija, hepatična steatoza, laktična acidoza, neuropatija i miopatija. Metabolički poremećaji udruženi sa lipodistrofijom uključuju hipertrigliceridemiju, hiperholestirolemiju, insulinsku rezistenciju i abnormalnu glukoznu toleranciju. Hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, ostepenija, pojava raša i smetnje na nivou gastrointestinalnog trakta takođe se mogu javiti pri primeni antiretrovirusne terapije. Cilj ovoga rada je bio da da prikaz najznačajnijih neželjenih i toksičnih efekata lekova koji se koriste u terapiji HIV-a.

**Ključne reči:** antiretrovirusna terapija, toksičnost

---

## Uvod

Sindrom stečene imunodeficijencije (*Acquired Immunodeficiency Sindrom, AIDS*) je najteža manifestacija infekcije izazvane virusom humane imunodeficijencije (*Human Immunodeficiency Virus, HIV*). Broj osoba zaraženih HIV infekcijom je u stalnom porastu na šta ukazuju podaci Agencije EU za borbu protiv HIV-a (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, UNAIDS*): 1995. godine je zabeleženo 19 miliona slučajeva zaraženih osoba, 2005. godine 32 miliona, dok je 2014. godine bilo zaraženo čak 34 do 41 milion ljudi (1). Međutim, zahvaljujući antiretrovirusnoj terapiji, koja je zasigurno jedan od najznačajnijih trijumfa borbe protiv bolesti savremenog čoveka, neizbežnu smrt zaraženih ovim virusom zamenila je hronična bolest.

Centar za kontrolu bolesti (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) je 1981. godine ukazao na tada nov slučaj pneumonije čiji je uzročnik bila protozoa *Pneumocystis carinii*, a iste godine su registrovani i prvi slučajevi Kaposi sarkoma. Istraživači sa Instituta Paster u Francuskoj uspeali su 1983. godine da izoluju HIV virus koji je doveo da imunodeficijencije i posledičnog razvoja pneumonije i Kaposi sarkoma. *Zidovudin* je bio prvi lek koji je uveden u terapiju HIV infekcije 1987. godine. Kako monoterapija nije pokazala zavidan rezultat, 1992. godine počinje da se primenjuje tzv. „koktel” terapija što ovu godinu čini prekretnicom terapije HIV infekcije. Primena najmanje dva leka smanjila je pojavu rezistencije. Veliki korak napred u lečenju HIV infekcije desio se 1995. godine kada je u terapiju uveden *sakvinavir*, prvi lek iz grupe inhibitora proteaze, čime je započeta era visoko aktivne antiretrovirusne terapije (*Highly Active Antiretrovirat Therapy, HAART*) (2).

## Antiretrovirusni lekovi

Prema mehanizmu delovanja i mestu dejstva, antiretrovirusni lekovi koji se danas koriste u terapiji HIV infekcije se dele u nekoliko grupa (Tabela I). Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NIRT) i nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NNIRT) blokiraju sintezu virusne DNK dovodeći do kompetitivne odnosno nekompetitivne inhibicije enzima DNK zavisne RNK polimeraze tzv. reverzne transkriptaze. Meta lekova iz grupe inhibitora proteaze (IP) je enzim proteaza čijom se kompetitivnom i selektivnom inhibicijom sprečava sinteza strukturnih i regulatornih proteina virusa. Lekovi iz grupe inhibitora integraze blokiraju ključan enzim HIV-a koji je odgovoran za inkorporaciju virusnog genoma u genom domaćina, enzim integrazu. Posebnu grupu čine lekovi koji imaju za cilj da spreče ulazak virusne čestice u ćeliju domaćina blokirajući vezivanje glikoproteina lipoproteinskog omotača HIV-a (gp120) za ko-receptor (CCR5), dok izvesni lekovi inhibiraju fuziju tako što blokiraju glikoprotein lipoproteinskog omotača HIV-a (gp41) (3,4,5).

**Tabela I** Antiretrovirusni lekovi**Table I** Antiretroviral drugs

Grupa antiretrovirusnih lekova	Najznačajniji predstavnici
Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NIRT)	<i>zidovudin, didanozin, stavudin, lamivudin, abakavir, tenofovir, emtricitabin</i>
Nenuklozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NNIRT)	<i>efavirenz, nevirapin, etravirin, delaviridin, rilpivirin</i>
Inhibitori HIV proteaze (IP)	<i>indinavir, ritonavir, fosamprenavir, darunavir, sakvinavir, tipranavir, atazanavir, nelfinavir</i>
Inhibitori HIV integraze	<i>raltegravir, dolutegravir, elvitegravir</i>
Inhibitori ulaska/fuzije	<i>maravirok/enfuvirtid</i>

Zbog nedovoljne efikasnosti, razvoja rezistencije, ali i toksičnosti pojedinačnih grupa lekova, već duži niz godina se u terapiji HIV infekcije koristi kombinacija različitih grupa lekova poznata pod nazivom visoko aktivna antiretrovirusna terapija. Uobičajena kombinacija obuhvata dva leka iz grupe NIRT sa jednim lekom iz grupe NNIRT ili IP. Međutim, i pored postignutog značajnog napretka u tretmanu HIV infekcije, brojni neželjeni i toksični efekti vezuju se za primenu ovih lekova.

### Neželjeni i toksični efekti antiretrovirusnih lekova

Najznačajniji neželjeni i toksični efekti antiretrovirusnih lekova vezani za starije lekove iz grupe NIRT su mitohondrijska toksičnost (koja je ređa kod novijih lekova iz ove grupe kao što su *lamivudin, tenofovir* i *emtricitabin*), lipodistrofija i metaboličke karakteristike udružene sa lipodistrofijom (promena lipidnog statusa, insulinska rezistencija, hiperglikemija) koje su pripisane grupama lekova NIRT i IP (4,6).

## **Mitohondrijska toksičnost**

Terapija lekovima iz grupa NIRT i NNIRT može dovesti do različitih toksičnih efekata prvenstveno usled inhibicije enzima mitohondrijske DNK polimeraze  $\gamma$ . Inhibicijom ovog enzima ometa se sinteza esencijalnih proteina respiratornog lanca mitohondrija uz akumulaciju disfunkcionalnih mitohondrijskih proteina što rezultira gubitkom sposobnosti mitohondrija da obavljaju osnovne metaboličke funkcije kao što su oksidativna fosforilacija i oksidacija masnih kiselina. Poremećaj oksidativne fosforilacije rezultira u povećanoj produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta usled čega dolazi do oštećenja proteina, lipida i DNK. Redukovana sinteza ATP-a i porast nivoa slobodnih radikala narušava funkciju mitohondrija uz posledično povećanje anaerobnog metabolizma. Glikolizom nastao piruvat se konvertuje u laktat, što se kod pacijenata reflektuje povećanjem plazmatskog nivoa laktata (laktična acidemija ili hiperlaktatemija), sa ili bez pojave acidoze. Na nivou mitohondrija može doći i do poremećaja procesa oksidacije masnih kiselina; slobodne masne kiseline se akumuliraju i metabolišu do triglicerida, a višak triglicerida akumulira u jetri, dovodeći do steatoze (4,6,7,8).

Literaturni podaci ukazuju da se mitohondrijska toksičnost uzrokovana terapijom lekovima iz grupa NIRT može ispoljiti kao periferna lipoatrofija, hepatična steatoza, laktična acidoza, periferna neuropatija, miopatija, a u ređim slučajevima može rezultirati pankreatitisom, kardiomiopatijom, renalnom tubularnom acidozom i neonatalnom encefalopatijom, kao i eventualnom osteopenijom. Od navedenih, u najozbiljnije poremećaje spadaju hepatična steatoza i pankreatitis, kod kojih su dokazani i najveći nivoi laktata (4,6,7).

Mitohondrijsku DNK polimerazu  $\gamma$  inhibiraju sledeći lekovi: zalcitabin> didanozin> stavudin> zidovudin> lamivudin> abakavir = tenofovir (4,9).

## **Sindrom redistribucije masti**

Sindrom redistribucije masti, često nazvan lipodistrofija, javlja se kod pacijenata čija terapija obuhvata inhibitore proteaze i NIRT, posebno kada se lekovi iz ove dve grupe daju zajedno. Redistribuciju masnog tkiva karakteriše gubitak perifernog potkožnog masnog tkiva lica i ekstremiteta, uvećanje visceralnog masnog tkiva abdomena i nakupljanje masnog tkiva u dorzocervikalnoj regiji („buffalo hump”) i u predelu grudi. Učestalost lipodistrofije posle jednogodišnje terapije je u rasponu od 10 do 64% (7,8,10). Metaboličke karakteristike koje su udružene sa lipodistrofijom su promena lipidnog statusa, insulinska rezistencija sa pojavom dijabetes melitusa tip 2 (8-10%) ili abnormalne glukozne tolerancije (15-40%), laktična acidemija i porast jetrinih transaminaza. Inhibitori proteaze se predominantno dovode u vezu sa promenom lipidnog statusa i insulinskom rezistencijom, dok nukleozidni analozi najpre uzrokuju

laktičnu acidemiju. *Stavudin* je vodeći uzročnik lipodistrofije naspram *zidovudina*, *abakavira* i *tenofovira* koji ređe dovode do ovog poremećaja (6).

## **Dislipidemija**

Rezultati studija u kojima su praćeni nivoi lipidnih parametra pri antiretrovirusnoj terapiji ukazuju da je prevalenca hiperlipidemije posle jednogodišnje primene iznosila oko 50% (8). Iako je dislipidemija generalno vezana za primenu lekova iz grupe inhibitora proteaze, Thompson i saradnici izračunali su prevalencu hipertrigliceridemije od oko 8% kada su iz antiretrovirusne terapije inhibitori proteaze izostavljeni (10,11).

Uočenu dislipidemiju pri antiretrovirusnoj terapiji karakterišu porast ukupnog holesterola sa smanjenim vrednostima high-density lipoprotein (HDL) holesterola, povećanim vrednostima triglicerida i low-density lipoprotein (LDL) holesterola (6,7,8,12). Takođe, pri primeni inhibitora proteaze uočena je povećana sinteza uz smanjen klirens very-low density (VLDL) holesterola, povećana sinteza uz redukovan katabolizam apolipoproteina B kao i povećanje nivoa malih gustih LDL čestica, lipoproteina a, apolipoproteina C-III i E. Ovakav trend promena lipidnih parametra pri primeni IP objašnjava se, sa jedne strane strukturnom homologijom od oko 60% između katalitičkog regiona HIV proteaze za koji se lekovi iz grupe IP vezuju, sa dva proteina koja učestvuju u metabolizmu lipida, dok sa druge strane, inhibicijom proteozoma (13,14). *Ritonavir*, *nelfinavir* i *sakvinavir* su potentni inhibitori proteozoma pri čemu je inhibirana proteozomalna degradacija apolipoproteina B (13).

## **Poremećaj nivoa glukoze**

Hiperglikemija, intolerancija na glukozu (15-40%), insulinska rezistencija i dijabetes melitus tip 2 (8-10%) uočeni su kod HIV pacijenata na režimu antiretrovirusne terapije, pri čemu je za IP dominantna pojava insulinske rezistencije (6). Inhibitori proteaze redukuju aktivnost GLUT-4 receptora koji su odgovorni za unos glukoze u adipocite, miocite i skeletne mišiće među kojima je *indinavir* snažan kompetitivni inhibitor GLUT-4 receptora (6,8,13,15). Takođe, lekovi iz grupe IP smanjuju nivo adiponektina (6,13). Sa druge strane, povećanje nivoa visceralnog i abdominalnog masnog tkiva je u pozitivnoj korelaciji sa insulinskom rezistencijom (6,7). Nezavisno od lekova, i sam virus HIV-a direktno negativno deluje na  $\beta$  ćelije pankreasa i na sekreciju insulina te ometa normalan metabolizam glukoze (7).

## **Kardiovaskularne bolesti**

Poremećaj lipidnog statusa, abnormalnost nivoa glukoze, oksidativni stres, redistribucija masnog tkiva u predelu abdomena, dobro su poznati faktori rizika za kardiovaskularne bolesti. Prospektivna studija procene kardiovaskularnog rizika pri antiretrovirusnoj terapiji obuhvatila je primenu jednog ili dva leka iz grupe NIRT sa

jednim lekom iz grupe NNIRT ili IP. Ova studija je utvrdila incidencu 3.5 slučaja infarkta miokarda na 1000 osoba na godišnjem nivou. Incidenca raste sa produženom primenom antiretrovirusne terapije i za svaku godinu relativan rizik iznosi 1.26 (6,16). Sa druge strane, terapija koja obuhvata lekove iz grupe IP imala je veću verovatnoću pojave infarkta miokarda za 2.5 puta (14).

Pojava aterosklerotskih plakova femoralne i karotidne arterije, nezavisna od primene lekova iz grupe IP, pokazana je u jednoj kohortnoj studiji od 168 HIV pozitivnih osoba (14,17). Ista studija je ukazala na pozitivnu korelaciju između pojave aterosklerotskih plakova sa razvojem endotelne disfunkcije i zadebljanja zida arterija (6,14,15). Za razliku od ove kohortne studije, Maggi i saradnicu su pokazali visoku prevalencu, veću od očekivane, lezija karotide kod pacijenata koji su u terapiji koristili lekove iz grupe IP (14,18). Shodno dobijenim rezultatima, nameće se pitanje da li sama HIV infekcija ima udela u tome ili su i lekovi iz HAART uzročnici ove pojave? Sa jedne strane, infekcija izazvana HIV-om indukuje aktivaciju inflamatornog odgovora uz produkciju citokina kao što su faktor nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transformišući faktor rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), nuklearni faktor-kB (NF-kB), interleukin-6 (IL-6), vaskularni celularni adhezivni molekul-1 (VCAM-1), intercelularni adhezivni molekul-1 (ICAM-1), koji mogu inicirati aterosklerotski proces, dok sa druge strane, lekovi iz grupe inhibitora proteaze interferiraju sa istim citokinima (8,14,19).

## Neuropatija i miopatija

Antiretrovirusnu terapiju prati najmanje pet oblika periferne neuropatije: distalna simetrična polineuropatija, inflamatorna demijelinizaciona polineuropatija, mononeuritis multipleks, progresivna poliradikulopatija i autonomna neuropatija. Inflamatornu demijelinizacionu neuropatiju prate progresivna slabost, parestezija i arefleksija. Periferna neuropatija se predomenantno javlja pri terapiji lekovima iz grupe NIRT (*didanozin*, *stavudin*). Prevalenca neuropatije iznosi 25.3% kada terapija obuhvata *stavudin* zbog čega je WHO 2006. godine preporučila zamenu ovog leka u antiretrovirusnoj terapiji *zidovudinom* ili *tenofovirom* (4,9).

Miopatija se manifestuje generalizovanim bolom mišića, umorom, slabošću proksimalnih mišića i mialgijom. Atrofija mišića i povećanje serumskih vrednosti enzima kreatin kinaze ukazuju na oštećenje mišića. Prevalenca miopatije je oko 17% pri terapiji koja obuhvata *zidovudin*. U osnovi miopatije su, pored inhibicija mitohondrijske DNK polimeraze  $\gamma$ , oksidativan stres, inhibicija mehanizma sinteze ATP-a, deplecija ćelijskog L-karnitina i apoptoza (4,8,20).

## Hepatotoksičnost

Terapiju HIV infekcije može da prati hepatotoksičnost koja se klinički manifestuje hepatitisom, hepatičnom nekrozom i steatozom. Lekovi iz grupe inhibitora



proteaza su vodeći uzročnici hepatotoksičnosti. U prospektivnoj kohortnoj studiji inicijalna terapija *ritonavira* kod 30% pacijenata ispoljila je hepatotoksičnosti, dok svega 6 do 7% pri inicijalnoj terapiji *sakvinavira*, *nelfinavira* ili *indinavira* (7,21). Reiser i saradnici su 2001. godine (22) hepatotoksičnost i povećanje nivoa serumskih transaminaza uočili pri primeni lekova iz grupa NIRT i NNIRT. Verovatnoća je iznosila 8.9% pri primeni *nevirapina*, 10.8% kod *efavirensa* te 12% za lekove iz grupe NIRT (*stavudin*, *didanozin*). Znaci i simptomi hepatotoksičnosti zavise od težine i stepena oštećenja jetre pa se mogu ispoljiti nespecifičnim znacima od strane gastrointestinalnog trakta ali i pojavom žutice i hepatomegalijom (7).

## **Hepatična steatoza, hiperlaktatemija i laktična acidoza**

Pojava hepatične steatoze vezana je za primenu lekova iz grupe NIRT. Mehanizam nastanka hepatične steatoze uslovljen je smanjenom  $\beta$  oksidacijom masnih kiselina, dok je mehanizam nastanka laktične acidoze i hiperlaktatemije usko vezan za smanjenu oksidativnu fosforilaciju uz akumulaciju piruvata koji se konvertuje do laktata.

Narušavanje homeostaze laktata manifestuje se kao asimptomatska hiperlaktatemija koja može progredirati do životno ugrožavajuće laktične acidoze. Prvi put laktična acidoza uočena je kod HIV pozitivnih osoba čija se terapija sastojala od *didanozina* ili *zidovudina*. Mnogi od njih su imali masivnu hepatičnu steatozu i otkazivanje jetre, što je rezultovalo letalnim ishodom u kratkom vremenskom periodu (7,23). Prevalenca laktične acidoze procenjene od strane Fortgang i saradnika iznosila je 1.3 na 1000 pacijenata na godišnjem nivou, pri čemu je prevalenca izračunata pri monoterapiji sa lekovima iz grupe NIRT (7,24). Iako redak, ovaj ozbiljan sindrom kod 20 do 30% obolelih pratila je blaga do umerena asimptomatska hiperlaktatemija (nivo laktata  $\leq 2.5$  mmol/l bez acidemije) koja se javila nekoliko nedelja po započetoj terapiji i obično je bila prolaznog karaktera. Većina pacijenata sa asimptomatskom hiperlaktatemijom je stabilna i ne razvija simptomatsku laktičnu acidozu (7,23).

Iako je prvobitno uočena kod monoterapije i u periodu pre HAART ere, Moore i saradnici su u prospektivnoj studiji pokazali da i HAART može dovesti do razvoja hiperlaktatemije (asimptomatske). Takođe, uočili su da terapija NIRT, posebno primena *stavudina*, povećava rizik fulminantne laktične acidoze i hepatične steatoze (10,25).

Ozbiljna laktična acidoza (nivo laktata  $> 5$  mmol/l sa acidemijom) je reda, i javlja se sa verovatnoćom od 1.5 do 2.5%. Ostali lekovi iz grupe NIRT, NNIRT i IP nisu dovedeni u vezu sa povećanim rizikom od hronične hiperlaktatemije (10,23).

Kliničke manifestacije hiperlaktatemije su nespecifične i obuhvataju abdominalne bolove, gubitak apetita, nauzeju, povraćanje, dispneu, tahipneu, disaritmiju i promenu mentalnog statusa (4). Težina bolesti korelira sa vrednostima serumskih laktata.

Incidenca letaliteta je izrazito visoka pri vrednosti laktata iznad 10 mmol/l (80%), dok za vrednosti laktata od 5 do 10 mmol/l iznosi 5-10% (6,23,26).

## **Osteonekroza, osteopenija i osteoporoza**

Prvi slučaj osteonekroze kod HIV pozitivnih osoba bio je slučaj HIV pozitivne žene kod koje je opisana avaskularna nekroza više kostiju. Osteonekroza se retko javlja, i u jednoj studiji koja je obuhvatila 508 HIV pozitivnih osoba, pri čemu je njih 280 primalo trojnu terapiju, javila se samo kod šest osoba (7,27). Osteoporoza je u pre HAART eri proučavana kao posledica sa jedne strane loše ishrane HIV pozitivnih osoba, a sa druge strane hronične infekcije sa stalnim povećanim vrednostima citokina. Po uvođenju HAART, Tebas i saradnici su 2000. godine (28) dobili pozitivan rezultat osteoporoze ili osteopenije kod 50% ispitanika koji su primali lekove iz grupe IP a 23% kod onih koji nisu primali IP (7).

Patofiziologija osteoporoze je još uvek nejasna. U nekim studijama dovodi se u vezu sa antiretrovirusnom laktičnom acidozom pri čemu fosfati imaju ulogu pufera. Takođe, lekovi iz grupe inhibitora proteaze inhibiraju hepatski citohrom P450 enzim koji učestvuje u metabolizmu vitamina D. Dusso i saradnici su u *in vitro* studijama pokazali da IP (*indinavir, ritonavir, nelfinavir*) inhibiraju konverziju 25-hidroksi vitamina D u 1,25-dihidroksi vitamin D (7,29). *Nelfinavir* i *sakvinavir* inhibiraju adipogenezu i osteogenezu, dok je za *nelfinavir* dodatno utvrđeno da stimuliše osteoklasnu aktivnost. Interakcija osteoklasta i/ili osteoblasta sa oslobođenim citokinima od strane aktiviranih T limfocita je još jedan od mogućih puteva nastanka osteoporoze (7,8,14).

## **Hipersenzitivnost i pojava raša**

Antiretrovirusnu terapiju, posebno lekove iz grupe NNIRT, karakteriše pojava raša (makulopapularan, eritematozan) koji može ali ne mora biti praćen groznicom. Obično se javlja u predelu trupa i ruku. Raš se javlja u prvim nedeljama terapije u formi blage, srednje ili pak ozbiljne pojave koja može ugroziti život. Prevalenca pojave raša pri primeni lekova iz grupe NNIRT kreće se u rasponu od 10 do 17% (19). Oko 16% osoba koji u terapiji koriste *nevirapin* suočeni su sa blagom do srednjom formom raša, a 6.5% sa ozbiljnom formom, uključujući Steven-Johnson sindrom i toksičnu epidermalnu nekrolizu (manje od 1%) (7,26).

NNIRT, *abakavir* i *amprenavir* mogu dovesti do pojave hipersenzitivne reakcije. Hipersenzitivnu reakciju, sa incidencom od 2.3-9% pri primeni *abakavira*, prate nespecifični znaci kao što su raš, malaksalost, groznica, rigor, mialgija, atralgija, abdominalni bolovi, porast vrednosti serumskih transaminaza, letargija, respiratorni distres, parestezija, edem, renalno ili hepatski otkazivanje koji mogu progredirati do fatalne anafilaktičke reakcije (4,7,19,26). Hipersenzitivna reakcija pri primeni

*abakavira* dovodi se u vezu sa prisustvom HLA-B5701 (human leukocyte antigen) alela te se pre uvođenja *abakavira* u terapiju preporučuje testiranje na ovu genetsku predispoziciju čime se rizik od pojave hipersenzitivne reakcije gotovo eliminiše (4,19).

Patogeneza hipersenzitivne reakcije je nepoznata. Brojni uzroci i mehanizmi su uključeni u njen nastanak, počevši od stepena imunodeficijencije i imunoaktivacije, dužine terapije i komplikacije, metaboličkog kapaciteta organizma kao i postojanja koinfekcija. Citokinima se takođe pridaje određeni značaj, posebno za pojavu mukokutanih promena, pri čemu osnovu čine citotoksični CD8+ T limfociti i makrofagi koji produkuju IL-6, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (6,26). Kod 50% pacijenata hipersenzitivna reakcija se povlači i bez prekida terapije. Terapiju je potrebno prekinuti u slučaju pojave hepatomegalije, izrazitog povećanja nivoa transaminaza, visoke telesne temperature kao i ekfolijacije (6,19,26).

*Enfuvirtid*, inhibitor fuzije, veoma retko izaziva hipersenzitivnu reakciju (manje od 1%) naspram lokalne reakcije koja se javlja pri aplikaciji leka. Injekcija *enfuvirtida* kod oko 98% pacijenata može biti okarakterisana infiltracijom eozinofila i neutrofila praćena bolom, pruritisom, eritemom i induracijom (4,6).

### **Efekti na gastrointestinalni trakt**

Abdominalni bolovi, nauzeja, povraćanje i dijareja prate primenu antiretrovirusnih lekova. Obično su prolaznog karaktera ali su jedan od vodećih uzroka prekida terapije. Neželjene efekte na gastrointestinalni trakt izazivaju lekovi iz grupe NIRT I IP. Takođe, uočeni su i pri primeni *maraviroka* i *raltegravira*. *Indinavir* kod oko 3% pacijenata može ispoljiti ezofagusni refluks (4,6,19).

### **Efekti na centralni nervni sistem**

*Efavirenz* ispoljava neželjan efekat na CNS (insomnia, somnolencija, poremećaj raspoloženja i koncentracije, manija) koji može da se javi kod 53% pacijenata na početku terapije (prvih nekoliko dana do nedelja). Takođe, kod 1% pacijenata mogu da se jave psihoze i suicidalne namere (4,6).

Iako niske incidence (13 od 6840), primenu *tipranavira* prati i pojava intrakranijalnog krvarenja. U osnovi ove hemoragije je smanjena agregacija trombocita (4,12,30).

### **Efekti na bubrege**

Asimptomatska kristaluria, akutni intersticijalni nefritis, obstruktivno akutno renalno otkazivanje i nefrolitijaza primećeni su kod primene *indinavira*. Prevalenca nefrolitijaze pri hroničnoj terapiji je oko 33% i javlja se zbog smanjene rastvorljivosti

leka. Rastvorljivost *indinavira* je zavisna od pH urina (visoka je rastvorljivost pri pH < 3.5) zbog čega se lek taloži u obliku kristala u bubrezima (4,23).

Primena *tenofovira* može dovesti do disfunkcije proksimalnih i distalnih tubula kao i do akutnog renalnog otkazivanja. Verhelst i saradnici su prvi opisali pojavu reverznog Fanconi-jevog sindroma i nefrogenog dijabetes insipidusa kod pacijenta koji je primao ovaj lek (23,31).

Renalna kalkuloza uočena je i kod nekih lekova iz grupe IP (*nelfinavir*, *sakvinavir*) (23).

## Zaključak

Virus humane imunodeficijencije je veliki problem na globalnom nivou. Kako iz godine u godinu poprima sve veće razmere, čovečanstvo je nemoćno da iskoreni infekciju koja poprima razmere epidemije. Sindrom stečene imunodeficijencije kao najteža posledica HIV infekcije odnosi velike žrtve među kojima ni deca nisu pošteđena. Veliki naponi se usmeravaju ka pronalaženju vakcine koja bi konačno stavila tačku na ovaj problem. U međuvremenu, antiretrovirusna terapija je postala efektivnija ali i kompleksnija uz brojne neželjene i toksične efekte koji ne zaobilaze gotovo nijedan organ. Iako se ne može poreći veliki napredak u sintezi novih antiretrovirusnih lekova kao i uspeh u suzbijanju virusne replikacije, neosporno je da postoje ograničenja i prepreke koja umanjuju sliku terapijskog uspeha.

## Literatura

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). People living with HIV (all ages). <http://aidsinfo.unaids.org/> (Accessed/poslednji pristup: 10. 05. 2016.)
2. Lange MA J, Ananworanich J. The discovery and development of antiretroviral agents. *Antiviral Therapy* 2014; 19(3): 5-14.
3. US Food and Drug Administration. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. <http://www.fda.gov/forpatients/illness/hiv/aids/treatment/ucm118915.htm> (Accessed/poslednji pristup: 10. 05. 2016.)
4. Margolis MA, Heverling H, Pham AP, Stolbach A. A Review of the Toxicity of HIV Medications. *J. Med. Toxicol* 2014; 10: 26-39.
5. Pang W, Tam SC, Zheng YT. Current peptide HIV type-1 fusion inhibitors. *Antiviral Chemistry&Chemotherapy* 2009; 20: 1-18.

6. Carr A. Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. *Nature reviews. Drug discovery* 2003; 2: 624-633.
7. Montessori V, Press N, Harris M, Akagi L, Montaner SGJ. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ* 2004; 170(2): 229-238.
8. Herman JS, Easterbook PJ. The metabolic toxicities of antiretroviral therapy. *Int J of STD & AIDS* 2001; 12: 555-564.
9. Nila A, Setiwati IH, Andrajati R, Djauzi S. Evaluation of side effects events peripheral neuropathy and lipodystrophy in patients with HIV/AIDS who used stavudine in antiretroviral regimens. *Elsevier HIV & AIDS Review* 2013; 12: 4-8.
10. Smith YK. Selected Metabolic and Morphologic Complication Associated with Highly Active Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185(2): 123-127.
11. Thompson M, Gable J, Lawrence J, Rimland D, McCarthy W and the AIDS Research Consortium of Atlanta ASD Investigators. The prevalence of hypertriglyceridemia in HIV infected individuals who have been exposed to various antiretroviral drug classes since January 1996. 6<sup>th</sup> Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, Jan 31 - Feb 4, 1999. Abstract book: 649.
12. El-Sadr WM, Mullin CM, Carr A, Gibert C, Rappoport C, Visnegarwala F et al. Effects of HIV disease on lipid, glucose and insulin levels: results from a large antiretroviral - naive cohort. *HIV Medicine* 2005; 6: 114-121.
13. Wang Y, Chu Y, Zhengtong L. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS - Research and palliative care* 2015; 5: 95-104.
14. Anurad E, Semrad A, Berglund L. Human Immunodeficiency Virus and Highly Active Antiretroviral Therapy - Associated Metabolic Disorders and Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Metabolic syndrome and related disorder* 2009; 7: 401-409.
15. Giuseppe B. HIV infection, highly active antiretroviral therapy and the cardiovascular system. *Elsevier Cardiovascular Research* 2003; 60: 87-95.
16. Friis-Moller N et al. 10<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 10-14, 2003. Abstract book: 130.
17. Depairon M, Chessex S, Sudre P, Rodondi N, Doser N, Chave JP et al. Premature atherosclerosis in HIV-infected individuals-focus on protease inhibitor therapy. *AIDS* 2001; 15: 329-334.
18. Maggi P, Serio G, Epifani G, Fiorentino G, Saracino A, Fico C et al. Premature lesion of the carotid vessels in HIV-1 infected patients treated with protease inhibitors. *AIDS* 2000; 14: 123-128.
19. Hawkins T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Elsevier. Antiviral Research* 2010; 85: 201-209.
20. Scruggs RE, Naylor Dirks JA. Mechanisms of Zidovudine - induced mitochondrial toxicity and miopathy *Pharmacology* 2008; 82: 83-88.
21. Sulkowski MS, Thomas DL, Chaisson RE, Moore RD. Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection. *JAMA* 2000; 283(1): 74-80.

22. Reisler R, Liou S, Servoss JC, Robbins G, Theodore D, Murphy R et al. Incidence of hepatotoxicity and mortality in 21 adult antiretroviral treatment trials. ACTG liver disease focus group. 1<sup>st</sup> International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Buenos Aires, Jul 8-11, 2001. Abstract book: 43.
23. Berns J, Kasbekar N. Highly active antiretroviral therapy and the kidney: An update on antiretroviral medications for nephrologists. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 117-129.
24. Fortgang I, Belitsos P, Chaisson R, Moore R. Hepatomegaly and steatosis in HIV-infected patients receiving nucleoside analogue antiretroviral therapy. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1433-1436.
25. John M, Moore CB, James IR et al. Chronic hyperlactatemia in HIV-infected patients taking antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15: 717-723.
26. Carr A, Coopre D. Adverse effects of antiretroviral therapy *Lancet* 2000; 356: 1423-1430.
27. Roudiere L, Viard JP. Osteonecrosis of hip, lipodystrophy and antiretroviral treatment. *AIDS* 2000; 14(13): 2056
28. Tebas P, Powderly WG, Claxton S, Marin D, Tantisiriwat W, Teitelbaum SL et al. Accelerated bone mineral loss in HIV-infected patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14: 63-67.
29. Dusso A, Vidal M, Powderly WG, Yarasheski KE, Tebas P. Protease inhibitors inhibit in vitro conversion on 25(OH)-vitamin D to 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D. 2<sup>nd</sup> International workshop on adverse drug reaction and lipodystrophy, Toronto, Sep 13-15, 2000. Abstract book: 30.
30. Streeck H, Rockstroh J. Review of tipranavir in the treatment of drug-resistant HIV. *Therapeutic and clinical risk management* 2007; 3(4): 641-651.
31. Verhelst D, Monge M, Meynard JL, Fouquearay B, Mougnot B, Girard PM et al. Fanconi syndrome and renal failure induced by tenofovir: A first case report. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 1331-1333.

# Safety of antiretroviral drugs

Milena Anđelković<sup>1</sup>, Aleksandra Buha<sup>2</sup>, Predrag Vukomanović<sup>3</sup>,  
Vesna Matović<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Health Center „Kosovska Mitrovica”, Aneri Dinana bb,  
38220 Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>2</sup> University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology „Akademik  
Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> ZUA „LEKO-VITA”, Kralja Petra I 248, 11400 Mladenovac, Serbia

\*Author for correspondence: Vesna Matović, e-mail: [vevodi@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:vevodi@pharmacy.bg.ac.rs)  
tel: +381 113951251

---

## Summary

Human immunodeficiency virus (HIV), isolated in 1983 by Paster Institute researches, has been recognised as the cause of million fatalities in 21<sup>st</sup> century. Initial monotherapy failed to show promising results, however, with the development of highly active antiretroviral therapy new era of HIV treatment has started. This new approach resulted in extended life time, reduced development of virus resistance as well as morbidity and mortality of HIV patients. Antiretroviral therapy is longlife and connected with serious adverse and toxic effects. Mitochondrial toxicity can be manifested as periferal lipoatrophy, hepatic steatosis, lactic acidosis, neuropathy and miopathy. Metabolic features associated with lipodystrophy include hypertriglyceridaemia, hypercholesterolaemia, insuline resistance and abnormal glucose tolerance. Hepatotoxicity, nephrotoxicity, osteopenia, rash and gastrointestinal symptoms can also occur during antiretroviral therapy. The aim od this work was to present the most important adverse and toxic effects of drugs used in HIV therapy.

**Keywords:** antiretroviral therapy, toxicity

---

## **Primena imunoafinitetnih kolona u pripremi različitih uzoraka namirnica za određivanje mikotoksina**

**Marijana Ćurčić<sup>1\*</sup>, Žaklina Ljubičić<sup>2</sup>, Gorica Vuković<sup>3</sup>,  
Biljana Antonijević<sup>1</sup>, Zorica Bulat<sup>1</sup>, Vesna Matović<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Zavod za javno zdravlje Sremska Mitrovica, Stari šor 47, Sremska Mitrovica

<sup>3</sup>Gradski Zavod za javno zdravlje Beograd, Bulevar despota Stefana 54a, Beograd

\*Autor za korespondenciju: Marijana Ćurčić, tel: +381113951248;

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

---

### **Kratak sadržaj**

U analitičkim metodama koje se koriste u monitoringu posebna pažnja se pridaje pripremi uzorka, pa je i cilj ovog rada ispitivanje efikasnosti primene imunoafinitetnih kolona (IAC) za pripremu uzoraka kod određivanja aflatoksina i ohratoksina koje se zasnivaju na principu tečno-čvrste ekstrakcije. Koncentracija aflatoksina i ohratoksina određivana je u ukupno 56 uzoraka različitih namirnica: pšenica, kukuruz, pirinač, ječam i ostala žita (19 uzoraka), brašno i proizvodi od brašna od žita i dodaci za pekarsku industriju (7 uzoraka), voće i povrće (3 uzorka), lešnik, orah, badem, brašno od kokosa (4 uzorka), prženi kakaovac, kikiriki, čajevi, kafa (16 uzoraka), začini (4 uzorka) i meso i proizvodi od mesa (4 uzorka). Dobijeni rezultati ukazuju na prednost primene IAC kolona u pripremi uzoraka, prvenstveno je postignuto povećanje specifičnosti metode usled vezivanja ekstrahovanih analita za inkorporirana specifična antitela i ispiranje ostalih komponenti uzorka, koje mogu ometati dalju analizu. Prednost je generisanje male količine otpadnih organskih rastvarača i smanjenje izloženosti osoblja koje izvodi metodu hromatografskog određivanja mikotoksina. Posebno je od značaja postignuto povećanje osetljivosti metode jer je postignuto da kvantifikacioni limiti za određivanje aflatoksina i ohratoksina budu znatno niži od maksimalno dozvoljenih koncentracija ovih jedinjenja propisanih nacionalnim pravilnikom.

**Ključne reči:** mikotoksini, priprema uzorka, namirnice, imunoafinitetne kolone

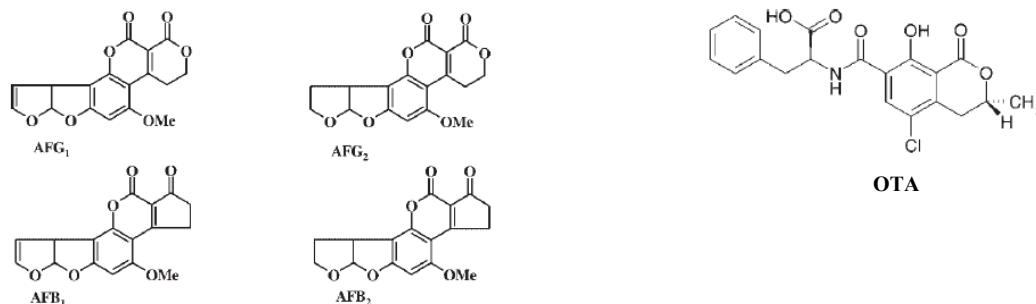
---



## 1. Uvod

Mikotoksini su mnogobrojna i hemijski raznovrsna grupa jedinjenja, sekundarnih metabolita gljivica, među kojima se po svom toksikološkom značaju izdvajaju aflatoksini (AFT) i ohratoksini (OTA). Proizvodi su *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta (1, 2), a za njihov nastanak su, osim prisustva spora određenih sojeva gljivica, važni i faktori iz životne sredine kao što su visoka vlažnost, temperatura ili fizičko oštećenje semena, što sve zajedno rezultuje kontaminacijom hrane za ljude i životinje tokom skladištenja i obrade (1-4). Do izloženost ljudi aflatoksinima i ohratoksina dolazi prvenstveno putem kontaminiranih namirnica, kao što su koštunjavo voće, sočivo, pasulj, grašak, kafa, kakaovac, čajevi, meso, mleko, dok se značajnim izvorom ohratoksina smatra i vino poreklom iz zemalja našeg okruženja (2, 3).

Hemijska struktura aflatoksina i ohratoksina se razlikuje (Slika 1; AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> i AFG<sub>2</sub> predstavljaju podgrupe AFT) i povezuje se sa njihovim toksičnim svojstvima. Toksičnost ovih jedinjenja se objašnjava građenjem halo-estara koji predstavljaju alkilirajuće agense ili epokside koji reaguju sa nukleofilnim centrima, posebno na DNK, te mogu da inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina, a takođe i sa nukleofilnim centrima enzima ili molekula uključenih u humoralni imunski sistem. Laktonski prsten se takođe smatra odgovornim za citotoksičnost i karcinogenost posredovane alkilovanjem, dok interakcija laktonskog prstena sa –SH grupama proteinskih struktura dodatno potencira toksičnost ovih jedinjenja (3, 4).



**Slika 1. Hemijske strukture aflatoksina i ohratoksina ispitivanih u ovom radu**  
**Figure 1. Chemical structure of examined aftaxins and ochratoxins**

Ciljni organ toksičnog dejstva aflatoksina je jetra gde se kao posledica akutnog trovanja primarno razvija nekroza, a usled produžene izloženosti hepatitis pa i ciroza (2-4). Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje karcinoma (**International Agency for Research on Cancer - IARC**) aflatoksini su svrstani u humane karcinogene (grupa 1), a osnov za ovakvu klasifikaciju je upravo učestalost razvoja karcinoma jetre (5).

Za razliku od aflatoksina, ohratoksini primarno deluju na bubreg gde oštećuju proksimalne tubule. Smatra se da su ovi efekti posredovani, između ostalog, i povećanom lipidnom peroksidacijom u mikrozomima bubrega (2-4). Prema IARC klasifikaciji, ohratoksini pripadaju grupi mogućih karcinogena za ljude (grupa 2B) što je zasnovano na podacima o pojavi karcinoma bubrega (5).

Maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) aflatoksina i ohratoksina u namirnicima u R. Srbiji utvrđene su važećim pravilnikom i za AFB1 iznose od 2 do 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , za sumu AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2 od 4 do 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dok je MDK za OTA od 2 do 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (6). U cilju zaštite zdravlja ljudi i bezbednosti hrane na tržištu Srbije, razvoj analitičkih metoda za određivanje koncentracije aflatoksina i ohratoksina u namirnicima ima veliki značaj u kontroli bezbednosti hrane i prevenciji izloženosti ljudi i životinja. U dostupnoj literaturi najčešće se sreću sledeće analitičke metode za određivanje mikotoksina: enzimski imunosorbent eseji, tankoslojna hromatografija i visoko efikasna tečna hromatografija spregnuta sa različitim vrstama detektora od kojih je za potvrđivanje najznačajnija masena spektrometrija. Zahtevi za osetljivost i tačnost konformativnih metoda date su kriterijumima Evropske regulative za pravilno izvođenje analitičkih metoda za određivanje mikotoksina (7). U analitičkim metodama koje se koriste u monitoringu posebna pažnja se pridaje pripremi uzorka u kojoj se najčešće se koriste multifunkcionalne, modifikovane QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) ili polimerne revrznno-fazne kolone za tečno-čvrstu ekstrakciju (4, 8, 9). Cilj ovog rada bio je ispitivanje efikasnosti primene tečno-čvrstih imunoafinitetnih kolona (IAC) za pripremu uzoraka kod određivanja aflatoksina i ohratoksina.

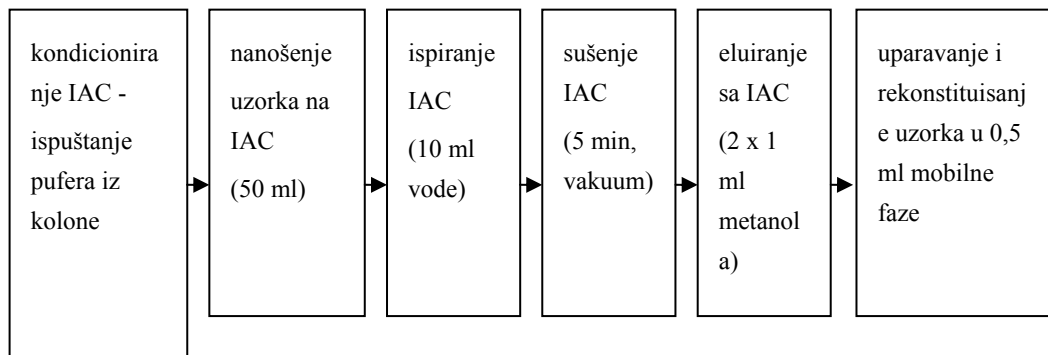
## 2. Eksperimentalni deo

U radu su korišćene hemikalije analitičkog stepena čistoće, nabavljene iz komercijalnih izvora. U osnovnom standardu smeše, aflatoksini su se nalazili u koncentracijama 2,02  $\mu\text{g}$  AFB1/ml, 2,03  $\mu\text{g}$  AFG1/ml, 0,5  $\mu\text{g}$  AFB2/ml, 0,54  $\mu\text{g}$  AFG2/ml u acetonitrilu. Opseg kalibracione krive za određivanje AFB1 i AFG1 je bio 0,20-10,10 ng/ml, a za određivanje AFB2 i AFG2 0,05-2,5 ng/ml. Osnovni standard ohratoksina koncentracije 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bio je rastvoren u smeši benzena i sirćetne kiseline (99/1; V/V), a opseg kalibracione krive za određivanje ohratoksina bio je 2,5-100 ng/ml.

Koncentracija aflatoksina i ohratoksina određivana je u ukupno 56 uzoraka različitih namirnica prema važećem pravilniku (6): pšenica, kukuruz, pirinač, ječam i ostala žita (19 uzoraka), brašno i proizvodi od brašna od žita i dodaci za pekarsku

industriju (7 uzoraka), voće i povrće (3 uzorka), lešnik, orah, badem, brašno od kokosa (4 uzorka), prženi kakaovac, kikiriki, čajevi, kafa (16 uzoraka), začini (4 uzorka) i meso i proizvodi od mesa (4 uzorka). Uzorci su bili: pšenična krupica, pirinač, soja, proizvodi od žitarica (pahuljice), kukuruz kokičar, kukuruzno brašno, kikiriki, kikiriki flips, snek proizvodi, lešnik pasta, seckani lešnik, crni čaj, crni čaj sa kamilicom i sa dodatkom jabuke i cimeta, zeleni čaj sa dodatkom limuna, domaći čajevi od nane, kamilice i hibiskusa, smeša za crni hleb, kukuruzni hleb, začini i hrana za decu.

Priprema uzoraka je vršena mlevenjem i homogenizacijom, a zatim ekstrakcijom mikotoksina iz 20 g homogenata sa 100 ml smeše metanola i vode (80/20; v/v). Ekstrakt (10 ml) je nakon filtriranja razblaživan sa 40 ml fosfatnog pufera (pH 7,2) i propuštao preko IAC kolone (*AflaCLEAN, LCTech, Product No 10514*) koja je pripremana ispiranjem destilovanom vodom (10 ml) i sušenjem u struji vazduha, a eluiranje je vršeno dva puta sa po 1 ml metanola. Mikotoksin, koji se nalazi vezan u koloni, eluira se metanolom koji najpre u potpunosti denaturiše strukturu antitela, a zatim dovodi do oslobađanja mikotoksina. Metanol se iz eluata uparava u struji azota, a ostatak se zatim rekonstituiše u 0,5 ml mobilne faze (Slika 2). Uzorci sa većim sadržajem masti su pripremani na opisan način, osim što je pre ekstrakcije dodavano 2 g NaCl radi isoljavanja (9).



**Slika 2. Procedura za pripremu uzoraka za analizu aflatoksina i ochratoksina primenom IAC kolona**

**Figure 2. Sample preparation procedure for determination of aflatoxins and ochratoxins using IAC columns**

Određivanje je vršeno metodom visoko efikasne tečne hromatografije sa fluorescentnim detektorom (HPLC-FLD) (*Agilent 1100, FLD*) (9). Za razdvajanje je korišćena kolona Zorbax Eclipse XDB C18, 4,6x150 mm, 5 µm (*Agilent, Part No 993967-902*), a mobilnu fazu činila je smeša vode, acetonitrila i metanola u odnosu 60:20:20; V/V/V, pri protoku od 1,2 ml/min. Za prevođenje aflatoksina B1 u

fluorescentni aflatoksin B<sub>2a</sub> korišćen je UV-reaktor za postkolonsku derivatizaciju. Parametri na osnovu kojih je procenjivan kvalitet metode određivanja aflatoksina i ohratoksina korišćenjem IAC kolona za pripremu uzorka bili su osetljivost, linearnost, preciznost, tačnost, specifičnost, selektivnost, primenjivost i efikasnost metode (7).

### 3. Rezultati i diskusija

Primenjena metoda za određivanje aflatoksina i ohratoksina koja je obuhvatala pripremu uzoraka korišćenjem IAC kolona i određivanje sa HPLC-FD lineama je u opsegu ispitivanih koncentracija. Metoda je precizna, na šta ukazuje koeficijent varijacije koji ne prelazi 10% ni za jedan od ispitivanih analita, a retencionna vremena, kvantifikacioni limiti i tačnost određivanja ispitivanih mikotoksina prikazani su u Tabeli I *Recovery* vrednosti određene „spajkovanjem uzoraka” ukazuju da je primena ove metode zadovoljavajuća za AFB<sub>2</sub> i OTA ali i da postoji potreba za daljom optimizacijom metode.

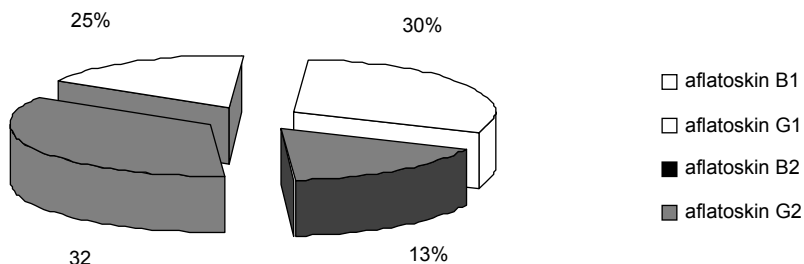
**Tabela I** Hromatografski parametri ispitivanih mikotoksina nakon pripreme uzoraka korišćenjem IAC kolone

**Table I** Chromatographical parameters of determined micotoxins after sample preparation using IAC columns

	AFG1	AFG2	AFB2	AFB1 (AFB <sub>2a</sub> )	OTA
retenciono vreme (min)	6	5	8	7	4
limit detekcije (µg/kg)	0,03	0,01	0,03	0,01	0,08
limit kvantifikacije (µg/kg)	0,1	0,02	0,1	0,02	0,25
relativna standardna devijacija (%)	16,98	10,52	14,16	6,39	7,21
tačnost (%)	46,32	10,09	70,74	28,61	101,07

Prema standardu SRPS CEN/TR 16059:2012 i Evropskoj regulativi za pravilno izvođenje analitičkih metoda za određivanje mikotoksina, rezultati ukazuju na efikasnost primene IAC kolona u pripremi uzoraka što je potvrđeno linearnošću za sve ispitivane opsege koncentracija mikotoksina ( $r \geq 0,999$ ). Postignuto povećanje pouzdanosti metode, prvenstveno povećanjem specifičnosti i selektivnosti metode, objašnjava se vezivanjem ekstrahovanih analita za inkorporirana specifična antitela, kao

i ispiranjem ostalih komponenti uzorka koje mogu ometati dalju analizu, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (4, 10, 11). Posebno je od značaja postignuto povećanje osetljivosti metode jer je postignuto da kvantifikacioni limiti za određivanje aflatoksina i ohratoksina budu znatno niži od MDK vrednosti ovih jedinjenja propisanih važećim pravilnikom (6). Još jedna od prednosti primene IAC kolona u odnosu na primenu tečno-tečne ekstrakcije je generisanje manje količine otpada od organskih rastvarača, dok se pri tečno-tečnoj ekstrakciji generiše mnogo veća količina otpadnih organskih rastvarača. Takođe je od značaja manja mogućnost izloženosti organskim rastvaračima osoblja laboratorije koje radi na pripremi uzoraka za određivanje mikotoksina (6, 9-11). IAC kolone se čuvaju na sobnoj temperaturi, međutim vreme upotrebe je ograničeno na 12 meseci od proizvodnje, a cena im je visoka što može predstavljati ograničavajući faktor za njihovu primenu. Metoda određivanja aflatoksina i ohratoksina uz primenu IAC kolona je specifična, precizna i osetljiva, a upravo primena IAC kolona čini metodu jednostavnom za izolovanje aflatoksina i ohratoksina, što i drugi autori navode kao jednu od najvećih prednosti tehnika za pripremu uzorka koje se zasnivaju na principu imunoafinitetne hromatografije (6, 11, 12). Prema zahtevima SRPS CEN/TR 16059:2012, ispitivana metoda ispunjava zahteve pouzdanosti, primenljivosti i nesigurnosti merenja, ipak, rezultati upućuju na potrebu za daljom optimizacijom (10).



**Slika 3. Udeo pojedinačnih aflatoksina čije su koncentracije iznad vrednosti MDK**  
**Figure 3. Contribution of single aflatoxins which concentrations are above MAC values**

U odnosu na ukupan broj uzoraka aflatoksini su određeni u koncentracijama većim od vrednosti MDK u tri uzorka, lešnik pasta i snek proizvodima, dok udeo

pojedinačnih aflatoksina u uzorcima u kojima njihova koncentracija prelazi MDK vrednost iznosi od 13% za aflatoksin B1 do 32% za aflatoksin G1 (Slika 3). Detekcija aflatoksina u koncentraciji iznad vrednosti MDK u samo tri ispitivana uzorka ukazuje na dobre uslove skladištenja ispitivanih namirnica, prvenstveno na odgovarajuću vlažnost i temperaturu. Za razliku od aflatoksina, prisustvo ohratoksina primenjenom metodom nije utvrđeno ni u jednom uzorku u koncentraciji većoj od MDK vrednosti.

#### **4. Zaključak**

U prikazanom radu potvrđena je efikasnost primene IAC kolona za pripremu uzoraka za određivanje aflatoksina i ohratoksina HPLC/FLD metodom. *Recovery* vrednosti ukazuju da je primena ove metode zadovoljavajuća za AFB2 i OTA i da postoji potreba za daljom optimizacijom metode. Prednost primeni IAC kolona daje generisanje male količine otpadnih organskih rastvarača i smanjenje izloženosti osoblja koje izvodi metodu hromatografskog određivanja mikotoksina. Posebno je od značaja što su postignuti kvantifikacioni limiti za određivanje aflatoksina i ohratoksina znatno niži od MDK vrednosti ovih jedinjenja propisanih važećim pravilnikom.

#### **5. Zahvalnica**

Istraživanja su sprovedena u okviru projekta III46009 Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja.

#### **6. Literatura**

1. Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 632(2): 168-80.
2. Sinovec Z, Sinovec S, Resanović R. Mikotoksini, pojava, efekti i prevencija. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2006.
3. FAO, 1995. Food and Agriculture Organization. Worldwide regulations for mycotoxins: A compendium. FAO Food and Nutrition Paper. 1995.
4. Sforza S, Dall'Asta C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass spectrometry Reviews*. 2006; 25(1): 54-76.

5. IARC, 1993. International Agency for cancer Research – IARC: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. 1993; 56: 397-488.
6. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja („Službeni glasnik Republike Srbije”, 29/2014, 37/2014 – ispravka, 39/2014; 72/2014, 80/2015, 84/2015 i 35/2016).
7. Commission of the European Communities - Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union 2006; L70:12–34
8. Wacoo AP, Wendiro D, Vuzi PC, Hawumba JF. Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops. Journal of Applied Chemistry. 2014; 13: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/706291>.
9. Barbas C, Dakus A, Majors RE. Separation of Aflatoxins by HPLC, Environmental, Food Safety. [http://www.agilent.com/chem/food\\_safety/januar\\_2009](http://www.agilent.com/chem/food_safety/januar_2009). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM/CITAC Guide EURACHEM web site: <http://www.uni-stuttgart.de/eurachem/pdf/valid.pdf/2005>.
10. Standard SRPS CEN/TR 16059:2012. Analiza hrane — Kriterijumi performansi metoda analize za određivanje mikotoksina, koje su validovane u jednoj laboratoriji. 2012.
11. Wilcox J, Donnelly C, Leeman D, Marley E. The use of immunoaffinity columns connected in tandem for selective and cost-effective mycotoxin clean-up prior to multi-mycotoxin liquid chromatographic–tandem mass spectrometric analysis in food matrices. Journal of Chromatography A. 2015; 1400: 91-7.
12. Xie J, Peng T, He JL, Shao Y, Fan CL, Chen Y, Jiang WX, Chen M, Wang Q, Pei XY, Ding SY. Preparation and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of aflatoxin B 1 in 13 kinds of foodstuffs. Journal of Chromatography B. 2015; 998: 50-6.

# **Application of immunoaffinity columns for different food item samples preparation in micotoxins determination**

**Marijana Ćurčić<sup>1\*</sup>, Žaklina Ljubičić<sup>2</sup>, Gorica Vuković<sup>3</sup>,  
Biljana Antonijević<sup>1</sup>, Zorica Bulat<sup>1</sup>, Vesna Matović<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology, Akademik Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade

<sup>2</sup>Public Health Institut Sremska Mitrovica, Stari šor 47, Sremska Mitrovica

<sup>3</sup>Public Health Institute of Belgrade, Bulevar despota Stefana 54a, Belgrade

---

## **Summary**

In analytical methods used for monitoring of what special attention is paid to sample preparation. Therefore, the objective of this study was testing the efficiency of immunoaffinity columns (IAC) that are based on solid phase extraction principles used for samples preparation in determining aflatoxins and ochratoxins. Aflatoxins and ochratoxins concentrations were determined in totally 56 samples of food items: wheat, corn, rice, barley and other grains (19 samples), flour and flour products from grain and additives for the bakery industry (7 samples), fruits and vegetables (3 samples), hazelnut, walnut, almond, coconut flour (4 samples), roasted cocoa beans, peanuts, tea, coffee (16 samples), spices (4 samples) and meat and meat products (4 samples). Obtained results indicate advantage of IAC use for sample preparation based on enhanced specificity due to binding of extracted molecules to incorporated specific antibodies and rinsing the rest molecules from sample which could interfere with further analysis. Additional advantage is the usage of small amount of organic solvents and consequently decreased exposure of staff who conduct micotoxins determination. Of special interest is increase in method sensitivity since limit of quantification for aflatoxins and ochratoxins determination method is lower than maximal allowed concentration of these toxins prescribed by national rule book.

**Key words:** mycotoxins, sample preparation, foodstuffs, immunoaffinity columns

---



## Prilozi – Contributions

### Izveštaj sa skupa „Skin Forum – 15<sup>th</sup> Annual Meeting”

Ivana Pantelić i Milica Lukić

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju

U periodu od 21. do 22. juna 2016. godine održan je petnaesti po redu „Skin Forum” koji okuplja članove internacionalne mreže posvećene istraživanjima kože i predstavlja fokus grupu Akademije farmaceutskih nauka Velike Britanije. Skup je održan u Londonu u organizaciji UCL School of Pharmacy.

U veoma bogatom i interesantom programu, u toku prvog dana predavanja su bila posvećena temama koje su u većoj meri u domenu kozmetologije, dok su u toku drugog dana u fokusu predavača bila najnovija dostignuća u oblasti farmacije, a sve sa aspekta poslednjih saznanja vezanih za fiziologiju kože, biohemijske procese u koži, formulaciona istraživanja i ispitivanje proizvoda i preparata koji se primenju na koži. Sveprisutna tema bile su senzorne karakteristike formulacija, te je potrebno naglasiti da se ove osobine, koje su prvenstveno značajne za kozmetičke proizvode, smatraju sve važnijim za adherencu, i pažnja im se sve češće posvećuje pri razvoju farmaceutskih preparata za primenu na koži.

Skup je otvorio prof. dr Richard Weller predavanjem pod nazivom *Formulacije za kožu iz perspektive jednog dermatologa* čiji je prvi deo bio posvećen prikazu najnovijih saznanja o stanjima kože (najviše ekcemu) kod kojih je kožna barijera narušena ili nefunkcionalna. Ovaj dermatolog sa Univerziteta u Edinburgu predstavio je rezultate eDelphi projekta čiji je osnovni cilj bio da se na relaciji pacijent-doktor-istraživač definišu goruća pitanja u oblasti dermatologije na koje bi trebalo fokusirati naučnoistraživački rad. Uz to, izneo je i niz interesantnih tvrdnji koje su proistekle kao rezultat njegovog višedecenijskog istraživanja i prakse. Naime, prof. Weller tvrdi da je redovno izlaganje suncu neophodno za dug život, jer je pokazano da, između ostalog, izlaganje suncu smanjuje rizik od srčanog udara, snižava krvni pritisak i rizik od moždanog udara. Iako je njegovo predavanje izazvalo živu raspravu između pobornika i

protivnika izlaganja suncu, prof. Weller je svakako pružio drugi ugao posmatranja ove problematike.

Predavanje *Moć komplijanse – kritična uloga korisnika u postizanju efikasnosti*, održao je prof. dr Paul Matts, stručnjak zaposlen u odeljenju za istraživanje i razvoj kompanije Procter & Gamble, koji je ujedno i gostujući profesor na UCL School of Pharmacy i London College of Fashion. On je govorio o efikasnosti kozmetičkih proizvoda kao proizvodu sledeće jednačine: kozmetički efekat x isporuka x primena (engl. activity x delivery x use). Veoma slikovito, govorio je o različitim fazama razvoja kozmetičkog proizvoda koji, konačno, mora da ispuni očekivanja korisnika, a na primeru proizvoda za negu tela i proizvoda za zaštitu kože od sunca. Kao ključne korake u razvoju izdvojio je: (a) aplikativne osobine proizvoda, (b) izgled kože neposredno nakon primene proizvoda, (c) miris proizvoda, (d) pakovanje i (e) doživljaj/utisak pri prvoj primeni, koji je šaljivo nazvao 'trenutak istine' (engl. first moment of truth).

Ispred kompanije Gattefossé, dr Delphine Marchaud održala je predavanje u kom je istakla da su stalne inovacije dermatoloških formulacija neophodne kako bi se poboljšalo iskustvo pacijenata. Prikazala je kako Gattefossé pristupa razvoju novih lipidnih ekscipijenas obradom prirodnih (postojećih) lipida, a u cilju poboljšanja i dobijanja željenih senzornih osobina proizvoda. Predavanje sličnog karaktera kroz koje smo upoznati sa portfoliom kompanije DowCorning, a pod nazivom *Nova silikonska rešenja za poboljšanje isporuke lekova i adherence pacijenata* održala je dr Anke Sieg.

Dr Gareth Winckle iz kompanije Galderma održao je sledeće predavanje naslovljeno *Senzorni aspekt formulacija za primenu na koži: umetnost i nauka* u kome je, ovaj put kroz prikaz razvoja jednog farmaceutskog preparata za primenu na koži, pokazano u kojim se sve fazama razmatraju senzorne osobine budućeg proizvoda i na koji način se ispituju.

Naredni predavač, Sean Jones iz Agencije za lekove i medicinska sredstva (MHRA) Velike Britanije održao je predavanje o regulatornim aspektima formulacija koje se primenjuju na koži, sa posebnim osvrtom na izbor ekscipijenas. Naglasio je da se MHRA preparatima sa emolijentnim efektom sve češće dodeljuje status medicinskog sredstva. Uz osvrt na nedoumice koje su brojne u oblasti legislative, a tiču se lekova koji se primenjuju na koži, kroz predavanje je komentarisano i dokument „Conceptpaper on the development of a guideline on quality and equivalence of topical products”, objavljen od strane Evropske agencije za lekove (EMA). *Proteomičko razumevanje maturacije i vlaženja stratum corneuma* bio je naziv predavanja prof. dr Anthony Rawlingsa, čija su dosadašnja istraživanja u oblasti fiziologije kože u značajnoj meri doprinela savremenim razmatranjima lečenja različitih stanja kože. Njegovo izlaganje u najvećoj meri bilo je posvećeno koži lica, za koju navodi da: u poređenju sa drugim delovima *stratum corneum*-a koža lica je tanja, ima povećanu

aktivnost serinproteaza, smanjen nivo prirodnog vlažećeg faktora, uz postojanje razlika u sastavu ceramida, posebno na foto-izloženim delovima kože.

Drugi radni dan skupa započeo je predavanjem dr Werner Wesslinga iz kompanije LTS LohmanTherapie-Systeme AG, na temu *Transdermalna isporuka lekova: prošlost – sadašnjost - budućnost*. Dr Wessling je napravio detaljnu retrospektivu sistema za transdermalnu isporuku (TDDS) od sedamdesetih godina prošlog veka, kada je kompanija ALZA plasirala prvi lek ove vrste na tržište, pa sve do danas, kada TDDS imaju svoje važno mesto na tržištu lekova, čija se vrednost procenjuje na oko 7 milijardi \$. Detaljno je analizirao karakteristike lekovite supstance koja se može smatrati pogodnim kandidatom za transdermalnu isporuku; u pitanju su visoko potentne supstance, male molekulske mase i umerene lipofilnosti. Iz tog razloga, svega 20 lekovitih supstanci se trenutno mogu naći na tržištu u sastavu TDDS iz kojih se pasivnom difuzijom mogu isporučiti u sistemsku cirkulaciju, ali veliki broj istraživačkih grupa intenzivno ispituje mogućnosti transdermalne isporuke šireg spektra lekovitih supstanci, uključujući i neke biološke lekove. Nasuprot pasivnoj difuziji kao mehanizmu isporuke ovih lekova, u drugom delu predavanja dat je osvrt na mogućnosti tzv. aktivne transdermalne isporuke primenom jontoforeze, elektroporacije, mikroigala, ultrazvuka i laserske ablacije.

U okviru predavanja pod nazivom *Prolazno smanjenje barijernih svojstava kože u cilju poboljšane transdermalne isporuke lekova*, dr Faz Chowdhury je predstavio novi proizvod kompanije NemauraPharma Ltd. U pitanju je terapijski sistem na bazi mikroigala koji omogućava da se igle u kožu insertuju uvek pod istim uglom. Na primeru ibuprofena kao lekovite supstance, prikazao je rezultate istraživanja koja ukazuju da se na ovaj način istovremeno može postići i brz početak delovanja i produženo oslobađanje leka iz depoa koji se obrazuju u površinskim slojevima kože. Dr Chowdhury je posebno istakao da su tokom ispitivanja senzibilizacije kože, koje je sprovedeno na 70 odraslih dobrovoljaca, dobijeni zadovoljavajući rezultati.

Sledeći se auditorijumu obratio prof. dr Jurgen Lademann sa Univerziteta Charité u Berlinu sa izlaganjem pod nazivom *Nanočestice i koža* u kom je dao pregled dostupnih metoda za procenu penetracije kroz kožu i zadržavanja nanočestičnih nosača lekova u koži, pri čemu je posebnu pažnju posvetio značaju folikula dlake. Prof. Lademann smatra da je folikul dlake dobro mesto za ciljanu isporuku leka, s obzirom da je okružen gustom mrežom kapilara. Rezultati istraživanja nanočestica različitih veličina i sastava ukazuju da čestice dijametra oko 600 nm najviše penetriraju u folikul dlake, gde se mogu zadržati i do 14 dana. Ovo ukazuje da je retenciono vreme nanočestičnih sistema u folikulu dlake daleko veće od retencionog vremena uobičajenog za stratum korneum. Važno je istaći da čestice veće od 40 nm ne uspevaju kao takve da penetriraju iz folikula dlake u okolno vijabilno tkivo, s obzirom da i sam folikul poseduje određenu barijeru. Konačno, razlika u pH i temperaturnim vrednostima na

površini kože i u folikulu dlake može poslužiti kao svojevrsan okidač za ciljanu isporuku leka iz ovakvih sistema.

Dr Jonathan Crowther iz kompanije GlaxoSmith Kline predstavio je učesnicima skupa najnovija dostignuća u instrumentalnim merenjima različitih parametara kože, sa posebnim osvrtom na spektroskopske metode koje su se, od dominantno *in vitro* pristupa, razvile u klinički relevantne metode za *in vivo* analizu različitih sastojaka prisutnih u koži. Izdvojio je i koncept 2D mapiranja hidracije kože koja omogućava simultano razmatranje topografije i stepena hidracije kože. Dr Crowther budućnost ove oblasti vidi u sensorima ugrađenim u predmete za svakodnevnu upotrebu, poput ručnog sata, koji će u svakom trenutku omogućiti dobijanje podataka iz velike populacije ispitanika.

Predavanjem pod nazivom *In silico modeli za predviđanje dermalne i transdermalne isporuke*, dr Sebastian Polak ispred kompanije Certara predstavio je značaj farmakokinetičkih modela zasnovanih na fiziološkim principima, kao jedinstvenim *in silico* pristupom koji u obzir uzima kako karakteristike lekovite supstance i odabrane formulacije, tako i inherentne fiziološke procese ispitanika, uz procenu mogućih varijabilnosti na nivou odabrane populacije. Kada se svi prethodno navedeni parametri uzmu u razmatranje, dobijaju se precizniji rezultati resorpcije, distribucije i eliminacije ispitivanog leka. Kao dodatnu vrednost predstavljenog modela, dr Polak navodi različite mogućnosti ekstrapolacije podataka sa, na primer, zdravih odraslih ispitanika na gerijatrijske pacijente. Detaljnije je predstavljen Simcyp Simulator kao mehanicistički model za procenu dermalne raspoloživosti lekova pohranjen podacima o različitim fiziološkim parametrima kože (npr. debljina slojeva kože, sadržaj lipida, brzina protoka krvi, i dr). Najnovije unapređenje modela ogleda se u MPML-MechDermA funkciji (engl. transient multi-phase multi-layer mechanistic dermal absorption model), koja u obzir uzima i procese poput vezivanja leka za keratin, jonizovanje leka na površini kože, potencijalni transport leka kroz folikul dlake itd. Na ovaj način se dobijaju daleko precizniji podaci o procesima difuzije i distribucije leka, koji direktno utiču na kinetiku resorpcije. Dodatno, veruje se da će navedeni model uspešnije proceniti ponašanje leka iz različitih farmaceutskih oblika (npr. krem, gel, mast, flaster) na osam ponuđenih delova tela (čelo, volarna strana podlaktice, dorzalna strana podlaktice, dorzalna strana nadlaktice, obraz, potkolenica, butina i leđa). Predstavljeni rezultati deo su projekta GADUFA koji je finansiran od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA).

Skup je zatvoren predavanjem koje je održao dr Paulo Marinho iz kompanije L'Oreal, pod nazivom *Inženjering tkiva: pregled in vitro modela tkiva razvijenih u kompaniji L'Oreal*. Nakon predstavljanja odeljenja za istraživanje i razvoj koje trenutno vodi, dr Marinho je održao interesantno predavanje o tri najčešće primene ćelijskih i

tkivnih modela dobijenih 3D štampom: procena bezbednosti, procena efikasnosti i primena u polju regenerativne medicine.

Pored prethodno izdvojenih predavača, priliku da se obrate auditorijumu dobilo je i nekoliko studenata doktorskih studija, koji su nam predstavili deo svojih istraživanja.

Učesnici skupa su obavešteni da će naredni Skin Forum biti održan u Francuskoj.

## **Izveštaj sa konferencije „4th Conference on Innovation in Drug Delivery Site-Specific Drug Delivery” (25-28. septembar, 2016. godine, Antibes-Juan-les-Pins, Francuska)**

Četvrta po redu međunarodna konferencija *4th Conference on Innovation in Drug Delivery - Site-Specific Drug Delivery* održana je u periodu od 25. do 28. septembra 2016. godine u Antibes-Juan-les-Pins (Francuska), u organizaciji stručnih udruženja Francuske (Association de Pharmacie Galénique Industrielle/international Society of Drug Delivery Sciences and Thechnology - APGI) i Italije (Associazione Docenti e Ricercatori Italiani di Tecnologie e Legislazione Farmaceutiche - ADRITELF). Konferenciji je prisustvovalo približno 210 istraživača iz Evrope, SAD i Azije. Na konferenciji su predstavljena 3 plenarna predavanja i 10 predavanja po pozivu eminentnih svetskih stručnjaka u oblasti razvoja savremenih strategija za isporuku lekova, 19 usmenih izlaganja afirmisanih naučnika i mladih istraživača, kao i 2 tehničke sesije.

Teme koje su razmatrane u okviru plenarnih predavanja bile su:

- kvantifikacija i optimizacija ciljne isporuke aktivnih supstanci u kožu i nokte;
- savremeni pristupi u primeni citotoksičnih aktivnih supstanci u terapiji solitarnih tumora;
- nove strategije za poboljšanje isporuke aktivnih supstanci i antigena u/preko mukoznih membrana.

Predavanja po pozivu i usmena izlaganja su održana tokom 3 dana u okviru 9 sesija koje su bile posvećene:

- razvoju novih tehnika i metodologija za karakterizaciju (trans)dermalne, intraungualne i intraokularne isporuke aktivnih supstanci;
- formulaciji savremenih farmaceutskih oblika za isporuku aktivnih supstanci u kolonu;
- dizajnu koloidnih nosača, kao što su liposomi treće generacije, polimerne nanočestice, emulzije stabilizovane čvrstim česticama (*engl.* pickering

- emulsions), za unapređenje (per)oralne isporuke nestabilnih/slabo rastvorljivih/permeabilnih aktivnih supstanci, isporuke preko mukoznih membrana i ciljne isporuke lekovitih supstanci za terapiju kancera, neurodegenerativnih oboljenja i pulmonalne isporuke aktivnih supstanci;
- dizajnu i karakterizaciji silikonskih mini-implanata za terapiju oboljenja unutrašnjeg uha
  - razvoju rastvorljivih mikroigala kao nosača antigena i *in vivo* ispitivanja imunološkog odgovora.

U okviru tehničkih sesija kompanija BASF (Nemačka) i PCAS (Francuska) predstavile su karakteristike ekscipijenasa specijalizovanih performansi iz grupe poli(metakrilna kiselina-ko-etil akrilati i polilaktid/polilaktid-ko-glikolid i mogućnosti njihove primene kao farmaceutskih ekscipijenasa.

Poster prezentacija se sastojala od 175 radova koji su prikazani u toku dva dana. Tokom prezentacije postera predstavljeni su savremeni istraživački interesi i rezultati velikog broja istraživačkih grupa iz različitih zemalja u sledećim oblastima:

- primena aktivnih supstanci u gastrointestinalnom traktu (uključujući isporuku u usnoj duplji i kolonu),
- nove strategije u formulaciji čvrstih farmaceutskih oblika,
- strategije za poboljšanje rastvorljivosti i stabilnosti aktivnih supstanci,
- (trans)dermalne, okularne, nazalne i pulmonalne isporuke aktivnih supstanci,
- isporuka aktivnih supstanci u uho,
- razvoj bioadhezivnih i mukoadhezivnih nosača lekova i farmaceutskih formulacija
- inkapsulacija aktivnih supstanci u koloidne nosače (liposomi, ultradeformabilni vezikuli, polimerne i čvrste lipidne nanočestice, nanokohleati, magnetne nanočestice, mikroemulzije, nanoemulzije) i mikročestice za različite puteve primene,
- dizajn kompleksnih koloidnih nosača za ciljnu isporuku aktivnih supstanci (citotoksične supstance, lekovi za lečenje neurodegenerativnih oboljenja),
- razvoj novih *in situ* formirajućih implanata i 3D printing tehnologija za izradu implanata.

U radu konferencije aktivno su učestvovala doc. dr Ljiljana Đekić i doc. dr Danina Krajišnik sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta. Tokom poster prezentacije predstavljeno je sledećih šest saopštenja istraživača iz Republike Srbije:

- *Formulation and evaluation of alginate hydrogel thickened microemulsions for percutaneous application of ibuprofen* (Martina Martinović, Ljiljana Đekić, Marija Primorac);
- *Selfmicroemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) with acyclovir: in vitro release profile* (Jovana Janković, Ljiljana Đekić, Marija Primorac);
- *Influence of preparation conditions of ibuprofen-modified natural zeolite composites characteristics* (Danina Krajišnik, Jelena Jančićević, Vladimir Dobričić, Jela Milić);
- *Stability investigation of fast inverted oil-in-water emulsion as a vehicle for dihydroquercetin* (Radava Martić, Danina Krajišnik, Jelena Čolović, Anđelija Malenović, Jela Milić);
- *Characterization of viscous ophtalmic vehicles containing chitosan and hydroxypropyl guar gum – a comparative study* (Anđelka Račić, Danina Krajišnik, Bojan Čalija, Jela Milić).
- *Modified bentonite for prolonged drug delivery of ibuprofen* (Jelena Jančićević, Danina Krajišnik, Bojan Čalija, Vladimir Dobričić, Jela Milić).

Navedeni radovi sadrže delove rezultata istraživanja koja se sprovode u okviru projekata koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru projekata osnovnih istraživanja (ON 172018), tehnološkog razvoja (TR 34007 i TR 34031) i integralna interdisciplinarna istraživanja (III 46010).

Konferencija *Innovation in Drug Delivery* se održava svake treće godine i sledeća, peta po redu, planira se za 2019. godinu.

Doc. dr Ljiljana Đekić

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju