



KOMORA MAGISTARA FARMACIJE TUZLANSKOG KANTONA

ZBORNIK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE
TUZLANSKOG KANTONA

JEDANAESTI SIMPOZIJ:

“NOVITETI U FARMACIJI”





Komora magistara farmacije
Tuzlanskog kantona



Farmaceutski fakultet
Univerziteta u Tuzli



Tehnološki fakultet
Univerziteta u Tuzli



Udruženje za nutricionizam i
dijetetiku BiH



Prehrambeno tehnološki
fakultet Osijek

ZBORNİK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE
TUZLANSKOG KANTONA

JEDANAESTI SIMPOZIJ:
„NOVITETI U FARMACIJI“

Tuzla, 15.10.2024.

ZBORNİK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE TUZLANSKOG KANTONA
JEDANAESTI SIMPOZIJ: „NOVITETI U FARMACIJI“

God. 11, br. 11 (2024)

ISSN: 2490-2284 (Štamp. izd.)

ISSN 2303-7229 (CD-ROM)

ISSN 2566-4271 (Online)

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK: Dr.sc. Softić Adaleta, red. prof. (Tuzla, BiH)

POMOĆNIK UREDNIKA: dipl.iuris Dragan Nikić (Tuzla, BiH)

NAUČNI SAVJET:

1. Dr.sc. Aščerić Mensura, red. prof. (Tuzla, BiH)
2. Dr.sc. Begić Lejla, red. prof. emeritus (Tuzla, BiH)
3. Dr.sc. Čačić Kenjerić Daniela, red. prof. (Osijek, Hrvatska)
4. Dr.sc. Čatić Sead, red. prof. (Tuzla, BiH)
5. Dr.sc. Durić Kemal, red. prof. (Sarajevo, BiH)
6. Dr.sc. Đukić Mirjana, red. prof. (Beograd, Srbija)
7. Dr.sc. Jašić Midhat, red. prof. emeritus (Tuzla, BiH)
8. Dr.sc. Jokić Stela, red. prof. (Osijek, Hrvatska)
9. Dr.sc. Krajnović Dušanka, red.prof. (Beograd, Srbija)
10. Dr.sc. Salkić Nermin, red. prof. (Tuzla, BiH)
11. Dr.sc. Smajlović Aida, red. prof. (Tuzla, BiH)
12. Dr.sc. Softić Adaleta, red. prof. (Tuzla, BiH)
13. Dr.sc. Šarić-Kundalić Broza, red. prof (Tuzla, BiH)
14. Dr.sc. Šubarić Drago, red. prof. (Osijek, Hrvatska)
15. Dr.sc. Vujić Zorica red. prof. (Beograd, Srbija)
16. Dr.sc. Zovko Končić Marijana, red. prof. (Zagreb, Hrvatska)

UREĐIVAČKI ODBOR:

1. Dr.sc. Banjari Ines, van. prof. (Osijek, Hrvatska)
2. Dr.sc. Begić Aida, (Tuzla, BiH)
3. Dr.sc. Cilović Kozarević Ermina, docent (Tuzla, BiH)
4. Dr.sc. Džambić Amra, docent (Tuzla, BiH)
5. Dr.sc. Flanjak Ivana, van. prof. (Osijek, Hrvatska)
6. Dr.sc. Ibišević Merima, docent (Tuzla, BiH)
7. Dr.sc. Jozinović Antun, van. prof. (Osijek, Hrvatska)
8. Dr.sc. Lončarić Ante, van. prof. (Osijek, Hrvatska)
9. Dr.sc. Nikšić Haris, van. prof. (Sarajevo, BiH)
10. Dr.sc. Pašić Fuad, van. prof. (Tuzla, BiH)
11. Dr.sc. Pilipović Saša, van. prof. (Sarajevo, BiH)
12. Dr.sc. Popović Milka, van. prof. (Novi Sad, Srbija)
13. Dr.sc. Sarić-Kundalić Broza, van. prof (Tuzla, BiH)
14. Dr.vet.med. Sinanović Azra (Sarajevo, BiH)
15. Dr.sc. Smajić Miralem, (Tuzla, BiH)
16. Dr.sc. Srabović Nahida, van. prof. (Tuzla, BiH)
17. Dr.sc. Šabanović Marizela, (Tuzla, BiH)
18. Dr.med. Šabić Dževad (Živinice, BiH)
19. Dr.sc. Šestan Indira, van. prof. (Tuzla, BiH)
20. Dr.sc. Šljivić-Husejnović Maida, docent (Tuzla, BiH)
21. Dr.sc. Uzunović Alija, van.prof. (Sarajevo, BiH)
22. Dr.sc. Vidović Bojana, van. prof. (Beograd, Srbija)
23. Dr.sc. Vitali Čepo Dubravka, van. prof. (Zagreb, Hrvatska)
24. Dr.sc. Zavašnik Bergant Valentina (Ljubljana, Slovenia)

ORGANIZACIONO-PROGRAMSKI ODBOR:

1. Mr.ph. Arapčić Melisa, (Tuzla, BiH)
2. Mr.ph. Bektić Nermin, (Tuzla, BiH)
3. Mr.ph. Cipurković Aneda (Tuzla, BiH)
4. Mr.ph. Gazibegović Nadina (Tuzla, BiH)
5. Mr.ph. Hernla Violeta, (Tuzla, BiH)
6. Mr.ph. Mišić Dženita, (Tuzla, BiH)
7. Mr.ph. Mujkić Alma, (Tuzla, BiH)
8. Dip.iurus. Nikić Dragan, (Tuzla, BiH)
9. Mr.ph. Smajić Melisa, (Tuzla, BiH)
10. Mr.ph. Šabanović Dženisa, (Tuzla, BiH)
11. Mr.ph. Šabović Sabina, (Tuzla, BiH)

IZDAVAČ: ANEDA CIPURKOVIĆ
KOMORA MAGISTARA FARMACIJE
TUZLANSKOG KANTONA
Titova do br. 34, SPO lamela A/II, Tuzla

TEHNIČKA PRIPREMA I DIZAJN: Bajrić Adela (Tuzla, Bosna i Hercegovina)

SADRŽAJ / CONTENTS

RIJEČ UREDNIKA7

SAŽECI / ABSTRACTS

Adaleta Softić

IMPLEMENTACIJA EU DIREKTIVE O
REGULIRANIM PROFESIJAMA 2005/36EC U
FORMALNOM OBRAZOVANJU MAGISTARA FARMACIJE 11-12

Bojana Vidović

ANTIOKSIDANSI U PREVENCIJI I
TERAPIJI METABOLIČKOG SINDROMA..... 13-14

Stela Jokić, Sanda Vladimir-Knežević, Krunoslav Aladić,

Ema Pavičić, Drago Šubarić

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA KONOPLJE
PRIMJENOM INOVATIVNE SUPERKRITIČNE CO₂ EKSTRAKCIJE 15-18

Jasna Džananović Jaganjac

FARMAKOGNOZIJA: OD TRADICIONALNE
MEDICINE DO MODERNE NAUKE 19-20

Semra Sukanović Bešlagić

PRIRODNA KOZMETIKA – SPOJ NAUKE I
PRIRODNIH BLAGODATI U SLUŽBI ZDRAVLJA KOŽE 21-22

CJELOVITI RADOVI / FULL PAPERS

- Amra Bratovčić*
SYNTHESIS OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES
AND THEIR APPLICATION IN THE PHARMACY..... 25-43
- Alen Hatkić, Aida Smajlović, Adaleta Softić, Nahida Srabović,
Esmeralda Dautović, Dalila Halilčević, Asja Šarić, Maida Šljivić Husejnović*
PREGLED METODA ZA *IN VITRO* ISPITIVANJE
INHIBICIJE GLIKACIJE PROTEINA 44-53
- Lamija Kolarević, Ermina Cilović Kozarević,
Broza Šarić-Kundalić, Maida Šljivić Husejnović*
TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI (HPLC)
U ANALIZI FENOLNIH SPOJEVA LAMIACEAE VRSTA..... 54-64
- Belkisa Djedović, Samir Ćurić, Amina Hasikić, Sumea Haušić,
Elvira Jukić, Hedija Starčević, Merima Ibišević, Maida Šljivić Husejnović*
INDIKACIJE I SIGURNOSNI PROFIL BOTULINUM
NEUROTOKSINA ZA PRIMJENU U KOZMETOLOGIJI 65-74
- Faruk Kajtazović, Laura Divković, Emina Ahmetović, Ajla Džafić,
Maida Beganović, Merima Ibišević, Maida Šljivić Husejnović*
SAVREMENI PRISTUPI U FARMAKOTERAPIJI
PRETILOSTI: IZAZOVI, RIZICI I PERSPEKTIVE..... 75-85

RIJEČ UREDNIKA

Jedanaesti simpozij magistara farmacije Tuzlanskog kantona pod nazivom “Noviteti u farmaciji” premašio je očekivanja u pogledu broja učesnika, kako magistara farmacije, ljekara, univerzitetskih profesora, tako i studenata farmacije, na što smo izrazito ponosni. Ove godine učesnici su imali priliku čuti zanimljiva izlaganja vezana za formalno obrazovanje magistara farmacije i različita područja farmaceutske djelatnosti.

Jedan od ciljeva ovogodišnjeg Simpozija bio je da se realnom sektoru, prije svega magistrima farmacije koji se bave apotekarskom praksom, predstave noviteti u formalnom obrazovanju magistara farmacije, koji su uvedeni kako bi se implementirala EU Direktiva o reguliranim profesijama 2005/36EC.

Kroz stručna predavanja na Simpoziju ali i kroz radove objavljene u ovogodišnjem Zborniku, zainteresirana javnost ima priliku da se informiše o razvoju novih sofisticiranih metoda ekstrakcije bioaktivnih tvari, razvoju novih formulacija baziranih na tehnologiji nanočestica, predstavljanju novih formulacija i savremenih farmakoterapijskih pristupa određenim bolestima. Na ovaj način svakako je ostvaren osnovni cilj Simpozija, a to je omogućiti magistrima farmacije da prošire znanja i obogate kompetencije kroz praćenje savremenih trendova u farmaciji, oblasti biomedicine i zdravstva koja veoma brzo napreduje.

Željela bih se zahvaliti svim autorima radova, recenzentima, uredništvu i ostalim saradnicima, koji su omogućili publiciranje ovog Zbornika.

Tuzla, oktobar 2024.

Dr.sc. Adaleta Softić, red. prof.

SAŽECI / ABSTRACTS

IMPLEMENTACIJA EU DIREKTIVE O REGULIRANIM PROFESIJAMA 2005/36EC U FORMALNOM OBRAZOVANJU MAGISTARA FARMACIJE

Adaleta Softić

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

SAŽETAK

Uvod: Ovo izlaganje pripremljeno je s ciljem da se širem auditorijumu, prije svega realnom sektoru u kojem se zapošljavaju magistri farmacije, predstave novine uvedene na integrisanom studiju farmacije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Tuzli.

Metode: Implementacija 1) EU direktive 2005/36EC u formalnom obrazovanju magistara farmacije, 2) alata za procjenu usvojenog znanja nakon II i V godine studija (KREF-Knowledge Retention Evaluation Framework)- unutrašnji sistem kontrole kvaliteta studijskog programa i 3) alata za nadzor nad provođenjem stručne prakse (E-platforma) i ocjenu znanja stečenog na stručnoj praksi - OSCE ispit (Objective Structured Clinical Evaluation).

Rezultat: Nakon implementacije strateskih dokumenata i alata, inovirani studij farmacije je u primjeni od akademske 2023/2024. godine.

Zaključak: usklađen studijski program sa EU direktivom 2005/36EC; uvedeni alati za procjenu kvaliteta kurikuluma i usvojenog znanja na stručnoj praksi.

Ključne riječi: EU direktiva, regulirane profesije, KREF, OSCE, EE-platforma

Autor za korespondenciju: dr.sc. Adaleta Softić, red. prof.

E-mail: adaleta.mulaomerovic@untz.ba

IMPLEMENTATION OF EU DIRECTIVE ON REGULATED PROFESSIONS 2005/36EC IN THE FORMAL EDUCATION OF MASTER OF PHARMACY

Adaleta Softić

Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

ABSTRACT

Introduction: The primary aim of this presentation is to inform a broader audience, particularly the private sector where Master of Pharmacy graduates are employed, about the innovations introduced in the integrated pharmacy program at the Faculty of Pharmacy, University of Tuzla.

Methods: Implementation 1) of EU Directive 2005/36EC in the formal education of Master of Pharmacy students, 2) of tools for evaluating retained knowledge after the 2nd and 5th years of study (KREF - Knowledge Retention Evaluation Framework) - an internal quality control system for the study program and 3) of tools for monitoring the implementation of professional practice (E-platform) and evaluation of knowledge acquired during professional practice - OSCE examination (Objective Structured Clinical Examination).

Results: After the implementation of strategic documents and tools, the updated pharmacy study program has started being applied from the academic year 2023/24.

Conclusion: The study program is aligned with EU Directive 2005/36EC; tools for assessing curriculum quality and knowledge acquired during professional practice have been introduced.

Keywords: EU Directive, regulated professions, KREF, OSCE, E-platform

Corresponding Author: Adaleta Softić, PhD, Full Prof.

E-mail: adaleta.mulaomerovic@untz.ba

ANTIOKSIDANSI U PREVENCIJI I TERAPIJI METABOLIČKOG SINDROMA

Bojana Vidović

*Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet - Katedra za bromatologiju, Vojvode Stepe 450,
11221 Beograd, Srbija*

SAŽETAK

Metabolički sindrom predstavlja skup metaboličkih poremećaja, kao što su abdominalna gojaznost, insulinska rezistencija, dislipidemija, steatoza i hipertenzija, koji povećavaju rizik od dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti. Etiologija metaboličkog sindroma je rezultat interakcija između genetskih, bihevioralnih, ekoloških i nutritivnih faktora rizika. Iako su mehanizmi kompleksni i nedovoljno razjašnjeni, pretpostavlja se da oksidativni stres ima integrativnu ulogu u razvoju metaboličkog sindroma, kao i njegovih komplikacija.

Brojne studije su pokazale narušen oksidativno-stresni status kod osoba sa metaboličkim sindromom, kao i inverznu povezanost dijetarnog unosa i/ili serumskih koncentracija dijetarnih antioksidanasa sa rizikom od metaboličkog sindroma, ukazujući na značaj njihovog optimalnog unosa. Hrana predstavlja izvor brojnih antioksidanasa, kao što su vitamini, minerali, provitamini (beta-karoten), koenzimi (koenzim Q10, alfa-lipoinna kiselina), ali i fitohemikalija (karotenoida, polifenola i dr.), čije se uloge u antioksidativnoj zaštiti organizma posljednjih godina intenzivno istražuju. Osim direktnih antioksidativnih efekata, sastojci hrane i na indirektnan način pružaju podršku endogenom antioksidativnom zaštitnom sistemu, kao prekursori sinteze endogenih antioksidanasa, kofaktori antioksidativnih enzima ili kao modulatori redoks-senzitivnih signalnih puteva. Posljednjih godina, sve je veće interesovanje za efikasnost suplementacije izolovanim nutrijentima i biološki aktivnim sastojcima sa antioksidativnim svojstvima u cilju prevencije ili u okviru terapije metaboličkog sindroma. Međutim, samoinicijativna i nekontrolisana upotreba ovih proizvoda povezana je s rizicima od neželjenih efekata, usljed prekomjernog i dugotrajnog unosa antioksidanasa, kao i potencijalnim interakcijama sa farmakološkom terapijom.

Za uspješnu prevenciju i terapiju metaboličkog sindroma neophodan je multidisciplinarni pristup. Uloga farmaceuta u ovim aktivnostima je višestruka i između ostalog uključuje i savjetovanje o pravilnoj ishrani, kao i na dokazima zasnovane preporuke o racionalnoj i bezbjednoj upotrebi dodataka ishrani sa antioksidativnim sastojcima.

Ključne riječi: metabolički sindrom, antioksidansi, pravilna ishrana, dodaci ishrani

Autor za korespondenciju: Dr.sc. Bojana Vidović, van.prof.

E mail: bojana.vidovic@pharmacy.bg.ac.rs

ANTIOXIDANTS IN THE PREVENTION AND TREATMENT OF METABOLIC SYNDROME

Bojana Vidović

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

ABSTRACT

Metabolic syndrome is a constellation of metabolic disorders, such as abdominal obesity, insulin resistance, dyslipidemia, hepatic steatosis, and hypertension that increase the risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. Metabolic syndrome results from interactions between genetic, behavioral, environmental, and nutritional risk factors. Although the mechanisms are complex and insufficiently elucidated, it is assumed that oxidative stress plays an integrative role in the development of metabolic syndrome and its complications.

Numerous studies have indicated an impaired oxidative stress status in patients with metabolic syndrome, as well as an inversed association of dietary intake and serum concentrations of antioxidants with the risk of metabolic syndrome, indicating the importance of their optimal intake. Food is a source of numerous antioxidants, such as vitamins, minerals, provitamins (beta-carotene), coenzymes (coenzyme Q10, alpha-lipoic acid), but also phytochemicals (carotenoids, polyphenols, etc.), whose roles in the antioxidant defense are intensively researched. In addition to direct antioxidant effects, foods' bioactive compounds indirectly support the endogenous antioxidant defense system as precursors of synthesizing endogenous antioxidants, cofactors of antioxidant enzymes, or modulators of redox-sensitive signaling pathways. In recent years, there has been increasing interest in the effects of antioxidant supplementation in the prevention or within the treatment of metabolic syndrome. However, self-initiated and uncontrolled use of these products is associated with risk of unwanted effects due to excessive and long-term intake of antioxidants and potential interactions with pharmacological therapy.

A multidisciplinary approach is necessary to prevent and treat metabolic syndrome successfully. The pharmacist's role in these activities is multiple and, among others, includes counseling on healthy diet and evidence-based recommendations on the rational and safe use of antioxidant supplements.

Keywords: metabolic syndrome, antioxidants, healthy diet, food supplements

Corresponding author: Bojana Vidović, PhD, Associate Prof.
E mail: bojana.vidovic@pharmacy.bg.ac.rs

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA KONOPLJE PRIMJENOM INOVATIVNE SUPERKRITIČNE CO₂ EKSTRAKCIJE

Stela Jokić^{1*}, Sanda Vladimir-Knežević², Krunoslav Aladić¹, Ema Pavičić¹, Drago Šubarić¹

¹Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

²Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Uvod: Prirodni produkti su sve traženiji u dermatologiji i kozmetologiji iz razloga održivosti i zaštite okoliša. Također mogu doprinijeti poboljšanju ishoda liječenja kroničnih kožnih bolesti i u njezi kože. Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) sadrži mnoga ljekovita svojstva koja se polako otkrivaju. Glavne sastavnice ove biljne vrste su kanabinoidi i terpeni, a najzastupljeniji su u cvatovima. Među kanabinoidima se ističe CBD koji se već nalazi u brojnim topikalnim pripravcima, a pripisuje mu se antioksidacijsko, protuupalno i analgetsko djelovanje te povoljan učinak na smanjenje bora i hidratiziranje kože. Znanost još treba dati brojne odgovore o učinkovitosti kanabinoida i sigurnosti njihove primjene na kožu, međutim, proizvodnja i primjena dermatoloških i kozmetičkih pripravaka svakodnevno raste. Stoga izrada visokovrijednih ekstrakata s definiranim sastavom željenih bioaktivnih tvari ima sve veću važnost. Današnja istraživanja su usmjerena na iznalaženje ekološki prihvatljivih zelenih metoda ekstrakcije, izolacije i pročišćavanja kanabinoida te razvoj metoda za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Ekološke zahtjeve suvremene proizvodnje biljnih ekstrakata za medicinsku i kozmetičku primjenu gotovo u potpunosti zadovoljava ekstrakcija ugljikovim dioksidom u superkritičnom stanju (sCO₂) jer predstavlja “čistu tehnologiju” bez sekundarnih proizvoda štetnih za zdravlje i okoliš. sCO₂ ekstrakti industrijske konoplje bogati terpenima i kanabinoidima bez psihoaktivnog djelovanja imaju veliki potencijal primjene u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Cilj istraživanja: Definirati optimalne uvjete izolacije kanabinoida i terpena iz cvata industrijske konoplje primjenom “zelene” ekstrakcije ugljikovim dioksidom u superkritičnom stanju (sCO₂); kvantificirati dobivene ekstrakte na udio kanabinoida i terpena; te odrediti antioksidacijske i antimikrobne učinke sCO₂ ekstrakata.

Materijal i metode: Za istraživanje su korišteni osušeni cvatući vršni dijelovi industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) sorte Futura 75. Ekstrakcija ciljanih bioaktivnih sastavnica provedena je primjenom sCO₂. Eksperimentalna matrica napravljena je prema dizajnu centralnog kompozitnog plana pokusa, a analizom varijance procijenjen je stupanj točnosti primijenjene metodologije. Identifikacija i kvantifikacija isparljivih sastavnica sCO₂ ekstrakata provedena je u vezanom sustavu plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS), dok su kanabinoidi određeni metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD). Antioksidacijska svojstva dobivenih ekstrakata određena su primjenom DPPH testa, dok je antibakterijska aktivnost ispitana mikrodilucijskom metodom za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija.

Rezultati: Analiza plinskom kromatografijom i spektrometrijom masa (GC-MS) pokazala je β -mircenski kemotip $s\text{CO}_2$ ekstrakata, s visokim udjelom α -pinena i β -pinena te nizom drugih monoterpena s manjim udjelima, dok je najzastupljeniji seskviterpen bio β -kariofilen. Glavni kanabinoidi $s\text{CO}_2$ ekstrakata bili su CBDA i CBD, praćeni manje zastupljenim CBCA, CBC, THCA-A, THC, CBGA, CBG, CBDVA, dok CBN i THCVA nisu detektirani. $s\text{CO}_2$ ekstrakt dobiven pri tlaku 320 bara i temperaturi 40 °C, s najvećim sadržajem CBDA, imao je najbolja antioksidacijska svojstva. Svi ekstrakti su pokazali dobro antibakterijsko djelovanje na vrste *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus*. $s\text{CO}_2$ ekstrakt s najvećim udjelom CBD-a, koji sadrži i visok udio α -pinena, β -pinena, β -mircena i limonena, pokazao je najbolje antibakterijsko djelovanje. Uspostavljeni su optimalni uvjeti za $s\text{CO}_2$ ekstrakciju kanabinoida i terpena iz industrijske konoplje. Postupkom dekarboksilacije kao predtretmana biljnog materijala prije $s\text{CO}_2$ ekstrakcije dobiveni su ekstrakti s visokim prinosom CBD-a kao dominantnom sastavnicom.

Zaključak: Industrijska konoplja danas predstavlja obećavajući obnovljivi resurs, koji nema samo potencijal primjene u izradi tekstila, papira ili biogoriva, već i u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Istraživanje je potvrdilo selektivnost primijenjene tehnike za ekstrakciju ciljanih terpena i kanabinoida iz cvatova industrijske konoplje. Taj bi se zeleni tehnološki postupak mogao implementirati u proizvodni sustav za ekstrakciju kanabinoida i terpena, s ciljem njihove topikalne primjene u medicinske i kozmetičke svrhe.

Ključne riječi: industrijska konoplja, superkritična CO_2 ekstrakcija, CBD, kanabinoidi, terpeni, topikalna primjena

Autor za korespondenciju: Dr.sc. Jokić Stela, red. prof.
Email: stela.jokic@ptfos.hr

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM INDUSTRIAL HEMP USING INNOVATIVE SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION

Stela Jokić^{1*}, Sanda Vladimir-Knežević², Krunoslav Aladić¹, Ema Pavičić¹, Drago Šubarić¹

¹*Faculty of Food Technology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia*

²*Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia*

ABSTRACT

Introduction: Natural products are increasingly in demand in dermatology and cosmetology for reasons of sustainability and environmental protection. They can also contribute to improving the treatment outcomes of chronic skin conditions and in skin care. Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) has numerous medicinal properties that are slowly being discovered. Main components of this plant species are cannabinoids and terpenes, and they are most abundant in the flowers. Among the cannabinoids, CBD stands out, which is already found in numerous topical preparations, and is attributed with antioxidant, anti-inflammatory and analgesic effects, as well as a beneficial effect on reducing wrinkles and hydrating the skin. Science is yet to provide answers to numerous questions on the effectiveness of cannabinoids and the safety of their application to the skin, but nevertheless the production and applications of dermatological and cosmetic preparations is growing daily. Therefore, the production of high-value extracts with a defined composition of desired bioactive substances is gaining increasing importance. Current research is focused on finding environmentally friendly green methods of extraction, isolation and purification of cannabinoids and the development of methods for their qualitative and quantitative analysis. Ecological requirements of the modern production of plant extracts for medicinal and cosmetic applications are almost completely met by extraction with carbon dioxide in a supercritical state (sCO₂) because it represents a “clean technology” without secondary products harmful to health and to the environment. sCO₂ extracts of industrial hemp, rich in terpenes and cannabinoids without psychoactive effects, have great potential for use in the pharmaceutical and cosmetic industries.

Objectives and task: To define the optimal conditions for isolation of cannabinoids and terpenes from industrial hemp inflorescences by applying “green” supercritical carbon dioxide extraction (sCO₂); to quantify the obtained extracts on the content of cannabinoids and terpenes; and to determine the antioxidant and antimicrobial activities of sCO₂ extracts.

Method of work: Dried inflorescences of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) of Croatia-grown Futura 75 variety were used for the research. Extraction of target bioactive compounds using sCO₂ was carried out. The experimental matrix was made according to the central composite design, and the analysis of variance was used to assess the degree of accuracy of the applied methodology. Identification and quantification of volatile compounds of sCO₂ extracts was determined by gas chromatography-mass spectrometry combined system (GC-MS), while cannabinoids were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD). The antioxidant properties of the obtained extracts were determined by a DPPH scavenging assay, while antibacterial activity was tested by a microdilution method for the determination of minimal inhibitory concentrations.

Results: Analysis with gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) showed β -myrcene chemotype in $s\text{CO}_2$ extracts, with a high content of α -pinene and β -pinene and a number of other monoterpenes in smaller proportions, while the most dominant sesquiterpene was β -caryophyllene. The main cannabinoids of $s\text{CO}_2$ extracts were CBDA and CBD, followed by less common CBCA, CBC, THCA, THC, CBGA, CBG, and CBDVA, while CBN and THCVA were not detected. $s\text{CO}_2$ extract obtained at a pressure of 320 bar and a temperature of 40 °C, with the highest CBDA content, exhibited the best antioxidant properties. All extracts exhibited good antibacterial effect against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and *S. aureus*. $s\text{CO}_2$ extract with the highest content of CBD, which also contains a high content of α -pinene, β -pinene, β -myrcene and limonene, showed the best antibacterial activity. Optimal conditions have been established for the $s\text{CO}_2$ extraction of cannabinoids and terpenes from industrial hemp. By using decarboxylation as a pretreatment of plant material before $s\text{CO}_2$ extraction, extracts with a high yield of CBD were obtained.

Conclusion: Currently, industrial hemp represents a promising renewable resource, which not only has the potential to be used in the production of textiles, paper, or biofuels, but also in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Research confirmed the selectivity of the applied technique for the extraction of targeted terpenes and cannabinoids from industrial hemp flowers. This green technological process could be implemented in the production system for the extraction of cannabinoids and terpenes, with the aim of their topical application for medicinal and cosmetic purposes.

Keywords: industrial hemp, supercritical CO_2 extraction, CBD, cannabinoids, terpenes, topical use

Corresponding author: Jokić Stela, PhD, Full Prof.

Email: stela.jokic@ptfos.hr

FARMAKOGNOZIJA: OD TRADICIONALNE MEDICINE DO MODERNE NAUKE

Jasna Džananović Jaganjac

Sarajevo School of Science and Technology – Sarajevo Medical School

SAŽETAK

Uvod: Farmakognozija se može smatrati primarnom disciplinom iz koje se razvila farmacija. Trendovi u farmaciji se oslanjaju na druge dvije sekcije koje nastoje zauzeti glavnu poziciju: prva, farmaceutska hemija, koja uključuje analizu lijekova, i druga, farmakologija, koja uključuje kliničku farmakologiju i kliničku farmaciju. Iako ove discipline neosporno igraju izuzetno važnu ulogu u farmaciji, sa stajališta akademskih institucija, potrebno je uzeti u obzir iskustvo historijskog razvoja farmacije i na njemu utemeljene nepobitne činjenice.

Cilj: Razjasniti problem položaja farmakognozije u osnovnim farmaceutskim disciplinama i njenu važnost i potencijal u otkrivanju i razvoju novih lijekova.

Materijal i metode: Pretraživanje baza podataka i dostupne literature s ciljem analize informacija o farmakognoziji s aspekta njenog naučnog doprinosa i njenoj zastupljenosti u modernoj farmaciji.

Rasprava: Prošlo je više od 750 godina od donošenja “*Constitutiones regni Siciliae 1231-1241*” Fridrika II., koji je liječenje podijelio na dva područja: medicinu i farmaciju. Ova progresivna odluka omogućila je razvoj oba područja i deklariranje njihova identiteta: cilj medicine je dijagnoza i liječenje, cilj farmacije je razvoj, proizvodnja i distribucija optimalnog lijeka. Upravo u to vrijeme postavljeni su temelji za formiranje najstarije farmaceutske discipline, farmakognozije, iz koje se razvila farmacija. Kao i svaka druga naučna disciplina od uvođenja farmakognozije prije nekih 200 godina, ona je evoluirala, i sada se farmakognozija može definirati kao nauka o biogenim ili prirodno dobivenim lijekovima i otrovima. Moderna farmakognozija uključuje široko proučavanje prirodnih proizvoda iz različitih izvora uključujući biljke, bakterije, gljive i morske organizme, te istraživanja u otkrivanju lijekova iz ljekovitog bilja koja uključuju višestrani pristup koji kombinira botaničke, kompjuterske, fitohemijske, biološke i molekularne tehnike. Očito je da otkrića lijekova iz ljekovitih biljaka nastavljaju pružati nove i važne tragove protiv različitih farmakoloških meta uključujući tumore, HIV/AIDS, Alzheimerovu bolest i nespecifičnu bol.

Zaključak: Farmakognozija nije predmet prošlosti, već je evoluirala i razvijala se tokom godina kako bi se prilagodila promjenjivom okruženju i izazovima otkrivanja lijekova i razvoj istih, te bi stoga trebala biti sastavni dio bilo kojeg smislenog akademskog programa farmacije u cijelom svijetu.

Ključne riječi: farmakognozija, farmacija, lijek, akademija

Autor za korespondenciju: Dr.sc. Jasna Džananović Jaganjac, docent
Email: jasna.dzananovic@gmail.com

PHARMACOGNOSY: FROM TRADITIONAL MEDICINE TO THE MODERN SCIENCE**Jasna Džananović Jaganjac***Sarajevo School of Science and Technology – Sarajevo Medical School***ABSTRACT**

Introduction: Pharmacognosy can be considered as the primary discipline from which pharmacy developed. Trends in pharmacy rely on two other sections that strive to take the main position: the first, pharmaceutical chemistry, which includes drug analysis, and the second, pharmacology, which includes clinical pharmacology and clinical pharmacy. Although these disciplines undeniably play an extremely important role in pharmacy, from the point of view of academic institutions, it is necessary to consider the experience of the historical development of pharmacy and the undeniable facts based on it.

Objective: To clarify the problem of the position of pharmacognosy in the basic pharmaceutical disciplines and its importance and potential in the discovery and development of new drugs.

Materials and methods: Database and relevant available literature research with the aim of analysing information on pharmacognosy from the aspect of its scientific contribution and its representation in modern pharmacy.

Discussion: More than 750 years have passed since the “*Constitutiones regni Siciliae 1231-1241*” of Frederick II, which divided the treatment into two areas: medicine and pharmacy. This progressive decision enabled the development of both areas and the declaration of their identity: the goal of medicine is diagnosis and treatment, and the goal of pharmacy is the development, production, and distribution of optimal medicine. At that time, the foundations were laid for the oldest pharmaceutical discipline, pharmacognosy, from which pharmacy developed. Like any other scientific discipline since the introduction of pharmacognosy some 200 years ago, it has evolved, and pharmacognosy can be defined as the science of biogenic or naturally derived drugs and poisons. Modern pharmacognosy involves the broad study of natural products from sources including plants, bacteria, fungi and marine organisms, and research in drug discovery from medicinal plants involves a multifaceted approach combining botanical, IT, phytochemical, biological and molecular techniques. Drug discovery from medicinal plants continues to provide new and important leads against various pharmacological targets including tumours, HIV/AIDS, Alzheimer’s disease, and non-specific pain.

Conclusion: Pharmacognosy is not a subject of the past but has evolved and developed over the years to adapt to the changing environment and challenges of drug discovery and development, and should therefore be an integral part of any meaningful academic pharmacy program worldwide.

Key words: pharmacognosy, pharmacy, drug, academy

Corresponding author: Jasna Džananović Jaganjac, PhD, Assistant Prof.

Email: jasna.dzananovic@gmail.com

PRIRODNA KOZMETIKA – SPOJ NAUKE I PRIRODNIH BLAGODATI U SLUŽBI ZDRAVLJA KOŽE

Semra Sukanović Bešlagić

OD Zen prirodna kozmetika, Džafer Mahala 54, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

SAŽETAK

Uvod: Kada se koristi termin “prirodna kozmetika” govori se o kozmetici koja je najvećim dijelom izrađena od sirovina prirodnog porijekla (životinjskog, biljnog ili mineralnog), uz što manju preradu. Trend korištenja i proizvodnje prirodne kozmetike je u porastu unazad nekoliko godina a sve analize govore da će se rast ovog trenda nastaviti i u godinama ispred nas.

Cilj istraživanja: Ovaj rad ima za cilj da pokaže koliko je krajnjem korisniku prirodnog kozmetičkog preparata važan balans između prirode i nauke. Takođe, rad ima za cilj da odgovori na pitanje da li postoje opcije koje će omogućiti malim proizvođačima da svoje proizvode učine sigurnim i stabilnim ne umanjujući ni kvalitet krajnjeg proizvoda niti profitabilnost njihovog biznisa.

Materijal i metode: Metoda istraživanja korištena prilikom izrade ovog rada jeste anonimno online anketiranje stanovništva na području Bosne i Hercegovine. U anketiranju učesće uzima 204 ispitanika starija od 18 godina. Svi dobiveni podaci su analizirani i grafički predstavljeni.

Rezultati: Ispitivanja pokazuju da korisnici prirodnih kozmetičkih preparata smatraju kako je važno koristiti provjerene i tačne recepture. Takođe, ističu važnost obavljanja svih potrebnih analiza i dobijanja certifikata koje proizvod treba da posjeduje. Uz to, smatraju da je neophodno posjedovanje znanja proizvođača iz farmakognozije, botanike, tehnologije, kozmetologije i srodnih naučnih grana kako bi se osigurao kvalitet i garantovala sigurnost biljnih kozmetičkih preparata.

Zaključak: Spoj prirodnih blagodati u vidu sirovina za izradu kozmetičkih preparata i nauke koja te sirovine može povezati da sinergički djeluju u svrhu očuvanja dobrobiti, a sve u skladu sa Pravilnikom u kojem su definisane dozvoljene supstance za izradu biljnih preparata daje kompletan, kvalitetan, siguran i djelotvoran proizvod.

Ključne riječi: prirodna kozmetika, mali proizvođači, sigurnost i kvaliteta.

Autor za korespondenciju: mr.ph.Semra Sukanović Bešlagić

E-mail: info@zenkozmetika.com

NATURAL COSMETICS – THE BLEND OF SCIENCE AND NATURAL BENEFITS IN SERVICE OF SKIN HEALTH

Semra Sukanović Bešlić

OD Zen prirodna kozmetika, Džafer Mahala 54, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

ABSTRACT

Introduction: Term “natural cosmetics” refers to cosmetics primarily made from raw materials of natural origin (animal, plant, or mineral) with minimal processing. The trend of using and producing natural cosmetics has been rising for the past few years, and all analyses suggest that this trend will continue in the future.

Objectives and task: This paper aims to demonstrate the importance of the balance between nature and science to the end-user of natural cosmetic products and to answer the question of whether there are options that will enable small producers to make their products safe and stable without compromising the quality of the end product or the profitability of their business.

Method of work: The research method used in this paper was anonymous online surveying of the population in Bosnia and Herzegovina. A total of 204 respondents over the age of 18 participated in the survey. All data collected were analyzed and presented graphically.

Results: Survey results indicate that the end-user of natural cosmetic products consider it important to use proven and precise formulations, conduct all necessary analyses, and provide certificates that a product should have, as well as to possess extensive knowledge in pharmacognosy, botany, technology, cosmetology, and related scientific fields to ensure quality and guarantee the safety and quality of botanical cosmetic products.

Conclusion: The combination of natural benefits in the form of raw materials for cosmetic product formulation and science, which can connect these raw materials to synergistically act to preserve well-being, all by the regulations defining permitted substances for the production of herbal products, provides us with a complete, high-quality, safe, and effective product.

Keywords: natural cosmetics, small producers, safety, and quality.

Corresponding author: mr.ph. Semra Sukanović Bešlić
E-mail: info@zenkozmezika.com

CJELOVITI RADOVI / FULL PAPERS

SINTEZA NANOČESTICA SREBRA I ZLATA I NJIHOVA PRIMJENA U FARMACIJI

Amra Bratovčić^{1*}

^{1*}Uža naučna oblast Fizikalna hemija i elektrohemija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli,
Urfeta Vežagića 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

Pregledni rad

SAŽETAK

Razvoj nanočestica u farmaciji postao je važno područje istraživanja, pokazujući svoje jedinstvene prednosti u različitim načinima primjene lijekova i liječenju različitih bolesti. U ovom radu prikazane su nanočestice sintetizirane na zeleni način koristeći biljne ekstrakte, te njihova biološka aktivnost i potencijalna primjena u medicini i farmaciji. Ekstrakti biljaka bogati su hemijskim spojevima (sekundarnim metabolitima) koji imaju redukujuće sposobnosti, antioksidativna svojstva, te djeluju kao stabilizirajući agensi odgovorni za zelenu sintezu nanočestica. Objasnen je mehanizam sinteze nanočestica, kao i mehanizam antimikrobne aktivnosti sintetiziranih nanočestica. Opisana je tehnologija elektrospreja za proizvodnju sistema za isporuku lijekova, a pri čemu se polisaharidne nanočestice koriste kao nosači lijekova. Ciljana isporuka lijeka, poboljšanje bioraspoloživosti netopljivih lijekova, poboljšanje efikasnosti i sigurnost lijekova samo su neke od prednosti koje se postižu. Nadalje, nanočestice štite svojstva lijeka, kontroliraju otpuštanje lijeka, skraćuju vrijeme uzimanja lijeka i smanjuju toksične i nuspojave učinka lijeka. Ovi efekti se postižu zahvaljujući ravnomjernoj distribuciji lijeka u polimernom nosaču. Za utvrđivanje biodistribucije i dugoročnih učinaka nanočestica provode se *in vivo* istraživanja, dok se citotoksičnost utvrđuje *in vitro* ispitivanjem. Istraživanja su pokazala da na ovaj način sintetizirane nanočestice pokazuju uporediva antibakterijska svojstva sa postojećim antibioticima. Pokazano je da se nanočestice zlata zahvaljujući fenomenu lokalizirane površinske plazmon rezonancije vrlo uspješno koriste u fototermalnoj terapiji kao novi način liječenja bolesti raka.

Ključne riječi: nanočestice, srebro, zlato, zelena sinteza, antibakterijsko djelovanje, citotoksična aktivnost, ciljana isporuka lijeka.

Autor za korespondenciju: Dr.sc. Bratovčić Amra, van. prof.
E-mail: amra.bratovcic@untz.ba

SYNTHESIS OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATION IN THE PHARMACY

Amra Bratovčić^{1*}

^{1*}*Department of Physical Chemistry and Electrochemistry, Faculty of Technology, University of Tuzla, Urfeta Vejzagica 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina*

Review Article

ABSTRACT

The development of nanoparticles in pharmacy has become an important area of research, showing their unique advantages in different ways of drug administration and treatment of different diseases. This paper presents nanoparticles synthesized in a green way using plant extracts, as well as their biological activity and potential application in medicine and pharmacy. Plant extracts are rich in chemical compounds (secondary metabolites) that have reducing abilities, antioxidant properties, and act as stabilizing agents responsible for the green synthesis of nanoparticles. The mechanism of nanoparticle synthesis is explained, as well as the mechanism of antimicrobial activity of synthesized nanoparticles. Electrospray technology is described for the production of drug delivery systems, where polysaccharide nanoparticles are used as drug carriers. Targeted drug delivery, improvement of bioavailability of insoluble drugs, improvement of efficiency and safety of drugs are only some of the advantages achieved. Furthermore, nanoparticles protect the properties of the drug, control the release of the drug, shorten the time of taking the drug and reduce the toxic and side effects of the drug. These effects are achieved thanks to the uniform distribution of the drug in the polymer carrier. In vivo studies are conducted to determine the biodistribution and long-term effects of nanoparticles, while cytotoxicity is determined by in vitro testing. Research has shown that nanoparticles synthesized in this way show antibacterial properties comparable to existing antibiotics. It has been shown that thanks to the phenomenon of localized surface plasmon resonance, gold nanoparticles are very successfully used in photothermal therapy as a new way of treating cancer.

Keywords: nanoparticles, silver, gold, green synthesis, antibacterial activity, cytotoxic activity, targeted drug delivery.

Corresponding author: PhD Bratovčić Amra, Associate Professor
E-mail: amra.bratovcic@untz.ba

INTRODUCTION

Nanotechnology has applications in medicine, biotechnology, physics, chemistry and materials science. In the last thirty years, intensive research has begun in the field of nanoscience, that is, the application of nanotechnology in the field of medicine. Nanomedicine uses techniques based on nanotechnology, and nanotechnology studies nanoparticles (NPs) that have dimensions of 1-100 nm, 2D and 3D structures, and are characterized by small size and large surface area, biocompatibility and the ability to pass through cell membranes for drug administration and play important role in medicine both in treatment and in diagnostics and monitoring and regulation of biological systems. Nanoparticles are particularly useful as drug carriers, where they selectively deliver therapeutic compounds, i.e. improve bioactivity, reduce toxicity and precisely release encapsulated compounds, thus enabling their application to targeted areas (Karthik et al., 2024).

In this paper, most of the literature published in the last five years was analyzed in relevant databases such as PubMed, Web of Science, and Google Scholar.

Material and methods

Searching for the term „Application of nanoparticles in pharmacy and their medicinal forms“ on ScienceDirect there are 2034 research articles and 1642 review articles accessed on 12.02.2024. We can rightly say that this is a relatively young branch of research because the first publications of scientific research papers appeared in 1996, while the first review papers appeared in 2000. The diagram shows published research and review papers for the period 2013-2023 years (Figure 1).

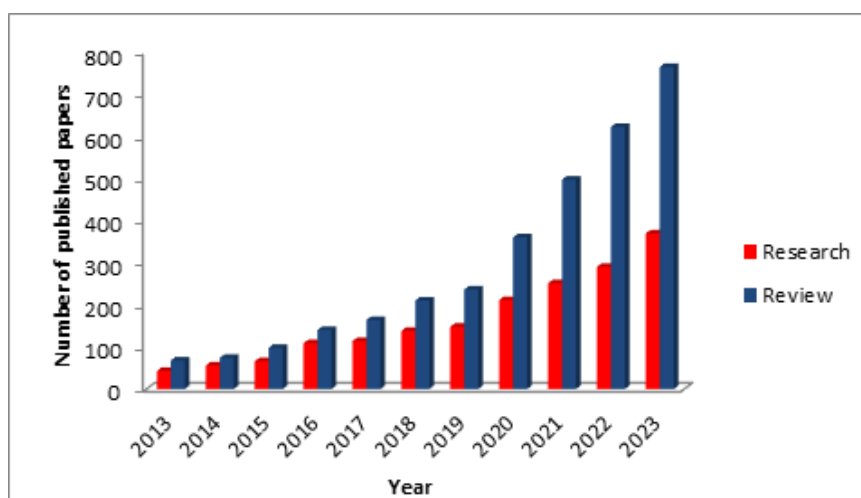


Figure 1. Research and review papers for the period 2013-2023 years

Synthesis of metal nanoparticles

Synthesis of metal nanoparticles such as AgNPs and others can be done using top-down or top-up approaches. The main difference between these two methods is the starting materials involved in the synthesis process. In the top-down approach, a bulk material is used as a starting material, which is then degraded into NPs through various physical and chemical processes, as shown in Figure 2 (Lee

et al., 2019). In contrast, the bottom-up approach uses atoms as starting material, which are then incorporated into larger NPs using chemical or green synthesis methods (Jamkhande et al., 2019).

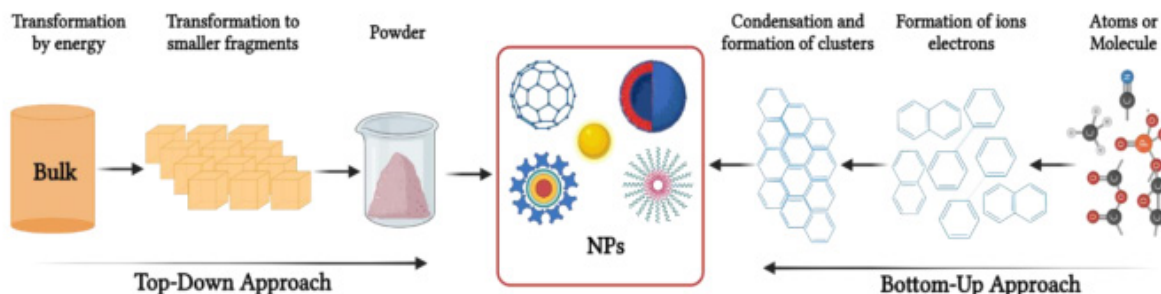


Figure 2. Synthesis of nanoparticles via bottom-up and top-down approaches (Simon et al., 2022).

Overview of nanoparticle synthesis using chemical, physical and green synthesis methods (Figure 3). Bulk materials are comminuted by physical methods to produce NPs, while chemicals and natural products are used to reduce metal precursors to their respective NPs.

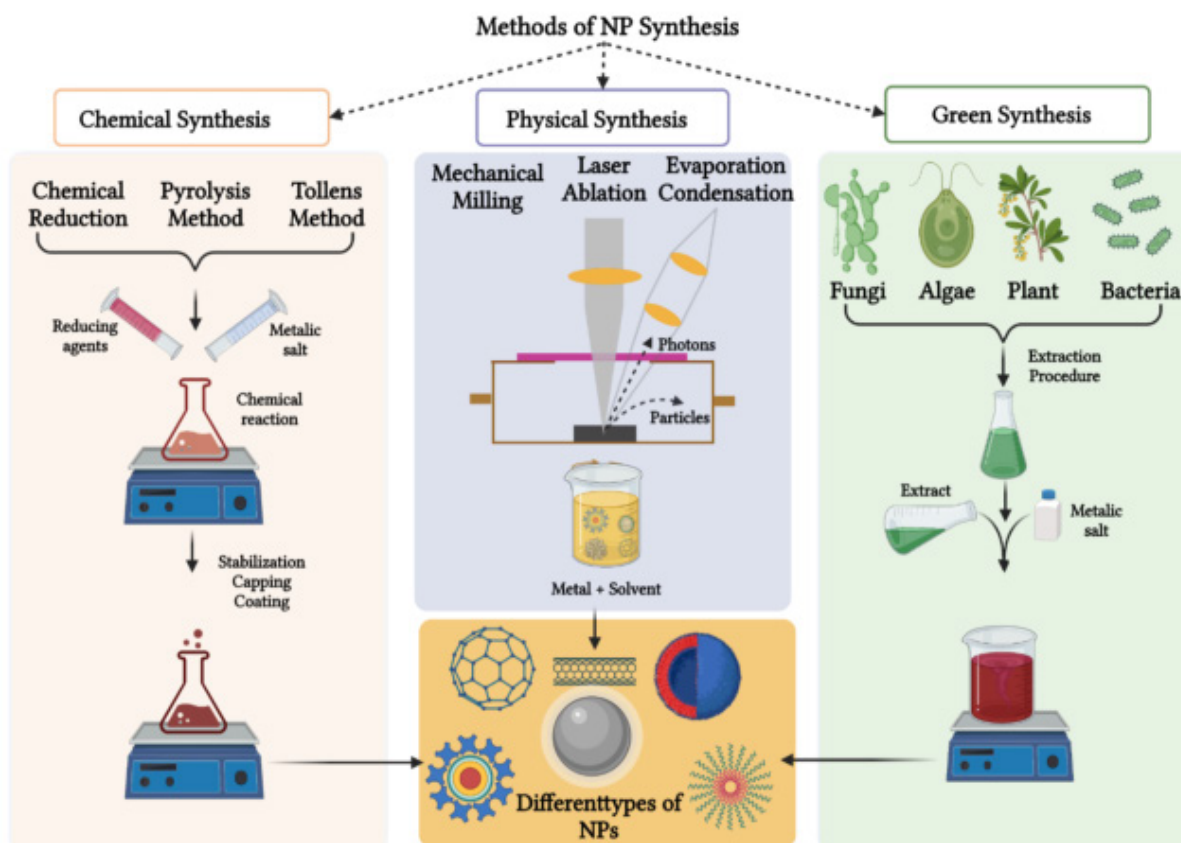


Figure 3. Overview of nanoparticle synthesis using chemical, physical and green synthesis methods (Simon et al., 2022).

A green approach to nanoparticle synthesis

Nanoparticles can be produced in two ways, which means traditional and green. Traditional synthesis processes use toxic chemicals, such as strong acids and hazardous reducing agents, which pose both environmental and human health concerns.

Green nanotechnology practices that use only sustainable, biocompatible materials promote biocompatibility in biomedical applications while reducing environmental impact.

Plants produce a large amount of biomass in the environment using solar energy. Plants contain lignin, carbohydrates, organic acids, saponins, enzymes, and polyphenols, flavonoids, terpenes, which have strong antioxidant properties and can reduce metal precursors. In addition to reducing abilities, these secondary metabolites can act as a stabilizing and capping agent, i.e. the present carboxyl and hydroxyl groups are responsible in the process of nanoparticle production (Alfredo et al., 2008). According to research (Jae et al., 2009), proteins and terpenoids are responsible for the reduction of metal ions in *Magnolia kobus* extract. According to another study (Amin et al., 2009), phenol and alkaloid groups were found to be responsible for limiting and stabilizing NPs. Biomolecules (DNA, proteins and enzymes) in the production of NPs act as specific nucleation sites. It was also found that this form of green synthesis of nanoparticles is strictly dependent on temperature and pH (Kumar Poudel et al., 2022; Bratovcic, 2020).

Plant extracts contain polyphenols that have the ability to donate electrons, for the biological reduction of Ag^+ ions to Ag^0 , which triggers the synthesis of AgNPs. In addition, polyphenols stabilize the resulting silver nanoparticles. Similarly, flavonoids that are found in plants and are soluble in water, actively participate in the reduction of silver ions during the accumulation of silver nanoparticles. The role of natural compounds (secondary metabolites from plant extracts) in the biosynthesis of silver nanoparticles emphasizes their sustainable and environmentally friendly nature of this process, paving the way for a greener and more biocompatible production of nanomaterials (Afreen et al., 2020).

Mechanism of green synthesis of metal nanoparticles using plant extract

The mechanism of synthesis of metal nanoparticles using plant extracts takes place in three steps: activation, nanoparticle growth, and termination. In the first phase, there is a bioreduction of metal ions, which are then nucleated. In the second phase, there is a spontaneous fusion of small nanoparticles into one larger one, which is called Ostwald ripening, which is associated with an increase in thermodynamic stability. In the third phase, the nanoparticles acquire the most energetically favorable conformation, where the metal particles are stabilized by a plant extract, which ultimately determines the shape of the NP (Figure 4) (Bhilkar et al., 2023).

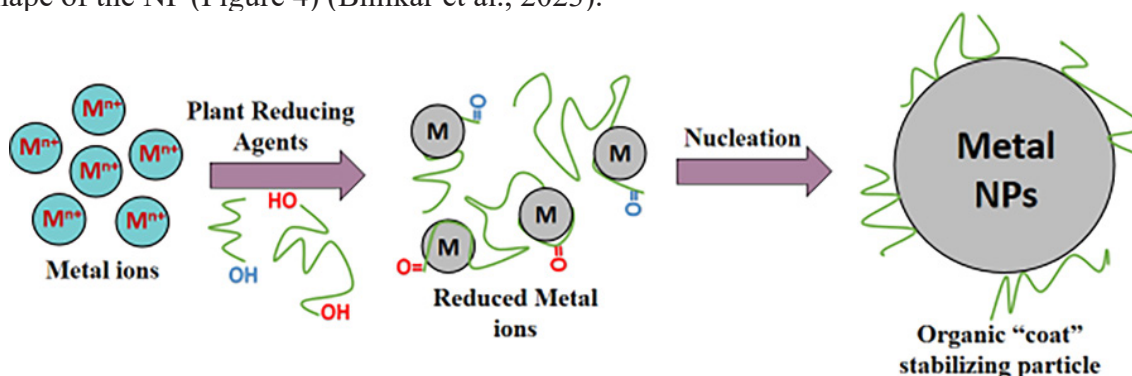


Figure 4. Mechanism of green synthesis of metal nanoparticles using plant extract.

Mechanism of antimicrobial activity

Despite numerous researches and efforts to explain the antibacterial mechanism of action of silver nanoparticles (AgNPs), there is still no definitive one. According to one theory, reactive oxygen species (ROS) and Ag^+ ions formed from AgNPs are responsible for eradicating bacteria. It is believed that these released Ag^+ ions interact with sulfhydryl groups in proteins, leading to their denaturation and consequent disruption of essential cellular processes within bacterial cells. Additionally, another proposed mechanism involves the direct binding of AgNPs to the bacterial cell surface, which then leads to cell damage and destruction. The binding of AgNPs to bacteria can alter the integrity of the cell membrane, cause structural damage and disrupt vital cell functions. These potential mechanisms collectively contribute to the bactericidal activity of AgNPs, culminating in the inhibition of bacterial growth and proliferation. However, further research is needed to fully understand the complex interactions between AgNPs and bacteria. As our understanding of antibacterial mechanisms continues to evolve, AgNPs hold enormous potential as promising candidates to combat bacterial infections and address the growing concern of antimicrobial resistance (Ahmed and Mustafa, 2020).

One of these proposed mechanisms involves the attachment of AgNPs to bacterial cell walls, where they interact and interfere with membrane permeability. This disruption of the cell membrane compromises its integrity, causing cell death. Another proposed pathway suggests that AgNPs interact with enzymes and amino acids within bacterial cells, triggering the production of reactive oxygen species (ROS). These ROS, in turn, induce cellular stress and damage essential biomolecules, ultimately causing cell dysfunction and breakdown. Moreover, interactions of AgNPs with specific phosphorus- and sulfur-rich sites within the bacterial cell nucleus can potentially induce bacterial DNA damage. This DNA damage can lead to genetic changes and cell death, further contributing to the overall antibacterial activity of AgNPs. These different mechanisms collectively contribute to the bactericidal effects of AgNPs and highlight their potential as effective antimicrobial agents against various pathogenic bacteria. As our understanding of these mechanisms deepens, the rational design and application of AgNPs to combat bacterial infections can be further optimized, paving the way for innovative solutions to address the growing challenges posed by antibiotic resistance, Figure 5 (Veisi et al., 2016).

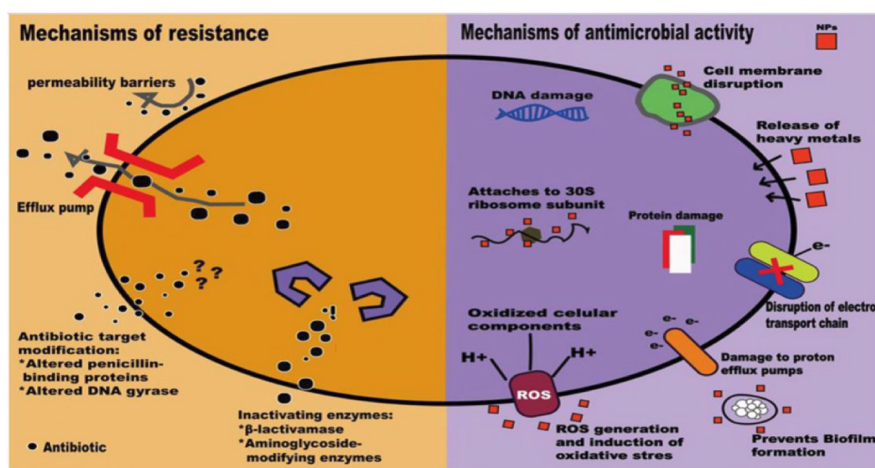


Figure 5. Mechanisms of antimicrobial resistance and action of nanoparticles (Abdulazeem et al., 2023)

The latest research on the application of **gold nanoparticles (AuNPs)** and ways of their functionalization with specific ligands, drugs and imaging agents (image production) and their potential application in cancer therapy has occurred in the last four years. These gold nanoparticles can be observed and evaluated in real time as a diagnostic and therapeutic tool. When introducing nanomaterials into clinical use, it is very important to assess their toxicity (Sakore et al., 2024).

Photothermal therapy (PTT)

Photothermal therapy (PTT) as a new way of treating cancer works very well with gold nanoparticles, in the form of nanorods (AuNR) and nanoshells (AuNS). Gold nanoparticles have the ability to absorb and spread near-infrared radiation (650 and 900 nm), and after light absorption, it is converted into heat by the phenomenon of localized surface plasmon resonance. By using this effect in photothermal therapy (PTT), heat stress occurs in cells at temperatures of 42 °C and 47 °C, which ultimately results in apoptosis (programmed cell death) or other forms of cell damage (Figure 6). This near-infrared radiation used in PTT has a great ability to penetrate tissue, so even very deep tumors or lesions can be treated without resorting to invasive surgery. The characteristic tunable surface plasma resonance (SPR) of AuNPs improves image contrast and enables tailored application of therapeutic loads. Thus, AuNPs with a size of 15-30 nm can penetrate capillaries and tumor tissues, and the availability of surface atoms for rapid interactions with target specific molecules (tumor/disease-specific proteins, peptides and biomolecules) make them useful for molecular imaging and therapeutic applications. As gold nanoparticles can be functionalized with specific ligands or antibodies that bind to receptors overexpressed on the surface of cancer cells, this therapy can be highly selective, causing minimal damage to healthy tissue. Tumor death is accelerated by oxygen and nutrient deprivation as a result of localized heat generated by gold nanoparticles during PTT, which could induce vascular damage (Peng and Liang, 2019).

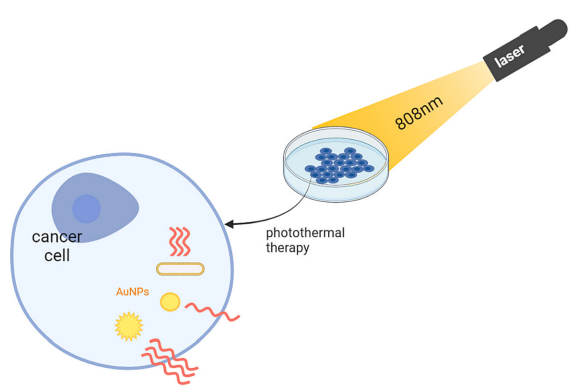


Figure 6. In the presence of AuNPs with localized surface plasmon resonance (LSPR), near-infrared laser light at 808 nm is efficiently transformed into heat energy.

Gold nanoparticles can be tailored into various shapes such as nanorods, nanotriangles, nanoshells, nanoclusters, nanobranches, nanospheres, nanohexagons, nanocubes and nanopentagons for a wide range of applications (Figure 7). Each of the listed forms has its advantages. Thus, gold nanospheres are used in diagnostics and drug delivery, while rod-shaped AuNPs can be adjusted by aspect ratio and are specific for plasmonic readout and photothermal therapy. For applications such as surface-enhanced Raman spectroscopy/scattering (SERS) and biosensing, it is best to use triangular shaped

gold nanoparticles with sharp edges. The multi-branched structures of gold nanostars can be used for SERS and photothermal therapy. AuNPs in the form of nanorings are the most suitable for drug transport because they can trap molecules. Nanorods with branched ends are ideal for making sensitive nanosensors.

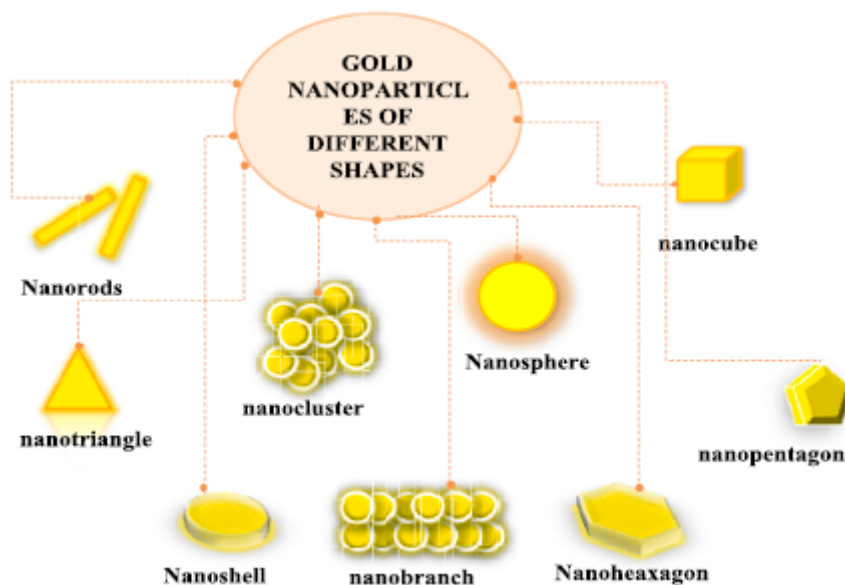


Figure 7. Possible shapes of gold nanoparticles

Among metal-based nanoparticles (gold, silver, zinc oxide, and zinc sulfide), silver nanoparticles (AgNPs) are easy to synthesize and easy to use.

AgNPs have attracted considerable attention in recent years due to their unique physico-chemical properties and potential applications in medicine, catalysis and environmental remediation. Silver nanoparticles have been widely studied due to their antimicrobial and anti-inflammatory properties, chemical stability, and efficiency. They can be used in the form of silver-impregnated topical dressings to treat wounds, burn-related infections and chronic ulcers.

This paper mainly talks about the process of green synthesis of nanoparticles, which implies the use of non-toxic substances such as plant extracts (renewable sources) that act as natural reducing agents and biodegradable chemicals so as to reduce negative effects on the environment. Furthermore, nanoparticles synthesized in this way are more biocompatible, which means they are less toxic to living beings, and can be used as imaging agents in diagnostics and customized drug delivery systems. Bratovic and Dautovic (2024) synthesized AgNPs using aqueous extracts of lemon peel and orange peel. AgNPs synthesized in this way showed antibacterial properties against *E. coli*.

Krishnamoorthy et al. (2023) synthesized AgNPs using *A. nervosa* leaf extract. Their in vitro results showed antibacterial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa*. The antibiotic ciprofloxacin was used as a control analysis (Figure 8).

Zone of inhibition were 12.5 mm with standard (30 μ L), while with AgNPs 7.8 mm for *E. coli*. On the other hand, for *P. aeruginosa*, zone of inhibition were 15.5 mm with standard (30 μ L), while with AgNPs 10.5 mm.

In addition to the antibacterial effect, these synthesized AgNPs using *A. nervosa* also showed antioxidant activity confirmed by DPPH free radical scavenging activity and ABTS test, anti-

inflammatory activity confirmed by albumin denaturation assay and compared to the standard drug diclofenac sodium, as well as anti-diabetic activities confirmed by the activity of α -amylase inhibition and α -glucosidase inhibition.

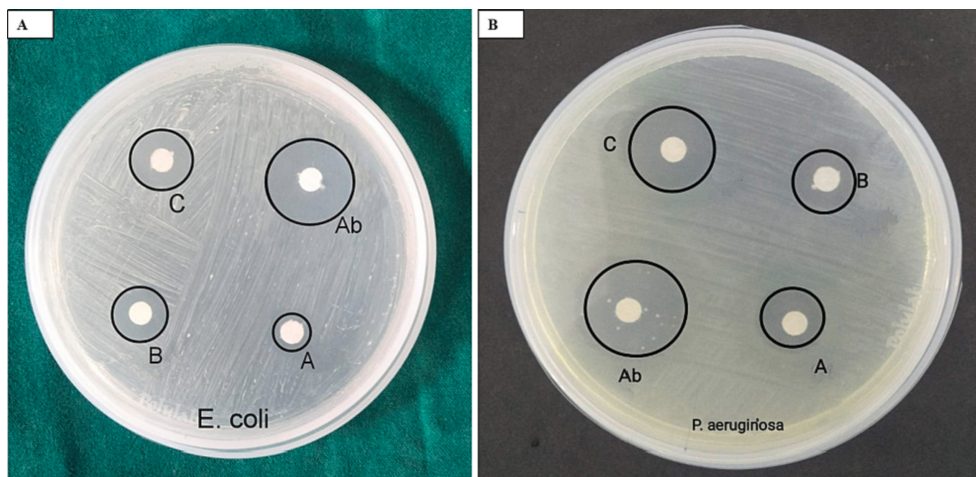


Figure 8. Photograph of petri dishes loaded with AgNP samples mediated by *A. nervosa* against (a) *E. coli*, (b) *P. aeruginosa*. Ab-antibiotic (30 μ l), a-10 μ l, b-20 μ l, c-30 μ l concentrations.

This method of synthesized AgNPs has proven to be cheaper, more environmentally friendly, promising and can reliably be an alternative to the conventional one, with further research on animal and cell line models.

Badrillah et al. (2024) synthesized silver nanoparticles using *Maclurodendron porteri* extract and tested their antibacterial and cytotoxic activities. 430 compounds were found in the extract using LC-MS/QTOF analysis, and the largest part consists of amino acids, polyphenols, steroids, terpenoids and heterocyclic compounds. Cytotoxic testing was performed on MCF-7 and Caco-2 cells by MTT analysis. Antimicrobial activity was induced by 1.2 mg/ml MP-AgNPs against *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* with inhibition zones of 8.0 ± 0.36 mm, 8.5 ± 0.45 mm, 7.5 ± 0.36 mm, and 9.0 ± 0.40 mm. MP-AgNPs did not show cytotoxic activity for Caco-2 and MCF-7 cells.

Singh and Maheshwari (2024) prepared silver nanoparticle gels using natural compounds β -sitosterol and *Woodfordia fruticosa* gel and silver nitrate and showed that it can reduce potential toxicity and increase their biocompatibility. *Woodfordia fruticosa* is traditionally used in folk medicine for its therapeutic properties, such as wound healing, antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties (Maheshwari, 2024).

A research group from the Faculty of Pharmacy in Jordan made silver nanoparticles by bioreduction of silver using acetonitrile extract of *Juglans regia L: Pellicle* and leaves. The effectiveness of the prepared silver nanoparticles for wound healing by incision and excision on rats was tested, and the results were compared with Solcoseryl®. *Juglans regia L. pellicle* extract (P) showed significant efficacy in both models, as did bioreduced AgNP/P. Skin tensile strength after therapy with synthesized silver nanoparticles (871 g, p value < 0.05) was comparable to that after Solcoseryl® (928 g), and both were significantly better than AgNP (592 g) in an incisional wound model. Epithelization time (16.0 and 16.5 days) was not significantly different from Solcoseryl® (15.3 days) (P value < 0.05).

There was an increased content of collagen. Low levels (leukocytic pyrogen) of Interleukin-1 beta (IL-1 β) (189.0 pg/g) and high levels of Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (1007.1 pg/g) in the case of AgNP/P indicate different cell types of maturation and different wound healing structures that are visible in histopathological examinations. Bio-reduced AgNP/P could be used as a pharmaceutical agent for wound healing dressings (Al-Nadaf et al., 2024).

The application of nanotechnology has provided a new field in cancer treatment with the development of new nanoparticles that have demonstrated the ability to select cancer cells, release targeted drugs into tumor tissue and overcome the traditional limitations of chemotherapy, and solve the problem of cell resistance to the drug (Hsu et al., 2023).

The effectiveness of cancer treatment depends on the ability of the method to avoid healthy cells in the body and kill cancer cells. Most of the anticancer drugs that are used during chemotherapy treatment are toxic and cause side effects, and some cells become resistant to treatment, so either increasing the dose of the drug or using several drugs at the same time is resorted to. Severe side effects of chemotherapy such as hair loss, nausea and compromised immune system are due to off-target effects of the drugs. To reduce these side effects and improve existing drugs, there is an urgent need to develop new drug delivery systems that include soluble drug-polymer conjugates, polymer micelles, nanoparticles, liposomes, and microparticles (Nobs et al., 2004; Brissette et al., 2006). Among them, nanoparticles receive special attention because they are easier to produce and can be applied through biocompatible polymers. Due to the fact that the vessels around the tumor tissue are more permeable than the blood vessels of normal tissues and need more oxygen and nutrients due to the higher growth rate, as a result, they have a better absorption of the drug, which increases this permeability and retention (enhanced permeability and retention = EPR) (Brannon-Peppas and Blanchette, 2004; Duncan et al., 2005).

In recent years, the antitumor effects of polysaccharides (natural polymers with aldehyde and ketone groups) of lower plants such as lichens (28,000 species), algae (<150,000 species) and fungi (1,712 species of which 277 are edible and medicinal) have been extensively investigated. It has been proven to affect immune regulation (Huang et al., 2023). Many studies have shown that these medicinal polysaccharides have an excellent selective effect against tumor cells mainly through immune regulation, inhibition of tumor growth and angiogenesis, and influence on cell pathways and minimal side effects (Bi et al., 2020; Mori, 2011; Chen et al., 2017) making them a potential alternative to existing cancer drugs in chemotherapy. Thus, a system was developed for the delivery of nanomedicines based on polysaccharides and applications such as Imprime PGG in the treatment of cancer (Khan et al., 2019; Zhang et al., 2016). Due to the complexity of tumor mechanisms, polysaccharides from lower plants, as multi-targeted drugs with a wide range of pharmacological activities and low side effects, will be one of the primary focuses in the future development of antitumor drugs compared to single-targeted drugs (Fang et al. 2019; Xie et al., 2020).

Many studies provide conflicting results regarding the safety of AgNPs on human health. Research has shown that morphological and physico-chemical characteristics (particle size and coating) influence the toxicity of AgNPs (Dos Santos et al., 2014). Polysaccharide coatings have been shown to reduce the risk of cytotoxicity.

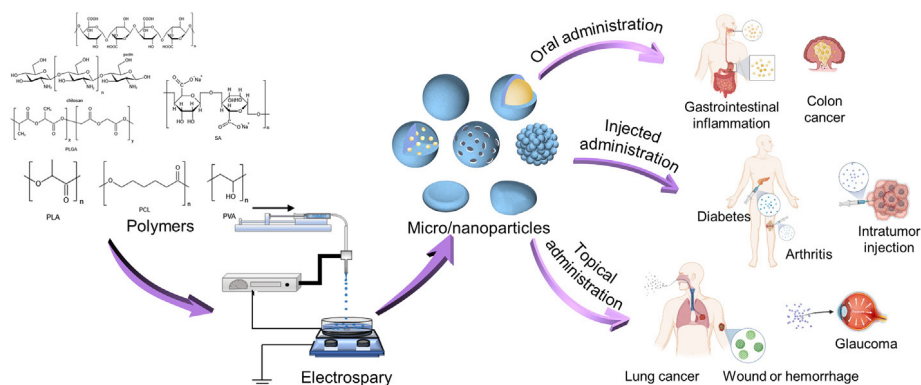


Figure 9. *Electrosprayed synthesis of micro/nanoparticle-based drug delivery systems, their forms and application (Zhao et al., 2022).*

Electrospray (ES) technology for the production of micro/nanoparticle-based drug delivery systems has significantly impacted the pharmaceutical industry. For the production of uniform and stable micro/nanoparticles as drug carriers, natural or synthetic polymers (polysaccharides, botanical proteins and their derivatives) are used that affect the solubility and bioavailability of drugs and reduce toxicity caused by mass accumulation after sudden release of the drug. And once they reach the target site, they are easily broken down and will not accumulate in the body (Zhao et al., 2022).

Polysaccharides are natural organic macromolecule polymers (hyaluronic acid, alginate, chitosan and pectin) characterized by high biodegradability and biocompatibility, nontoxicity and hydrophilicity. They are used for the synthesis of threedimensional hydrogel microspheres (suitable for encapsulation of nanoparticles), nanoparticles and nanofibers for controlled drug release (Cortes et al., 2020; Arevalo-Perez et al., 2020).

Zein as a common botanical protein with its hydrophobic organic structure and unique self-assembly characteristics easy adsorb or covalently bound molecules with targeted properties, which can improve the stability of drug molecules and delay their release (Wang et al., 2020). Other proteins used for the production of nanoparticles are gliadin with amphiphilic properties, isolated soy and walnut proteins (Asadi et al., 2020).

Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is synthesized from lactic acid and glycolic acid as monomers by polymerization reaction with biodegradable properties into carbon dioxide and water in the body (Rezvantalab et al., 2018). The degradation rate depends on the molecular weight and the ratio of lactic acid to glycolic acid.

The degradation rate depends on the molecular weight and lactic acid to glycolic acid ratio. For the last few years, synthetic coating agents and polymethacrylate (Eudragit ®) have also been widely used in the pharmaceutical industry in the novel micro/nano drug delivery systems (Jain et al., 2020). The Eudragit ® electrospayed micro/nanoparticles carry different types of drugs to targeting positions according to the pH of the in vivo environment and they are divided into pH-dependent and time-dependent according to their properties (when carrying Cisplatin treating colon tumor (Tsai et al., 2013) and carrying metronidazole to heal of gastric injured mucosa (Hao et al., 2014).

Different types of micro/nanoparticles can be easily obtained through the control of electrospayed parameters, such as general drug-loaded micro/nanoparticles, porous micro/nanoparticles, composite microspheres and non-spherical micro/nanoparticles (Figure 10).

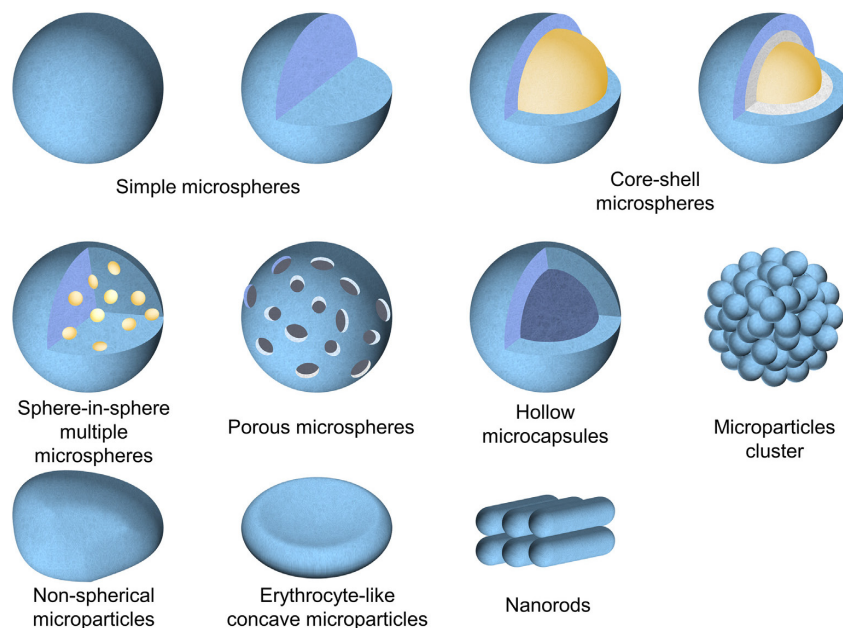


Figure 10. Shapes of electrospayed micro/nanoparticles on drug delivery with small size, high specific surface and high drug loading capacity (Zhao et al., 2022).

Electrospayed micro/nanoparticles for diverse administration routes

After the micro/nanoparticles are loaded with drugs, they give better play to the role of drugs, and even endowing drugs with the functions of sustained release, controlled release, positioning and targeting. Therefore, microspheres are used in multifarious drug delivery routes, such as oral administration, injection administration, and local administration (Fig. 11).

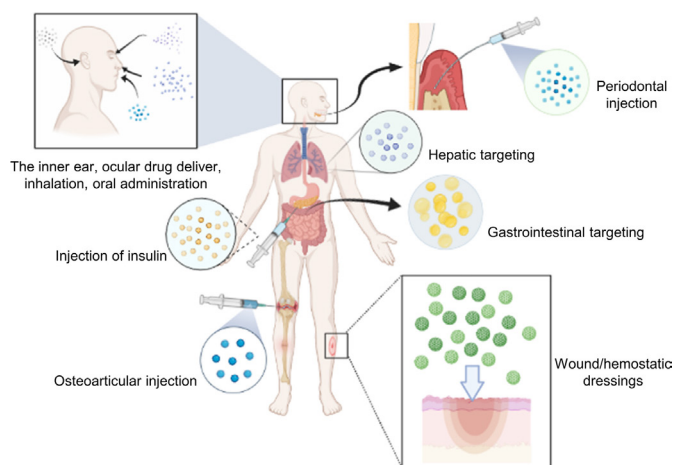


Figure 11. Electrospayed micro/nanoparticles to adapt the mode of drug administration in different diseases (Zhao et al., 2022).

Fakhar-e-Alam et al. (2024) synthesized chemical and green ZnO nanoparticles by a co-precipitation method using zinc nitrate hexa hydrate, sodium hydroxide and *Nigella sativa* extract. The prepared ZnO nanoparticles were finally tested for anticancer activity using the MTT assay and they showed significant antitumor/anticancer efficacy against HepG2 cancer cells.

Fazli et al. (2024) prepared AgNPs using silver fluoride and *Feijoa sellowiana* leaf extract with enhanced antifungal properties against *Candida albicans*. They added the thus synthesized AgNPs to Colgate Kids Toothpaste® and tested their antifungal efficacy. Their published results showed that both toothpastes (with and without AgNPs) showed antifungal activity, with no significant difference ($p > 0.088$) against *Candida glabrata*, while against *C. albicans*, it is ($p < 0.014$).

Oral administration

Oral administration is the most common method of drug delivery, but after the drug enters the human body from the digestive tract, the first-pass effect and sudden release are inevitable. However, this sudden release of the drug can be very dangerous, especially in some diseases that need to be treated with a slow release of the drug (Lee et al., 2020).

To overcome this problem, a drug delivery system based on micro/nanoparticles was chosen, which can meet the continuous and efficient release of different drugs in different phases of therapy and maintain a high concentration of the drug (Zhao et al. 2018).

These systems can protect the gastrointestinal tract from drugs that are harmful (Nikoo et al., 2018) and have serious side effects, or carry non-hydrophilic drugs that cannot be absorbed in the small intestinal tract (Sun et al., 2020), or drugs that are easily broken down in the gastrointestinal tract and cannot reach a specific site to do their job. These systems are characterized by good adhesion to the target site and achieve a therapeutic effect (Wu et al., 2020).

Injection administration

Administration of injections Injection is a common form of parenteral administration, which can avoid harmful effects in normal cells and tissues and minimize systemic side effects (Luo et al., 2020). The requirements to be met for the quality of the injection are strict and refer to the absence of pyrogens, and the particle size and dispersibility of injectable micro/nanoparticles. Micro/nanoparticles prepared by ES are suitable for the production of injectable micro/nanoparticles because with this technique the desired particle size, uniformity, and high drug loading and stability can be adjusted (Songsurang et al., 2011). When it is injected into the body, a reservoir of the drug is formed, whereby it is slowly released over time, and the number of injections is reduced, thus achieving a better medicinal effect (Peters et al., 2017; Sobhani et al., 2017).

Those injectable micro/nanoparticles can be used for intratumoral injection (this injection method improves its anticancer efficacy by promoting localized and sustained drug release in tumor tissue) (Luo et al., 2020), periodontal injection, intraperitoneal injection, subcutaneous injection, etc. In addition to direct injection into body, electrospray fabricated drug-loaded micro/nanoparticles can be dispersed in pH- and temperature-sensitive hydrogels to enhance their targeting and adherence.

Topical administration

The advantage of topical (local) application is the release of drugs directly to the site of the lesion, an increase in the local concentration of the drug and a reduction in the side effects of systemic

administration. In the past comprehensive study of micro/nanoparticles and electrospray, ES has prepared numerous drug-loaded micro/nanoparticles that can be used at different sites for drug delivery based on clinical needs. Electrospray prepared micro/nanoparticles with the drug expand the specific surface area of the drugs, strengthen the local adhesion of the drugs and prolong the retention time of the drugs. Due to the reduction of the use of harmful reagents, micro/nanoparticles prepared by ES can be used for hemostasis of skin wounds (Chen et al., 2017) and bacteriostasis of wounds (Gómez-Herrera, et al., 2020), for eye (Pan et al., 2020), ear (Ma et al., 2018) and inhalation application (Yaqoubi et al., 2020).

Toxicity testing of nanoparticles

Before nanoparticles can be used for medical purposes in the clinic, they must first be proven to be safe and effective through compliance with the regulations of the Food and Drug Administration (FDA) in the United States and the European Medicines Agency (EMA) in Europe. To assess the biocompatibility of nanoparticles, i.e. their toxicity, experiments are needed to test their interaction with biological systems. Biodistribution and long-term effects can be determined by conducting in vivo studies, while in vitro studies can investigate cellular responses including cytotoxicity and inflammation. The toxicity of AuNPs can vary depending on their size and chemical composition of the surface. Due to their greater ability to penetrate cells, smaller nanoparticles can be more toxic and absorbable. To reduce the risk of toxicity, surface modifications such as coating the AuNPs with biocompatible compounds can be performed. To understand their distribution in the body or possibly the problem of their accumulation in certain organs or tissues, research is done with non-invasive imaging techniques such as positron emission tomography (PET) and magnetic resonance imaging (MRI). When we talk about the cumulative toxicity of nanoparticles, then their long-term effects in chronic therapy should be evaluated. In addition to the impact of nanoparticles on humans, it is very important to assess their impact on the environment (ecosystem and marine life), as they can reach the body in various ways other than the discharge of medical wastewater. It is also necessary to take care of the safety and protection at work of the scientists who produce and handle them by setting professional exposure limits and adhering to safety standards (Sakore et al., 2024).

Conclusion

This paper shows a new technique in nanotechnology for the production of silver and gold nanoparticles in a simple way using plant extracts as a cheap, non-toxic and renewable agent used to reduce metal particles and stabilize nanoparticles. They have also been shown to possess significant antibacterial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria with negligible toxicity. The results of this research are encouraging for the further development of nanoparticles in a green way and increasing their antimicrobial efficiency. Many studies in in vitro tests have shown that silver nanoparticles synthesized in this way have potential antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and antidiabetic property. This green synthesis technique is a justified alternative to conventional methods. It is necessary to increase the scope of research on the application of synthesized nanoparticles on animal and cell line models in order to investigate their biological activity potential.

Reference

1. Abdulazeem, L., Alasmari, A.F., Alharbi, M., Alshammari, A., Muhseen, Z.T. (2023) Utilization of aqueous broccoli florets extract for green synthesis and characterization of silver nanoparticles, with potential biological applications, *Heliyon*, 9(9): e19723, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19723>.
2. Afreen, A., Ahmed, R., Mehboob, S. et al., (2020) Phytochemical-assisted biosynthesis of silver nanoparticles from *Ajuga bracteosa* for biomedical applications, *Mater. Res. Express* 7 (7): 1–14. doi: 10.1088/2053-1591/aba5d0
3. Ahmed, R.H., Mustafa, D.E. (2020) Green synthesis of silver nanoparticles mediated by traditionally used medicinal plants in Sudan, *Int. Nano Lett.* 10 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s40089-019-00291-9>
4. Alfredo R. Vilchis-Nestor, Victor Sánchez-Mendieta, Marco A. Camacho-López, Rosa M. Gómez-Espinosa, Miguel A. Camacho-López, Jesús A. Arenas-Alatorre, (2008) Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract, *Mater. Lett.* 62 (17–18): 3103–3105. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.01.138>
5. Al-Nadaf, A.H., Awadallah, A., Thiab, S. (2024) Superior rat wound-healing activity of green synthesized silver nanoparticles from acetonitrile extract of *Juglans regia* L: Pellicle and leaves, *Heliyon*, 10(2)e24473, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24473>.
6. Amin, M., Anwar, F., Ashraf Janjua, M.R.S., Iqbal, M.A. Rashid, U. (2012) Green synthesis of silver nanoparticles through reduction with *Solanum xanthocarpum* L. berry extract: characterization, antimicrobial and urease inhibitory activities against *Helicobacter pylori*, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (8): 9923–9941. doi: [10.3390/ijms13089923](https://doi.org/10.3390/ijms13089923)
7. Arevalo-Perez, R., Maderuelo, C., Lanao, J.M. (2020) Recent advances in colon drug delivery systems, *J. Control. Release* 327: 703–724, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.026>.
8. Asadi, M., Salami, M., Hajikhani, M., Emam-Djomeh, Z., Aghakhani, A., Ghasemi, A. (2020) Electrospray Production of Curcumin-walnut Protein Nanoparticles, *Food. Biophys.* 16 (1): 15–26, <https://doi.org/10.1007/s11483-020-09637-9>.
9. Badrillah, N., Susanti, D., Tengku Mohd Kamil, T.K., Swandiny, G.F., Widyastuti, Y., Zaini, E., Taher, M. (2024) Silver nanoparticles biogenically synthesised using *Maclurodendron porteri* extract and their bioactivities, *Heliyon*, 10(4),e25454, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25454>.
10. Bhilkar, P.R., Bodhne, A.S., Yerpude, S.T., Madankar, R.S., Somkuwar, S.R., Daddemal-Chaudhary, A.R., Lambat, A.P., Desimone, M., Sharma, R. Chaudhary, R.G. (2023) Phyto-derived metal nanoparticles: Prominent tool for biomedical applications, *OpenNano*, 14: 100192, <https://doi.org/10.1016/j.onano.2023.100192>.
11. Bi, S., Huang, W., Chen, S., Huang, C., Li, C., Guo, Z., Yang, J., Zhu, J., Song, L., Yu, R. (2020) *Cordyceps militaris* polysaccharide converts immunosuppressive macrophages into M1-like phenotype and activates T lymphocytes by inhibiting the PD-L1/PD-1 axis between TAMs and T lymphocytes, *Int. J. Biol. Macromol.* 150: 261–280, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.050>.
12. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. (2004) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 56(11):1649-59. doi: 10.1016/j.addr.2004.02.014. Erratum in: *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Apr 28;61(4):364. PMID: 15350294.
13. Bratovic, A. (2020) Biosynthesis of green silver nanoparticles and its uv-vis characterization. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 7(7), 170-176. https://ijiset.com/vol7/v7s7/IJSET_V7_I7_17.pdf

14. Bratovic, A. and Dautovic, A. (2024) Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Orange and Lemon Peel Extract and Evaluation of Their Antimicrobial Properties. *Advances in Nanoparticles*, **13**, 11-28. doi: [10.4236/anp.2024.132002](https://doi.org/10.4236/anp.2024.132002).
15. Brissette R, Prendergast JK, Goldstein NI. (2006) Identification of cancer targets and therapeutics using phage display. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 9(3):363-9. PMID: 16729733.
16. Chen, H., Zhang, L., Long, X., Li, P., Chen, S., Kuang, W., Guo, J. (2017) Sargassum fusiforme polysaccharides inhibit VEGF-A-related angiogenesis and proliferation of lung cancer in vitro and in vivo, *Biomed. Pharmacother*. 85: 22–27, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.131>.
17. Chen, Q., Liu, Y., Wang, T., Wu, J., Zhai, X., Li, Y., Lu, W.W., Pan, H., Zhao, X. (2017) Chitosan-PVA monodisperse millimeter-sized spheres prepared by electrospraying reduce the thromboembolic risk in hemorrhage control, *J. Mater. Chem. B* 5 (20): 3686–3696, <https://doi.org/10.1039/c7tb00032d>.
18. Cortes, H., Caballero-Florán, I.H., Mendoza-Muñoz, N., Córdova-Villanueva, E.N., Escutia-Guadarrama, L., Figueroa-González, G., Reyes-Hernández, O.D., González-Del Carmen, M., Varela-Cardoso, M., Magaña, J.J., Florán, B., Del Prado-Audelo, M.L., Leyva-Gómez, G. (2020) Hyaluronic acid in wound dressings, *Cellular and Molecular Biology* 66 (4), <https://doi.org/10.14715/cmb/2020.66.4.23>.
19. Dos Santos, C.A., Seckler, M.M., Ingle, A.P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., Gade, A., Rai, M., (2014). Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103, 1931–1944. DOI: [10.1002/jps.24001](https://doi.org/10.1002/jps.24001)
20. Duncan R, Vicent MJ, Greco F, Nicholson RI. (2005) Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr Relat Cancer*. 12 Suppl 1:S189-99. doi: 10.1677/erc.1.01045. PMID: 16113096.
21. Fakhar-e-Alam, M., Amjad, I., Saadullah, M., Tahir, M., Jawad, M., Asif, M., Atif, M., Zara, S., Rashad, M. (2024) Antitumor activity of zinc oxide nanoparticles fused with green extract of *Nigella sativa*, *Journal of Saudi Chemical Society*, 28(2): 101814, <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2024.101814>.
22. Fang, L., Zhang, Y., Wang, Q., Zang, Y., Li, Z., Duan, Z., Ren, J., Xu, Z. (2019) A polysaccharide from *Huaier* ameliorates cisplatin nephrotoxicity by decreasing oxidative stress and apoptosis via PI3K/AKT signaling, *Int. J. Biol. Macromol*. 139: 932–943, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.219>.
23. Fazli, F., Babaei, A., Moazeni, M., Fazli, H., Nahvi, A., Ebrahimnejad, P., Nokhodchi, A. (2024) Biofabrication of silver nanoparticles with *Feijoa sellowiana* tailored by box-behnken design: An eco-friendly approach to enhance antifungal properties in Children’s toothpaste, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 92:105361, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105361>.
24. Gámez-Herrera, E., García-Salinas, S., Salido, S., Sancho-Albero, M., Andreu, V., Pérez, M., Luján, L., Irusta, S., Arruebo, M., Mendoza, G. (2020) Drug-eluting wound dressings having sustained release of antimicrobial compounds, *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 152: 327–339, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.05.025>.
25. Hao, S., Wang, Y., Wang, B., Zou, Q., Zeng, H., Chen, X., Liu, X., Liu, J., Yu, S. (2014) A novel gastroretentive porous microparticle for anti-*Helicobacter pylori* therapy: preparation, in vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm*. 463 (1): 10–21, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.052>.
26. Hsu, C.-Y., Rheima, A. M., Kadhim, M. M., Ahmed, N. N., Mohammed, S. H., Abbas, F. H., Abed, Z. T., Mahdi, Z. M., Abbas, Z. S., Hachim, S. K., Ali, F. K., Mahmoud, Z.H, Kianfar, E. (2023) An overview of nanoparticles in drug delivery: Properties and applications, *South African Journal of Chemical Engineering*, 46: 233-270, <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2023.08.009>

27. Huang, X., Li, S., Ding, R., Li, Y., Li, C. Gu, R. (2023) Antitumor effects of polysaccharides from medicinal lower plants: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 252, 126313, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126313>.
28. Jae Y. S., Hyeon-Kyeong J., Beom Soo K., (2009) Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts, *Process. Biochem.* 44 (10):1133–1138. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.005>
29. Jain, S.K., Jain, A.K., Rajpoot, K. (2020) Expedition of Eudragit (R) polymers in the development of novel drug delivery systems, *Curr. Drug. Deliv.* 17 (6): 448–469, <https://doi.org/10.2174/1567201817666200512093639>.
30. Jamkhande, P.G.; Ghule, N.W.; Bamer, A.H.; Kalaskar, M.G. Metal Nanoparticles Synthesis: An Overview on Methods of Preparation, Advantages and Disadvantages, and Applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019, 53, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
31. Karthik, K.K., Cheriyan, B.V., Rajeshkumar, S., Gopalakrishnan, M. (2024) A review on selenium nanoparticles and their biomedical applications, *Biomedical Technology*, 6: 61-74, <https://doi.org/10.1016/j.bmt.2023.12.001>
32. Khan, T. Date, A. Chawda, H. Patel, K. (2019) Polysaccharides as potential anticancer agents - a review of their progress, *Carbohydr. Polym.* 210: 412–428, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.064>.
33. Krishnamoorthy, K., Jayaraman, S., Krishnamoorthy, R., Manoharadas, S., Alshuniaber, M.A., Vikas, B., Veeraraghavan, V.P. (2023) Green synthesis and evaluation of anti-microbial, antioxidant, anti-inflammatory, and anti-diabetic activities of silver nanoparticles from *Argyrea nervosa* leaf extract: An invitro study, *Journal of King Saud University - Science*, 35(10):102955, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102955>.
34. Kumar Poudel, D., Niraula, P., Aryal, H., Budhathoki, B., Phuyal, S., Marahatha, R., Subedi, K. (2022) Plant-mediated green synthesis of Ag NPs and their possible applications: a critical review, *J. Nanotechnol.* 2022: 6. <https://doi.org/10.1155/2022/2779237>
35. Lee, D.S., Kang, D.W., Choi, G.W., Choi, H.G., Cho, H.Y. (2020) Development of level a in vitro-vivo correlation for electrosprayed microspheres containing leuprolide: physicochemical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation, *Pharmaceutics* 12 (1):36, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010036>.
36. Lee, S.H.; Jun, B.H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 865. doi: 10.3390/ijms20040865
37. Luo, Y.Y., Li, J.J., Hu, Y.C., Gao, F., Leung, G.P.H., Geng, F.N., Fu, C.M., Zhang, J.M. (2020) Injectable thermo-responsive nano-hydrogel loading triptolide for the antibreast cancer enhancement via localized treatment based on “two strikes” effects, *Acta. Pharmaceutica. Sinica.* B 10 (11): 2227–2245, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.05.011>.
38. Ma, Y., Björnmalm, M., Wise, A.K., Cortez-Jugo, C., Revalor, E., Ju, Y., Feeney, O.M., Richardson, R.T., Hanssen, E., Shepherd, R.K., Porter, C.J.H., Caruso, F. (2018) Gel-mediated electrospray assembly of silica supraparticles for sustained drug delivery, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10, (37): 31019–31031, <https://doi.org/10.1021/acsami.8b10415>.
39. Maheshwari, S. (2024) Synergistic effects of *Woodfordia fruticosa* silver nanoparticles accelerating wound healing in Swiss mice in vivo, *Intelligent Pharmacy*, 2(1):17-27, <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2023.09.005>
40. Mori, N. (2011) Anti-tumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages, *Int. J. Oncol.*, <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1168>.

41. Nikoo, A.M., Kadkhodae, R., Ghorani, B., Razzaq, H., Tucker, N. (2018) Electrosprayassisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels, *Int. J. Biol. Macromol.* 116: 208–216, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.167>.
42. Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Allémann E. Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin for active targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004 Nov;58(3):483-90. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.04.006. PMID: 15451522.
43. Pan, X., Liu, X., Zhuang, X., Liu, Y., Li, S. (2020) Co-delivery of dexamethasone and melatonin by drugs laden PLGA nanoparticles for the treatment of glaucoma, *J. Drug. Delivery. Sci. Technol.* 60:102086 <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102086>.
44. Peng J, Liang X. (2019) Progress in research on gold nanoparticles in cancer management. *Medicine (Baltimore).* 98(18):e15311. doi: 10.1097/MD.00000000000015311. PMID: 31045767; PMCID: PMC6504334.
45. Peters, T., Kim, S.-W., Castro, V., Stingl, K., Strasser, T., Bolz, S., Schraermeyer, U., Mihov, G., Zong, M., Andres-Guerrero, V., Vanrell, R.H., Dias, A.A., Cameron, N.R., Zrenner, E. (2017) Evaluation of polyesteramide (PEA) and polyester (PLGA) microspheres as intravitreal drug delivery systems in albino rats, *Biomaterials* 124: 157–168, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.006>.
46. Rezvantalab, S., Drude, N.I., Moraveji, M.K., Guvener, N., Koons, E.K., Shi, Y., Lammers, T., Kiessling, F. (2018) PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment, *Front. Pharmacol.* 9, 1260, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01260>.
47. Sakore, P., Bhattacharya, S., Belemkar, S., Prajapati, B.G., Elossaily, G.M. (2024) The theranostic potential of green nanotechnology-enabled gold nanoparticles in cancer: A paradigm shift on diagnosis and treatment approaches, *Results in Chemistry*, 7: 101264, <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101264>.
48. Simon, S., Sibuyi, N.R.S., Fadaka, A.O., Meyer, S., Josephs, J., Onani, M.O., Meyer, M., Madiehe, A.M. (2022) Biomedical Applications of Plant Extract-Synthesized Silver Nanoparticles. *Biomedicines*, 10, 2792. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112792>
49. Singh, A. and Maheshwari, S. (2024) Formulation, development and evaluation of Woodfordia fruticosa and β -sitosterol mediated silver nanoparticles gel for synergistic effect, *Intelligent Pharmacy*, 2(1):94-101, <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2023.10.012>
50. Sobhani, A., Rafienia, M., Ahmadian, M., Naimi-Jamal, M.-R. (2017) Fabrication and characterization of polyphosphazene/calcium phosphate scaffolds containing chitosan microspheres for sustained release of bone morphogenetic protein 2 in bone tissue engineering, *Tissue Eng. Regenerative Med.* 14 (5): 525–538, <https://doi.org/10.1007/s13770-017-0056-z>.
51. Songsurang, K., Praphairaksit, N., Siraleartmukul, K., Muangsin, N., (2011) Electrospray fabrication of doxorubicin-chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of doxorubicin, *Arch. Pharm. Res.* 34 (4): 583–592, <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0408-5>.
52. Sun, R., Shen, C., Shafique, S., Mustapha, O., Hussain, T., Khan, I.U., Mehmood, Y., Anwer, K., Shahzad, Y., Yousaf, A.M. (2020) Electrosprayed polymeric nanospheres for enhanced solubility, dissolution rate, oral bioavailability and antihyperlipidemic activity of bezafibrate, *Int. J. Nanomedicine* 15:705–715, <https://doi.org/10.2147/IJN.S235146>.
53. Tsai, S.W., Yu, D.S., Tsao, S.W., Hsu, F.Y., (2013) Hyaluronan-cisplatin conjugate nanoparticles embedded in Eudragit S100-coated pectin/alginate microbeads for colon drug delivery, *Int. J. Nanomedicine* 8: 2399– 2407, <https://doi.org/10.2147/IJN.S46613>.
54. Veisi, H. Hemmati, S., Shirvani, H., Veisi, H. (2016) Green synthesis and characterization of monodispersed silver nanoparticles obtained using oak fruit bark extract and their antibacterial activity, *Appl. Organomet. Chem.* 30 (6): 387–391. <https://doi.org/10.1002/aoc.3444>

55. Wang, D., Tao, S., Yin, S.-W., Sun, Y., Li, Y. (2020) Facile preparation of zein nanoparticles with tunable surface hydrophobicity and excellent colloidal stability, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 591, 124554, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124554>.
56. Wu, Y., Zhang, W., Huang, J., Luo, Z., Li, J., Wang, L., Di, L. (2020) Mucoadhesive improvement of alginate microspheres as potential gastroretentive delivery carrier by blending with *Bletilla striata* polysaccharide, *Int. J. Biol. Macromol.* 156: 1191–1201, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.156>.
57. Xie, L., Shen, M., Hong, Y., Ye, H., Huang, L., Xie, J. (2020) Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities, *Carbohydr. Polym.* 229: 115436, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115436>.
58. Yaqoubi, S., Adibkia, K., Nokhodchi, A., Emami, S., Alizadeh, A.A., Hamishehkar, H., Barzegar-Jalali, M., (2020) Co-electrospraying technology as a novel approach for dry powder inhalation formulation of montelukast and budesonide for pulmonary co-delivery, *Int. J. Pharm.* 591: 119970, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119970>
59. Zhang, Y. Li, Q., Wang, J., Cheng, F., Huang, X., Cheng, Y., Wang, K. (2016) Polysaccharide from *Lentinus edodes* combined with oxaliplatin possesses the synergy and attenuation effect in hepatocellular carcinoma, *Cancer Lett.* 377: 117–125, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.037>.
60. Zhao, H. Sun, D., Tang, Y. Yao, J., Yuan, X., Zhang, M. (2018) Thermo/pH dual-responsive core-shell particles for apatinib/doxorubicin controlled release: preparation, characterization and biodistribution, *J. Mater. Chem. B* 6 (46): 7621–7633, <https://doi.org/10.1039/c8tb02334d>.
61. Zhao, S., Huang, C., Yue, X., Li, X., Zhou, P., Wu, A., Chen, C., Qu, Y., Zhang, C. (2022) Application advance of electrosprayed micro/nanoparticles based on natural or synthetic polymers for drug delivery system, *Materials & Design*, 220, 110850, <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110850>.

PREGLED METODA ZA *IN VITRO* ISPITIVANJE INHIBICIJE GLIKACIJE PROTEINA

Alen Hatkić, Aida Smajlović, Adaleta Softić, Nahida Srabović, Esmeralda Dautović,
Dalila Halilčević, Asja Šarić, Maida Šljivić Husejnović

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

Pregledni rad

SAŽETAK

Hronične i netretirane hiperglikemije uzrokuju ne-enzimsko vezanje glukoze za proteine što se naziva glikacija. Prekomjerna glikacija proteina dovodi do stvaranja kasnih produkata glikacije koji se povezuju sa nefropatijom, neuropatijom, retinopatijom, kardiovaskularnim i neurodegenerativnim oboljenjima. Inhibicija glikacije proteina različitim antiglikacijskim spojevima smatra se važnom strategijom za smanjenje hiperglikemijom uzrokovanih komplikacija. *In vitro* ispitivanje antiglikacije proteina se može sprovesti različitim metodama. Ultravioletno-vidljivom (UV-VIS) spektrometrijom i poliakrilamidnom gelskom elektroforezom u prisustvu natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE) je moguće pratiti promjene u konformaciji glikiranih proteina. Za detekciju i kvantifikaciju AGE primjenjuje se fluorescentna spektrometrija i ELISA. Za potvrdu antiglikacijskog efekta izvode se i testovi vijabilnosti na ćelijama kao što je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid) test.

Ključne riječi: *glikacija proteina, AGE, UV-VIS spektrometrija, fluorescentna spektrofotometrija, MTT test*

Autor za korespondenciju: Mr.ph. Alen Hatkić, asistent
E-mail: alen.hatkic@untz.ba

METHODS REVIEW FOR *IN VITRO* ASSESSMENT OF PROTEIN GLYCATION INHIBITION

Alen Hatkić, Aida Smajlović, Adaleta Softić, Nahida Srabović, Esmeralda Dautović,
Dalila Halilčević, Asja Šarić, Maida Šljivić Husejnović

*Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla,
Bosnia and Herzegovina*

Review Article

ABSTRACT

Chronic and untreated hyperglycemia leads to non-enzymatic binding of glucose to proteins, termed glycation. Excessive protein glycation results in the formation of Advanced Glycation End products (AGEs), which are associated with nephropathy, neuropathy, retinopathy, cardiovascular and neurodegenerative diseases. Inhibiting protein glycation with various antiglycation compounds is considered a significant strategy for reducing diabetic complications. *In vitro* assessment of protein antiglycation can be performed using various methods. Changes in the conformation of glycated proteins can be tracked using Ultraviolet-visible (UV-VIS) spectrometry and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Fluorescent spectrometry and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) are utilized for the detection and quantification of AGEs. Viability tests on cells, such as the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay, are conducted to confirm the antiglycation effect.

Keywords: *protein glycation, AGE, UV-VIS spectrometry, fluorescent spectrophotometry, MTT assay*

Corresponding author: Alen Hatkić, MPharm, teaching assistant
Email: alen.hatkic@untz.ba

1. UVOD

Hiperglikemija podrazumijeva stanje povećane koncentracije glukoze u krvi. Nekontrorisane i netretirane hiperglikemije dovode do ne-enzimske glikacije biomolekula kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline. Glikacija uzrokuje strukturne promjene proteina pri čemu se remeti njihova funkcija. Reakcija glikacije se odvija između slobodnih amino grupa proteina i karbonilnih grupa redukujućih šećera pri čemu se formiraju visoko nestabilne Schiff-ove baze (Abdullah i sar., 2018). Nastale Schiff-ove baze se potom transformiraju u rane produkte glikacije tzv. Amadori produkte. Ovi intermedijeri podliježu kompleksnim reakcijama formirajući unakrsno povezane derivate koji su poznatiji pod nazivom kasni produkti glikacije (eng. *Advanced Glycation End products, AGE*) (Ahmad i sar., 2013).

Kasni produkti glikacije se fiziološki stvaraju u organizmu sa starenjem. Međutim, ovaj proces se može ubrzati u stanjima hiperglikemije, koja je karakteristična za dijabetes i upalnim bolestima (Khan i sar., 2021). AGE stimulišu intracelularni oksidativni stres kroz produkciju reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species, ROS*). Pokazano je da akumulacija AGE i oksidativni stres ubrzavaju proces starenja i povećavaju nastanak komplikacija dijabetesa kao što su retinopatija, nefropatija, neuropatija, denaturacija proteina i inflamacija. Također, kardiovaskularne bolesti, Alzheimerova bolest, cistična fibroza, šizofrenija, katarakta i neke vrste karcinoma su povezane sa povećanim nivoima AGE u organizmu (Rashedinia i sar., 2023).

Inhibicija glikacije proteina različitim antiglikacijskim spojevima smatra se važnom strategijom za smanjenje AGE posredovanih dijabetičkih komplikacija. Neke od prirodnih komponenti kao što su kurkumin, eugenol, rutin, timohinon, kvercetin i resveratol pokazuju značajni antioksidativni i antiglikacijski potencijal (Kumar i Ali, 2019). Sintetski spojevi uključujući aminogvanidin, piridoksamin, N-fenaciltiazolijev bromid i amlodipin poznati su kao efikasni inhibitori glikacije proteina. Ipak, njihove različite nuspojave ograničavaju njihovu kliničku primjenu (Rashedinia i sar., 2023).

Kao proteinski modeli za *in vitro* proučavanje antiglikacije proteina se najčešće koriste humani serum albumin (eng. *Human Serum Albumin, HSA*) ili goveđi serum albumin (eng. *Bovine Serum Albumin, BSA*). Glikacija se stimulira inkubacijom rastvora proteina u prisustvu glikirajućeg agensa (glukoza, fruktoza, riboza, glikoksal ili metilglioksal) i potencijalnog inhibitora glikacije pri različitim koncentracijama (Anis i Sreerama, 2020; Lixian Mou i sar., 2022; Qais i sar., 2021).

Za *in vitro* istraživanje i karakterizaciju glikacije i njenih produkata primjenjuje se nekoliko metoda među kojima su najznačajnije: spektroskopske: UV/VIS spektrometrija, fluorescentna spektrometrija, cirkularni dihiroizam (CD); separacione: poliakrilamidna gelska elektroforeza u prisustvu natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE); tečna hromatografija visokih performansi (HPLC), testovi citotoksičnosti: PrestoBlue test, MTT esej, te imunohemijske metode. Međutim, zbog kompleksne prirode glikacije i širokog spektra hemijskih struktura i fizičkih svojstava produkata glikacije, ne postoji standardizirana metoda (Perrone i sar., 2020). U ovom radu je prikazan kratak osvrt najvažnijih metoda za *in vitro* ispitivanje inhibicije glikacije proteina.

2. UV-VIS SPEKTROMETRIJA

UV-VIS spektrometrija je nedestruktivna metoda kojom se ispituju apsorpcione osobine molekule u oblasti elektromagnetskog spektra i to od 100 do 380 nm za ultraljubičasto (UV) i od 380-780 nm za vidljivo područje. Ovom metodom se analiziraju apsorpcioni spektri koji potiču od elektronskih

prijelaza u molekulu. Kvantifikacija analita, u ovoj tehnici, temelji se na Lambert-Beerovom zakonu, koji kaže da je količina svjetlosti koju apsorbuje analit u homogenom izotropnom mediju proporcionalna količini analita u uzorku. Lambert-Beerov zakon može se izraziti kao:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

gdje je A - apsorbanca, ε - molarni apsorpcioni koeficijent, l - dužina puta kroz otopinu, a c - koncentracija analita koji apsorbuje svjetlost (Munjanja i Sanganyado, 2015; Mandru i sar., 2023).

Glavne prednosti UV-Vis spektroskopije kao analitičke metode su:

- (i) cijena,
- (ii) nedestruktivnost;
- (iii) analiza male količine uzoraka u sva tri agregatna stanja;
- (iv) jednostavnost rukovanja;
- (v) brzina analize;
- (vi) kvantifikacija i kvalifikacija analita.

Ograničenja UV-Vis spektroskopije su:

- (i) nije pogodna za supstance koje ne apsorbuju u ultraljubičastom ili vidljivom području elektromagnetnog spektra;
- (ii) pojava raspršenja tokom rada sa suspenzijama;
- (iii) otežana analiza višekomponentnih smjesa uz formiranje preklapajućih spektara;
- (iv) dobiveni rezultati ovise o pH i temperaturi (Jurina i sar., 2023).

UV/VIS spektrometrija je našla primjenu i u karakterizaciji strukture proteina. Proteini pokazuju maksimum apsorpcije na oko 280 nm koji potiče uglavnom od aromatskih aminokiselina (triptofan, tirozin i fenilalanin). Promjene apsorbanca pri 280 nm ukazuju na strukturne promjene proteina u neposrednoj blizini aromatskih aminokiselinskih ostataka (Salem i sar., 2019).

Arfin i sar. (2018) su ispitivali antiglikacijski potencijal izoferulične kiseline, pri čemu su kao proteinski model koristili HSA, a fruktozu kao glikirajući agens. Ispitivali su strukturne promjene uzoraka nativnog HSA, glikiranog HSA i glikiranog HSA sa različitim koncentracijama izoferulične kiseline. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da nativni HSA pokazuje karakterističan maksimum na 280 nm. Glikirani uzorak HSA pokazao je hiperhromatičnost, povećanje apsorbanca gotovo 3,5 puta od nativnog HSA, što se može pripisati promjeni strukture proteina izazvanoj glikacijom. Uzorci inkubirani sa različitim koncentracijama izoferulične kiseline pokazali su dozno-ovisno smanjenje apsorbanca. Ovo sugerše da izoferulična kiselina spriječava fruktozom izazvano odvijanje lanca HSA i time zadržava njegovu nativnu konformaciju.

3. FLUORESCENTNA SPEKTROMETRIJA

Fluorescentna spektroskopija (ili fluorimetrija) je metoda koja se zasniva na mjerenju fluorescencije koju emitiraju supstance nakon izlaganja ultraljubičastom, vidljivom ili drugom elektromagnetskom zračenju. Molekule, zbog svojih vibracijskih energetskih nivoa, emitiraju svjetlost niže energije (dulje talasne dužine) od apsorbirane svjetlosti. Ovaj fenomen se naziva Stokesov pomak i događa se zbog gubitka energije u raspadu bez zračenja. Kada molekula u osnovnom energetskom nivou (S_0) apsorbira foton dovoljne energije, elektron prelazi na viši energetski nivo (S_1 ili S_2) jednak energiji apsorbiranog fotona. Ako se elektron, slijedeći relaksacijski put, vrati u svoje prvobitno stanje emitirajući foton,

ta se pojava naziva fotoluminiscencija. Razlikujemo dvije vrste fotoluminiscencije, fluorescencija i fosforescencija. Kod fluorescencije elektron sa singletnog pobuđenog nivoa radijacijski se raspada u osnovno singletno stanje unutar karakterističnog vremena raspada reda veličine od 10^{-10} do 10^{-7} s. Fosforescencija nastaje kada se elektron, nakon prijelaza iz singletnog pobuđenog stanja u tripletno stanje, radijacijski vrati u osnovno singletno stanje. (Zacharioudaki i sar., 2022). Molekule uzorka koje emituju fluorescenciju prilikom vraćanja u osnovno energetska stanje, mogu se detekovati mjerenjem intenziteta te emisije.

Fluorescentna spektroskopija je široko prihvaćena i moćna tehnika koja je našla primjenu u ekološkim i industrijskim analizama, medicinskoj dijagnostici, sekvenciranju DNA, forenzici, genetskoj analizi i biotehnologiji.

Značaj fluorescentne spektrometrije u analitičkim istraživanjima su:

- (i) brzina,
- (ii) jednostavnost izvođenja,
- (iii) velika osjetljivost metode (200 do 300 puta osjetljivija od UV/VIS spektroskopije sa granicom detekcije oko 10^{-11} mol/l),
- (iv) visoka specifičnost koja se dovodi u vezu sa izborom talasne dužine ne samo za emitirano zračenje, već i za svjetlo koje ga pobuđuje.

Međutim, ova tehnika ima i svoja ograničenja:

- (i) UV svjetlo koje se koristi za pobuđivanje može uzrokovati fotohemijske promjene ili degradaciju fluorescentne molekule;
- (ii) prisustvo rastvorenog kisika u uzorku može izazvati fotohemijsko razaranje molekule;
- (iii) tragovi jodida i nitrogenovih oksida izazivaju gašenje fluorescencije i stoga interferiraju prilikom mjerenja;
- (iv) opseg primjenljivosti ove tehnike je ograničen jer većina elemenata i spojeva generalno ne pokazuju fluorescenciju, što se rješava hemijskim vezivanjem sa pogodnim fluorescentnim molekulama, tzv. sondama (Bose i sar., 2018; Smajlović, 2015);
- (v) reagensi moraju biti ultravisoke čistoće i ne smiju jako apsorbovati UV zračenje.

3.1. AGE - specifična fluorescentna spektrometrija

AGE uključuju heterogenu grupu jedinjenja od kojih mnoga pokazuju jaku fluorescenciju prilikom ekscitacije na talasnim dužinama od 300 do 400 nm (Al Jaseem i sar., 2021). Argpirimidin i pentosidin su dobro okarakterizirani AGE spojevi. To su derivati arginina čiji se sadržaj može pratiti spektrofotometrijski na 335 nm pri čemu pokazuju specifičan pik. Malondialdehid (MDA) je još jedan AGE adukt koji specifično fluorescira na 370 nm. MDA pokazuje veliku reaktivnost prema proteinima i nukleinskim kiselinama, te mutagene i citotoksične efekte (Shamsi i sar., 2020). Ova metoda je brza i jednostavna, međutim nema mogućnost detekcije ne-fluorescentnih AGE spojeva koji mogu da izazovu interferencije prilikom mjerenja (Perrone i sar., 2020).

Abdullah i sar. (2018) su ispitali inhibiciju glikacije HSA primjenom piridoksamina (vitamin B₆). Fluorescentne spektre uzoraka nativnog HSA, glikiranog HSA i glikiranog HSA koji je tretiran piridoksaminom, snimali su pri ekscitaciji od 370 nm. Rezultati njihovih istraživanja su pokazali da nativni HSA pokazuje slabu AGE fluorescenciju, dok je kod glikiranog HSA uočen veliki intenzitet fluorescencije na oko 440 nm. Ovaj jak emisijski pik potvrđuje prisustvo fluorescentnih AGE produkata u glikiranim uzorcima. Piridoksamin je pokazao dozno-ovisan efekat na formiranje fluorescentnih

AGE. Pokazano je da 50, 100, 200 i 500 μM piridoksamin smanjuje sadržaj fluorescentnih AGE-a za 5,9, 14,8, 23,2 i 33,4% u poređenju sa glikiranim uzorkom.

3.2. ANS fluorescentna spektrometrija

1-anilino-8-naftalensulfonat (ANS) je fluorescentna boja koja se koristi za detekciju hidrofobnih domena na proteinu. Emitira slabu fluorescenciju u polarnom okruženju. Međutim, u nepolarnom okruženju, kada se veže na hidrofobne regije na proteinima, emisija ANS fluorescencije značajno se povećava (Shamsi i sar., 2020; Alvi i sar., 2021). ANS se veže za molekule proteina hidrofobnim i elektrostatskim interakcijama (između negativno nabijenih sulfonatnih skupina ANS-a i pozitivno nabijenih aminokiselina kao što su histidin, lizin ili arginin). ANS se eksitira pri talasnoj dužini od 380 nm, a fluorescentni emisijski spektri se snimaju u području od 400-600 nm (Hawe i sar., 2008).

U studiji koju su proveli Shamsi i sar. (2020), ANS fluorescentnom spektrometrijom su ispitivali antiglikacijski efekat ruzmarinske kiseline. Proteinski model u ovom istraživanju bio je HSA, a kao glikacijski agens su koristili metilgliksal. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da glikirani HSA pokazuje jako visok intenzitet ANS fluorescencije što se pripisuje izlaganju hidrofobnih regija proteina uslijed kovalentne modifikacije (glikacija). Prisustvo ruzmarinske kiseline u uzorku glikiranog HSA dovelo je do smanjenja intenziteta fluorescencije, što sugerira da ruzmarinska kiselina sprječava glikacijom izazvano izlaganje hidrofobnih regija proteina (Shamsi i sar., 2020).

4. POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA U PRISUSTVU NATRIJEVOG DODECIL SULFATA (SDS-PAGE)

Najčešće korištena metoda za preciznu separaciju proteinskih smjesa je SDS-PAGE. Zasniva se na denaturaciji proteina iz uzorka pomoću anionskog deterdženta (Tokur i Korkmaz, 2023). Najčešće se koristi natrijev dodecil sulfat (SDS) koji se veže za proteine u količinama koje su proporcionalne molekularnoj težini proteina, gdje se otprilike jedna molekula SDS-a veže za svaka dva aminokiselinska ostatka. Vezani SDS doprinosi velikom neto negativnom naboju, čineći unutrašnji naboj proteina značajnim i dajući svakom proteinu sličan omjer naboja i mase. Osim toga, nativna konformacija proteina se mijenja kada je vezan SDS pri čemu većina proteina poprima sličan oblik. Nakon toga, elektroforeza se provodi korištenjem propusnog poliakrilamidnog gela, koji efikasno i sa visokom preciznošću separira proteine na osnovu njihove molekulske mase. Manji peptidi migriraju brže, dok peptidi veće molekulske mase sporije (Tokur i Korkmaz, 2023; Nelson i Cox, 2017).

Ova metoda je pogodna u uvjetima koji ne zahtijevaju zadržavanje native strukture ili funkcije proteina; kao što je procjena čistoće uzoraka proteina, procjena ekspresije proteina, te imunohemijska identifikacija i kvantifikacija proteina. Glavno ograničenje SDS-PAGE je denaturacija proteina prije samog izvođenja elektroforeze. Prema tome, ova metoda nije pogodna za ispitivanje enzimske aktivnosti, interakcije vezanja proteina, te detekcije proteinskih kofaktora (Nowakowski i sar., 2014). SDS-PAGE je našla primjenu u proučavanju inhibicije glikacije proteina. Mehran Miroliaei i sar. (2017) ispitivali su antiglikacijski potencijal ekstrakata korijena vrste *Perovskia atriplicifolia*, *Lamiaceae* koristeći SDS-PAGE. Njihova studija je pokazala da glikirani HSA pokazuje manju elektroforetsku pokretljivost i povećanje intenziteta trake, u odnosu na uzorak nativnog HSA. Ovo je vjerovatno posljedica povećanja molekulske težine glikiranog HSA uslijed vezanja glukoze. Međutim, u prisustvu testiranog biljnog ekstrakta, glikirani HSA je pokazao smanjenje hiperhromnosti i povećanje elektroforetske migracije.

5. MTT ESEJ

MTT esej je kolorimetrijska metoda koju je izvorno opisao Mosmann (1983). Koristi se za ispitivanje ćelijske proliferacije, citotoksičnosti i metaboličke aktivnosti ćelija. Princip ovog testa temelji se na redukciji u vodi rastvoljive, žuto obojene tetrazolijeve soli, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid), u nerastvoljive u vodi ljubičaste kristale formazana od strane metabolički aktivnih ćelija (Oh i Hong, 2021; Buranaamnuay, 2021). MTT reagens može proći kroz ćelijsku membranu, kao i mitohondrijsku unutarnju membranu, vjerojatno zbog svog pozitivnog naboja kao i lipofilne strukture. Nastali igličasti kristali formazana se otapaju dodatkom organskog rastvarača kao što je dimetil sulfoksid (DMSO) (Ghasemi i sar., 2021). Rezultirajućem obojenom rastvoru mjeri se optička gustoća na specifičnoj talasnoj dužini između 500 i 600 nm, pomoću spektrofotometra ili čitača ploča. Intenzitet boje formazana proporcionalan je broju vijabilnih, metabolički aktivnih ćelija (Buranaamnuay, 2021).

MTT esej ima značajnu primjenu:

- (i) može se koristiti za širok spektar eukariotskih ćelija;
- (ii) omogućava objektivnu procjenu i ispitivanje više uzoraka istovremeno;
- (iii) ne zahtijeva skupu opremu, a dobiveni produkti (kristali formazana) su stabilni duži vremenski period.

Međutim, ovaj esej ima i svoja ograničenja:

- (i) MTT reagens je fotolabilan i osjetljiv na kontaminaciju mikroorganizmima ili ćelija;
- (ii) pH medija značajno utiče na očitane apsorbancu;
- (iii) zahtijeva duže vrijeme inkubacije u poređenju sa drugim testovima vijabilosti;
- (iv) ne postoje standardni protokoli tako da je metodu potrebno optimizirati;
- (v) kristali formazana mogu uticati na morfologiju ćelija (Buranaamnuay, 2021).

Alhadid i sar. (2022) su ispitivali citoprotektivni efekat vanilinske kiseline na ćelijskoj liniji mišjih makrofaga (RAW 264.7). Ćelije su tretirali uzorcima glikiranog BSA, te glikiranog BSA sa različitim koncentracijama vanilinske kiseline. MTT testom su ispitivali vijabilnost tretiranih ćelija. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da glikirani BSA smanjuje vijabilnost ćelija. Ovo je vjerovatno posljedica nastalih AGE i ROS-a koji generalno remete metabolizam i ćelijski ciklus. Međutim, vanilinska kiselina je pokazala dozno-ovisno povećanje vijabilnosti tretiranih ćelija, što sugeriše da vanilinska kiselina djeluje kao inhibitor glikacije smanjujući nivo nastalih AGE.

6. ENZIMSKI POVEZANI IMUNOSORBENTNI ESEJ (ELISA)

ELISA je imunohemijska metoda koja se temelji na konceptu reakcije antigen-antitijelo. Ona omogućava vrlo osjetljivu i selektivnu kvantitativnu/kvalitativnu analizu antigena, uključujući proteine, peptide, nukleinske kiseline, hormone, citokine, herbicide i sekundarne metabolite biljaka (Khan i sar., 2023; Sakamoto i sar., 2018). Metoda se zasniva na primjeni antitijela označenim enzimima (sekundarno antitijelo) kao što su alkalna fosfataza (ALP), peroksidaza hrena i β -galaktozidaza. U najčešćem pristupu ELISA tehnike, uzorak koji sadrži antigen (Ag), koji se kvantificira, dodaje su u mikrotitar pločicu koja sadrži imobilizirano antitijelo (At). Antigen iz uzorka se vezuje za imobilizirano antitijelo. Nakon ispiranja nevezanog materijala, dodaje se antitijelo označeno enzimom i formira

“sendvič kompleks” At-Ag-At (Alhajj i sar., 2023). Dodatkom hromogenog supstrata dolazi do razvoja obojenja. Na primjer, ALP hidrolizira p-nitrofenilfosfat u p-nitrofenol koji se može detektovati na 405 nm (žuta boja). Na kraju, obojeni ili fluorescentni proizvodi detekuju se pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Sakamoto i sar., 2018).

ELISA posjeduje sljedeće prednosti:

- (i) jednostavan postupak;
- (ii) visoka specifičnost i osjetljivost zbog reakcije antigen-antitijelo;
- (iii) visoka efikasnost jer se mogu provoditi simultane analize bez komplicirane predobrade uzorka;
- (iv) ne zahtijeva upotrebu radioaktivnih tvari i velikih količina organskih rastvarača tako da je općenito sigurna i ekološki prihvatljiva metoda;
- (v) isplativa jer se koriste jeftini reagensi.

Međutim, ELISA ima sljedeće nedostatke:

- (i) zahtjevna i skupa priprema antitijela jer se radi o sofisticiranoj tehnici;
- (ii) velika mogućnost lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata zbog nedovoljnog blokiranja površine mikrotitar ploča imobiliziranim antitijelom;
- (iii) nestabilnost antitijela jer su antitijela proteini koji zahtijevaju hladni transport i skladištenje (Sakamoto i sar., 2018).

Alethia Muñiz i sar. (2018) su ispitivali antiglikacijski efekat ekstrakata plodova vrste *Spondias purpurea*, *Anacardiaceae*. U svom istraživanju su koristili ELISA tehniku za određivanje Nε-(karboksimetil) lizina (eng. Nε-(carboxymethyl) lysine, CML). CML je glavni antigeni ne-fluorescentni AGE. Rezultati njihove studije su pokazali da uzorci glikiranog proteina pokazuju visok nivo CML-a, dok ispitivani biljni ekstrakt uzrokuje dozno-ovisno smanjenje koncentracije CML-a.

7. ZAKLJUČAK

Ranije je naglašeno da ne postoji standardizirana metoda za *in vitro* karakterizaciju i proučavanje glikacije proteina. Zbog toga je potrebno sa više različitih aspekata i metoda ispitati ovaj kompleksan biohemijski fenomen. Neke od metoda se baziraju na praćenju promjene strukture i konformacije proteina koja se dešava glikacijom kao vrstom kovalentne modifikacije. Osim toga, koriste se i metode koje se zasnivaju na detekciji i mjerenju nastalih produkata glikacije kao što su AGE. Također, da bi se antiglikacijski efekat potvrdio, potrebno je žive organizme i/ili ćelijske kulture tretirati glikiranim proteinima. Kombinacija navedenih pristupa omogućava detaljan i kvalitetan uvid u molekularni mehanizam glikacije proteina te ispitivanje supstanci koje bi se mogle ponašati kao potencijalni inhibitori glikacije.

8. LITERATURA

1. Abdullah KM, Qais FA, Ahmad I, Hasan H, Naseem I (2018) Study of pyridoxamine against glycation and reactive oxygen species production in human serum albumin as model protein: An *in vitro* & *ex vivo* approach. *Int J Biol Macromol.*120(Pt B):1734-1743.

2. Ahmad S, Shahab U, Baig MH, Khan MS, Khan MS, Srivastava AK et al. (2013) Inhibitory Effect of Metformin and Pyridoxamine in the Formation of Early, Intermediate and Advanced Glycation End-Products. *PLoS ONE* 8(9): e72128.
3. Al Jaseem MAJ, Abdullah KM, Qais FA, Shamsi A, Naseem I (2021) Mechanistic insight into glycation inhibition of human serum albumin by vitamin B9: Multispectroscopic and molecular docking approach. *Int J Biol Macromol.* 30;181:426-434.
4. Alhadid A, Bustanji Y, Harb A, Al-Hiari Y, Abdalla S (2022) Vanillic Acid Inhibited the Induced Glycation Using In Vitro and In Vivo Models. *Evid Based Complement Alternat Med.* 18:7119256.
5. Alhajib M, Zubair M, Farhana A (2023) Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
6. Alvi SS, Nabi R, Khan MS, Akhter F, Ahmad S, Khan MS (2021) Glycyrrhizic Acid Scavenges Reactive Carbonyl Species and Attenuates Glycation-Induced Multiple Protein Modification: An In Vitro and In Silico Study. *Oxid Med Cell Longev.* 11:7086951.
7. Anis MA, Sreerama YN (2020) Inhibition of protein glycoxidation and advanced glycation end-product formation by barnyard millet (*Echinochloa frumentacea*) phenolics. *Food Chem.* 15;315:126265.
8. Arfin S, Siddiqui GA, Naeem A, Moin S. (2018) Inhibition of advanced glycation end products by isoferulic acid and its free radical scavenging capacity: An in vitro and molecular docking study. *Int J Biol Macromol.* 118(Pt B):1479-1487.
9. Bose A, Thomas I, Kavitha G, Abraham E (2018) *Int J Adv in Pharm Anal.* 08(01): 01-08.
10. Buranaamnuay K (2021) The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Vet J.* 11(2):251-269.
11. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021) The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.* 26;22(23):12827.
12. Hawe A, Sutter M, Jiskoot W (2008) Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm Res.* 25(7):1487-99.
13. Jurina T, Cvetnić TS, Šalić A, Benković M, Valinger D, Kljusurić JG et al. (2023) Application of Spectroscopy Techniques for Monitoring (Bio)Catalytic Processes in Continuously Operated Microreactor Systems. *Catalysts.* 13,690.
14. Khan M, Hussain SS, Salman M, Abdullah A, Hayat F, Akbar S (2023) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Chemiluminescent Immunoassay: A General Overview. *Glob J Med Pharm and Biomed.* 18(1).
15. Khan MWA, Otaibi AA, Alhumaid AFM, Alsukaibi AKD, Alshamari AK, Alshammari EM et al. (2021) Garlic Extract: Inhibition of Biochemical and Biophysical Changes in Glycated HSA. *Appl. Sci.* 11, 11028.
16. Kumar D, Ali A (2019) Antiglycation and antiaggregation potential of thymoquinone. *Nat. Volatiles & Essent. Oils.* 6(1): 25-33.
17. Mandru A, Mane J, Mandapati R (2023) A Review on UV-visible spectroscopy. *J of Pharm In and Res.* 1(2), 091–096.
18. Miroliaei M, Aminjafari A, Ślusarczyk S, Nawrot-Hadzik I, Rahimmalek M, Matkowski A (2017) Inhibition of Glycation-induced Cytotoxicity, Protein Glycation, and Activity of Proteolytic Enzymes by Extract from *Perovskia atriplicifolia* Roots. *Pharmacogn Mag.* 13(Suppl 3):S676-S683.
19. Mou L, Hu P, Cao X, Chen Y, Xu Y, He T et al. (2022) Comparison of bovine serum albumin glycation by ribose and fructose in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1;1868(1):166283.

20. Muñiz A, Garcia E, Gonzalez D, Zuñiga L (2018) Antioxidant Activity and In Vitro Antiglycation of the Fruit of *Spondias purpurea*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 29;2018:5613704.
21. Munjanja B, Sanganyado E (2015) UV-Visible Absorption, Fluorescence and Chemiluminescence Spectroscopy. In: Nollet L and Toldra F (eds) *Handbook of Food Analysis - Two Volume Set*, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton.
22. Nelson DL. et Cox MM (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman. New York.
23. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH (2014) Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics.* 6(5):1068-78.
24. Oh YJ et Hong J (2021) Application of the MTT-based colorimetric method for evaluating bacterial growth using different solvent systems. *LWT.* 153.112565.
25. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F (2020) Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxid Med Cell Longev.* 18;2020:3818196.
26. Qais FA, Sarwar T, Ahmad I, Khan RA, Shahzad SA, Husain FM (2021) Glyburide inhibits non-enzymatic glycation of HSA: An approach for the management of AGEs associated diabetic complications. *Int J Biol Macromol.* 1;169:143-152.
27. Rashedinia M, Rasti Arbabi Z, Sabet R, Emami L, Poustforoosh A, Sabahi Z (2023) Comparison of Protective Effects of Phenolic Acids on Protein Glycation of BSA Supported by In Vitro and Docking Studies. *Biochem Res Int.* 9984618.
28. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H et al. (2018) Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.* 72(1):32-42.
29. Salem AA, Lotfy M, Amin A, Ghattas MA (2019) Characterization of human serum albumin's interactions with safranal and crocin using multi-spectroscopic and molecular docking techniques. *Biochem Biophys Rep.* 12;20:100670.
30. Shamsi A, Ahmed A, Khan MS, Husain FM, Bano B (2020) Rosmarinic acid restrains protein glycation and aggregation in human serum albumin: Multi spectroscopic and microscopic insight - Possible Therapeutics Targeting Diseases. *Int J Biol Macromol.* 15;161:187-193.
31. Smajlović A (2015) Eksperimentalna biohemija. OFF-SET Tuzla, Tuzla.
32. Tokur B, Korkmaz K (2023) Electrophoretic Methods for Identifying the Species of Seafood and Its Derivatives. *Food Bulletin.* 2,61-70.
33. Zacharioudaki DE, Fitis I, Kotti M (2022) Review of Fluorescence Spectroscopy in Environmental Quality Applications. *Molecules.* 27;27(15):4801.

TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI (HPLC) U ANALIZI FENOLNIH SPOJEVA LAMIACEAE VRSTA

Lamija Kolarević¹, Ermina Cilović Kozarević¹,
Broza Šarić-Kundalić¹, Maida Šljivić Husejnović¹

¹*Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina*

Pregledni rad

SAŽETAK

Ljekovite biljke sadrže širok spektar spojeva koji pokazuju benefite u prevenciji ili liječenju različitih oboljenja. Uprkos velikom broju ljekovitih biljnih vrsta, korištenih širom svijeta, samo mali dio je detaljno istražen i fitohemijski i farmakološki. Stoga je neophodno imati na raspolaganju efikasne sisteme za brzi hemijski i biološki skrining biljnih uzoraka. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) je jedna od neizostavnih analitičkih tehnika u kontroli kvaliteta biljnih sirovina, biljnih preparata i lijekova. Rezoluciona moć HPLC-a je prilagođena brzom obradi višekomponentnih uzoraka, što omogućava karakterizaciju i kvantifikaciju sekundarnih metabolita u biljnim uzorcima, odgovornih za različite biološke aktivnosti. Fenolni spojevi se javljaju kao sekundarni metaboliti u biljkama, a njihov značaj ogleda se u širokom spektru bioaktivnosti, poput antioksidativnog, antiinflamatornog, antimutagenog, antikancerogenog djelovanja, itd. Različiti spojevi iz klase polifenola zastupljeni su u biljnim vrstama *Lamiaceae* porodice, koje su globalno poznate zbog svojih ljekovitih svojstava. HPLC analiza je najčešće korištena metoda za identifikaciju i kvantifikaciju ovih spojeva, a u ovom radu urađen je osvrt na prednosti i ograničenja primjene ove hromatografske metode u svrhu ispitivanja polifenolnih spojeva iz *Lamiaceae* porodice.

Ključne riječi: *HPLC, Lamiaceae, polifenoli*

Autor za korespondenciju: Mr.ph. Lamija Kolarević, asistent
E-mail: lamija.kolarevic@untz.ba

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) IN THE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS OF LAMIACEAE SPECIES

Lamija Kolarević¹, Ermina Cilović Kozarević¹,
Broza Šarić-Kundalić¹, Maida Šljivić Husejnović¹

¹*Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla,
Bosnia and Herzegovina*

Review article

SUMMARY

Medicinal plants contain a wide range of compounds that show benefits in the prevention or treatment of various diseases. Despite the large number of medicinal plant species, used all over the world, only a small part has been investigated in detail, both phytochemically and pharmacologically. Therefore, it is necessary to have efficient systems available for rapid chemical and biological screening of plant samples. High-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the indispensable analytical techniques in the quality control of herbal raw materials, herbal preparations, and medicines. The resolving power of HPLC is adapted to the rapid processing of multicomponent samples, which enables the characterization and quantification of secondary metabolites in plant samples, responsible for various biological activities. Phenolic compounds occur as secondary metabolites in plants, and their importance is reflected in a wide spectrum of bioactivity, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, anticancer effects, etc. Various compounds from the class of polyphenols are represented in plant species of the *Lamiaceae* family, which are globally known for their medicinal properties. HPLC analysis is the most commonly used method for the identification and quantification of these compounds, and this paper reviews the advantages and limitations of the application of this chromatographic method to test polyphenolic compounds from the *Lamiaceae* family.

Key words: HPLC, Lamiaceae, polyphenols

Corresponding author: Mr.ph. Lamija Kolarević, teaching assistant
E-mail: lamija.kolarevic@untz.ba

UVOD

Ljekovite biljke sadrže širok spektar supstanci koje se mogu koristiti u prevenciji ili pomoći u liječenju oboljenja. Farmakološke aktivnosti ljekovitih biljaka su posljedica djelovanja njihovih sekundarnih metabolita ili fitospojeva. Fitospojevi su se pokazali važnim kao sigurnije, a efikasne alternative nekim sintetskim supstancama. Najvažniji sekundarni metaboliti su fenolni spojevi, alkaloidi, tanini, saponini, ugljikohidrati, glikozidi, flavonoidi i drugi. Sekundarni metaboliti biljaka ostvaruju korisne biološke aktivnosti poput antikancerogenih, antimikrobnih, antioksidativnih, protuupalnih, analgetskih i drugih.

Iako postoji veliki broj ljekovitih biljnih vrsta širom svijeta, samo mali dio je istražen i fitohemijski i farmakološki. Snažan uticaj na sadržaj aktivnih spojeva u biljkama imaju faktori poput geografskog područja, genotipa, klime, vremena sakupljanja, te procesa pripreme i obrade biljnih sirovina. Pritom se mora uzeti u obzir prisustvo i do hiljade spojeva različitih polariteta, koji u biljkama često grade komplekse ili mogu biti prisutni u malim količinama, te u pratnji drugih spojeva slične strukture. Sve to otežava process izolacije i hemijske analize ovih spojeva. Njihovo razdvajanje, radi identifikacije i karakterizacije, je i dalje veliki izazov. Stoga je neophodno imati na raspolaganju efikasne sisteme za brzi hemijski i biološki skrining biljnih uzoraka. Svaka analitička metoda prikladna za karakterizaciju fitospojeva u ljekovitom bilju mora ispuniti visoke zahtjeve u pogledu efikasnosti separacije, selektivnosti i osjetljivosti (Boligon i Athayde, 2014). Do sredine 20. stoljeća analitička separacija se provodila uglavnom konvencionalnim metodama, odnosno taloženjem, destilacijom i ekstrakcijom. Botaničar Mikhail Tswett, 1903. godine je prvi izumio i uveo naziv hromatografija, izveden od grčke riječi “chroma” što znači boja i “graphein” što znači pisati. M. Tswett je za odvajanje biljnih pigmenta koristio staklenu kolonu ispunjenu kalcij karbonatom (Lozano-Sánchez i sar., 2018). Glavni problem u odvajanju složenih biljnih uzoraka hromatografijom je pronalaženje sistema koji imaju specifičnu selektivnost. Zbog gore navedenih osobina fitospojeva, tehnika poput tankoslojne hromatografije (TLC) u većini slučajeva nije optimalan izbor analitičke metode. Međutim, često može dati važne informacije o biljnom ekstraktu, pa se koristi za preliminarni skrining izdvojenih spojeva. Gasna hromatografija (GC) ograničena je uglavnom na hlapljive spojeve. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC), sa druge strane, nudi ogromnu varijabilnost u pogledu primjenjivih stacionarnih faza i detektora, rješavajući skoro svaki problem odvajanja (Cimpan i Gocan, 2002; Ganzera i Sturm, 2018).

Princip HPLC metode i instrumentacija

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) je tehnika koja je od izuzetne važnosti u identifikaciji i kvantifikaciji specifičnih fitospojeva, koji mogu biti nosioci biološke aktivnosti biljnih droga, preparata i lijekova. Rezultati dobijeni primjenom HPLC tehnike, korišteni su u procjeni kontrole kvalitete biljnih preparata i dodataka prehrani, koji su sve prisutniji na tržištu i u farmaceutskoj djelatnosti. Tehnika se odlikuje primjenom visokog pritiska, čija je svrha smanjenje vremena analize. Poboljšanjem kolona i detektora postignut je suštinski napredak u performansama. Pomoću HPLC može se razdvojiti mješavina spojeva, različitih molekularnih masa i polarnosti, te se ova tehnika široko koristi u fitohemijskoj analizi za identifikaciju, kvantifikaciju i prečišćavanje pojedinačnih komponenti mješavine. Rezoluciona moć HPLC je prilagođena za brzu obradu višekomponentnih uzoraka, te omogućava karakterizaciju i kvantifikaciju sekundarnih metabolita u biljnim ekstraktima, uglavnom fenola, steroida, flavonoida, alkaloida (Boligon i Athayde, 2014; Cimpan i Gocan, 2002; Steinmann i Ganzera, 2011). Princip hromatografskog odvajanja uključuje propuštanje smjese supstanci, nošenih

mobilnom fazom, kroz kolonu sa stacionarnom fazom, pri čemu se dvije faze ne miješaju, a supstance se raspoređuju između njih, ovisno o svojim fizičko-hemijskim karakteristikama. Moguće interakcije između stacionarne i mobilne faze uključuju adsorpciju, distribuciju na osnovu hidrofobnosti (reverzno-fazna hromatografija; RP-HPLC) i polarnosti (normalno-fazna hromatografija; NP-HPLC), jonsku izmjenu, afinitetnu i ekskluzionu separaciju (Lozano-Sánchez i sar., 2018). Budući da je stacionarna faza fiksna, supstance koje imaju jaču interakciju sa stacionarnom fazom, kretat će se sporije od onih koje imaju manju ili nikakvu interakciju sa stacionarnom fazom. Stoga, hromatografsko razdvajanje zavisi od jačine interakcije analita sa fazama. Ove interakcije između analita i faza određuju vrijeme zadržavanja supstanci u koloni. Spojevi koji eluiraju iz kolone, detektuju se pomoću pogodnog detektora. Nakon obrade podataka, rezultati se prikazuju u vidu grafičkog prikaza hromatograma. HPLC može biti spregnuta sa različitim sistemima za detekciju, kao što su UV-Vis spektroskopija, masena spektrometrija (MS), spektroskopija nuklearne magnetne rezonance (NMR), detektor indeksa refrakcije (RI ili RID) itd. Spregnute metode, poput HPLC-NMR ili HPLC-MS, imaju važnu ulogu u analizi prirodnih produkata, jer omogućavaju brzu analizu ili skrining sirovih bioloških ekstrakata ili gotovih farmaceutskih oblika (Lozano-Sánchez i sar., 2018; Wolfender, 2009; Flandez i sar., 2023). Novije HPLC tehnike omogućavaju kombinaciju višestrukih tehnika, kao što je HPLC-NMR-MS. Ekdisteroidi iz sirovih ekstrakata *Silene otites*, *Silene nutans* i *Silene frivaldiskiana* ispitivani su kombinacijom različitih spektrometara sa HPLC, što je omogućilo dobijanje UV, 1H NMR, IR i MS spektara. Na ovaj način poboljšana je identifikacija spojeva u biljnim ekstraktima (Cimpan i Gocan, 2002). HPLC-NMR-MS je korisna tehnika u cilju dobivanja kvalitativnih podataka i identifikacije razdvojenih supstanci. Međutim, kombinacija HPLC-a sa MS-om nije pogodna kao preparativna hromatografska metoda kada se koristi MS detektor, jer dolazi do potpunog uništavanja analita tokom procesa. Ovisno o prirodi, hemijskoj strukturi i molekularnoj težini analita, razvijene su različite vrste HPLC metode, koje daju kvalitativne i kvantitativne podatke o pojedinačnim komponentama uzorka koji se proučava (Lozano-Sánchez i sar., 2018).

Fenolni spojevi u *Lamiaceae* vrstama

Biljna porodica *Lamiaceae* obuhvata veliki broj ljekovitih biljnih vrsta, zbog čega je važna u farmaciji. Istraživanja *Lamiaceae* vrsta potvrđuju sedativne, spazmolitičke, antiseptičke, antikancerogene i druge biološke efekte. Navedeni efekti se najčešće povezuju sa vrstama rodova *Thymus*, *Rosmarinus*, *Mentha*, *Salvia*, *Melissa* i *Origanum*. Glavni bioaktivni spojevi uključuju terpenoide, eterična ulja, fenolne kiseline i flavonoide. Polifenolni spojevi značajno doprinose ljekovitosti, a ruzmarinska kiselina, kafeinska kiselina, hlorogenska kiselina i flavonoidi su među najvažnijim (Ziaková i Brandšteterová, 2003).

Fenolni spojevi čine grupu fitohemijskih spojeva koji nastaju kao sekundarni biljni metaboliti. Hidroksicimetne kiseline kao što su ruzmarinska, ferulična, kafeinska i kumarinska su važni prirodni antioksidansi. Fenolni spojevi su privukli opći interes zbog antioksidativnog, protuupalnog djelovanja, neuroprotektivnog, antibakterijskog, antivirusnog, antidepresivnog, antikancerogenog, antidijabetičkog, antiangiogenog i drugih djelovanja (Tzima i sar., 2018).

Sa napretkom moderne medicine i farmaceutskih istraživanja, hemijska sinteza se pojavila kao primarna metoda za proizvodnju medicinskih agenasa u industrijalizovanim zemljama. Međutim, u zemljama u razvoju u kojima značajan dio svjetske populacije ne može priuštiti lijekove, i dalje se oslanja na tradicionalne biljne lijekove. Osim toga, ljekovite biljke privukle su značajnu pažnju na polju otkrivanja lijekova kroz identifikaciju i proučavanje njihovih bioaktivnih komponenti. U tom kontekstu, biljke iz porodice *Lamiaceae* su od velikog značaja i nude potencijalne puteve za razvoj

novih terapijskih sredstava (Moshari-Nasirkandi, 2023). Uopšteno govoreći, termin fenoli i polifenoli označava grupu sekundarnih metabolita, koji nose najmanje jedan fenolni prsten u svojoj molekuli. Fenolni prsten formira hidrofobno aromatično jezgro, a hidrofilnost uslovljavaju hidroksilne grupe. Oni su obično rastvorljivi u vodi, jer se često javljaju u formi glikozida. Kao redoks aktivni spojevi, biljni fenoli mogu da djeluju i kao antioksidansi i kao prooksidansi. Antioksidativno ponašanje fenolnih jedinjenja zavisi od broja hidroksilnih supstituenata, njihovog međusobnog položaja i mjesta vezivanja na aromatičnom prstenu.

Pored ruzmarinske kiseline, *Lamiaceae* vrste mogu akumulirati visoke razine različitih fenola, kao što su fenolne kiseline, flavonoidi ili fenolni terpeni. Neki fenolni spojevi specifični su samo za *Lamiaceae*, poput karnozolne kiseline, koja sprečava oksidativno oštećenje hloroplasta i pokazuje visoka antioksidativna svojstva in vitro. Još jedan specifični fenolni spoj u *Lamiaceae* porodici je klerodendranska kiselina, koja je pronađena u *Clerodendranthus spicatus* (Trivellini i sar., 2016). Pretkliničke studije za procjenu, fitohemijskih, toksičnih i bioloških svojstava bilo kojeg biljnog lijeka su vrlo bitne prije njegove kliničke primjene. Posebno je važna kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih spojeva, te njihovo poređenje sa referentnim fenolnim spojevima (Mradu i sar., 2012). HPLC je najrasprostranjenija separaciona tehnika koja se primjenjuje u ovu svrhu (Skendi i sar., 2017).

HPLC analiza fenolnih spojeva iz biljnih vrsta *Lamiaceae* porodice

HPLC omogućava razdvajanje kompleksnih mješavina fitospojeva, na osnovu njihovih jedinstvenih hemijskih osobina, poput polifenola, koji su po svojoj prirodi hromoforni. Zahvaljujući visokoj rezoluciji, omogućava odvajanje i identifikaciju blisko povezanih fenolnih jedinjenja prisutnih u vrstama *Lamiaceae* porodice. Identifikacija specifičnih fenolnih spojeva postiže se upoređujući retencionna vremena odvojenih pikova spojeva od interesa, sa standardima. Uz kvantifikaciju svakog identifikovanog spoja, HPLC pruža informacije o fenolnom profilu biljnog uzorka. Ovi podaci su ključni za razumijevanje potencijalnih bioloških aktivnosti biljaka *Lamiaceae*, budući da bioaktivnost može ovisiti o vrsti i količini prisutnih fenolnih spojeva. Poznavajući fenolni profil, moguće je izvršiti izolaciju specifičnog fenolnog spoja, u svrhu njegovog daljnjeg ispitivanja (Tzima i sar., 2018).

HPLC igra vitalnu ulogu u kontroli kvaliteta proizvoda koji potiču od *Lamiaceae* vrsta, kao što su biljni suplementi ili eterična ulja. Uspostavljanjem specifičnih HPLC profila za određenu biljku ili njen proizvod, moguće je potvrditi autentičnost i osigurati očekivanu razinu ključnih bioaktivnih spojeva (Napoli i sar., 2022). Uz pogodnu metodu detekcije, moguće je detektovati čak i manje fenolne komponente unutar kompleksnog biljnog uzorka.

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline čine veliku grupu prirodnih organskih jedinjenja sa širokim spektrom farmakoloških aktivnosti. Utvrđeno je da posjeduju antioksidativna, antivirusna i antibakterijska svojstva. Antioksidativna aktivnost fenola se povezuje sa hidroksilnim grupama na njihovim molekulima. Zbog velike količine fenolnih kiselina, predstavnici porodice *Lamiaceae* smatraju se obećavajućim izvorom prirodnih antioksidanasa.

Dokazivanje prisustva i određivanje koncentracije fenolnih kiselina od pomoći je u boljem objašnjenju kompleksne farmakološke aktivnosti nekih ljekovitih biljaka iz porodice *Lamiaceae*.

Reverzno-fazna HPLC tehnika (eng. reversed-phase HPLC; RP-HPLC) koristi nepolarnu stacionarnu fazu, a mobilna faza je polarna. Na ovaj način postiže se bolje razdvajanje polifenola, prema njihovoj polarnosti. Ekstrakcija čvrstom fazom (eng. solid-phase extraction; SPE) i reverzno fazna- HPLC metoda zajedno su se pokazale kao rutinski i jednostavan postupak za izolaciju, kvalifikaciju i

kvantifikaciju slobodnih fenolnih kiselina u biljnom materijalu. Frakcije slobodnih fenolnih kiselina izolovane iz biljnih dijelova pomoću SPE, podvrgnute su analizi reverzno-faznom HPLC metodom. Pomoću UV-Vis detektora, u ispitivanim biljkama identificirane su: ruzmarinska, protokatehinska, *p*-hidroksibenzojeva, gentizinska, hlorogenska, siringinska, kafe, vanilinska, *p*-kumarinska i ferulična kiselina, u različitim kvantitativnim omjerima. Istraživanje, koje su sproveli Zgórka i Głowniak iz 2021. godine je potvrdilo moguću ulogu ruzmarinske kiseline kao hemotaksonomskog markera porodice *Lamiaceae*, koja je jedan od najčešćih estera kafeinske kiseline u ovoj porodici (Zgórka i Głowniak, 2001). Ruzmarinska kiselina ostvaruje adstringentno, antioksidativno, protuupalno, antimutageno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje.

Prilikom HPLC profiliranja fenolnih kiselina i flavonoida u otpadnim vodama, nastalih hidrodestilacijom aromatskih biljaka iz porodice *Lamiaceae* (*Rosmarinus officinalis* L., *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L., *Salvia officinalis* L. i *Thymus vulgaris* L.), najveće količine **aktivnih spojeva su pronađene u uzorku žalfije (*Salvia officinalis* L.) i majčine dušice (*Thymus vulgaris* L.)**. Analiza polifenola izvršena je na instrumentu opremljenom detektorom fotodiodnog niza- DAD. HPLC se može povezati sa tehnikom elektrosprej jonizacije (ESI). Da bi se identifikovali hromatografski signali i/ili potvrdili pikovi, izvršena je serija HPLC/ESI-MS analiza. HPLC/ESI-MS je moćna tehnika sposobna da analizira male i velike molekule različitih polariteta u složenom biološkom uzorku. Napoli i sar. su na ovaj način sproveli detaljnu HPLC analizu polifenolnih spojeva u otpadnim vodama nakon hidrodestilacije odabranih aromatskih biljaka, pri čemu je utvrđeno prisustvo 8-12% organskih kiselina, od čega 5-7% ruzmarinske kiseline i do 20% dihidroksifeniloctene kiseline, koja se može smatrati njenim degradacionim produktom (Napoli i sar., 2022).

Flavonoidi

Flavonoidi su sekundarni metaboliti, koji imaju razne biološke i farmakološke efekte, zbog čega su od značaja u prevenciji, zaštiti i liječenju različitih patoloških stanja u organizmu. Različite klase i strukture flavonoidnih komponenti uključujući flavanone, flavone, flavonole i flavanole su prethodno identificirane u ekstraktima različitih *Lamiaceae* vrsta (Dehkordi i sar., 2020; Sammani i sar., 2021). Određivanje pojedinačnih flavonoidnih glikozida iz mješavine fenolnih spojeva ponekad je kompleksno, te je prilično teško razjasniti njihovu strukturu i procijeniti antioksidativne i ostale biološke efekte (Proestos i sar., 2005). Flavonoidi se uglavnom određuju spektroskopskim ili hromatografskim metodama. Spektroskopske metode su korištene za jednostavnu, brzu i neselektivnu procjenu ukupnih flavonoida, dok su osjetljivije, hromatografske metode, selektivno korištene za određivanje pojedinačnih flavonoida. HPLC je, u pogledu fleksibilnosti, dostupnosti, raznolikosti separacionih kolona i detektora, izuzetno važna tehnika za određivanje pojedinačnih flavonoida u farmaceutskim, prehrambenim, kao i biološkim uzorcima. Potpuno odvajanje prirodnih flavonoida predstavlja probleme zbog širokog raspona polariteta i tendencije da flavonoidi sličnog polariteta eluiraju u grupama. Kolone obrnutih faza su obično korištene pri HPLC analizi flavonoida. Istraživanja su pokazala da je najveći broj odvajanja urađen na kolonama RP-C18 i RP-C8, čime se izbjegava vjerovatnoća zadržavanja flavonoida unutar kolona normalnih faza (NP), što se dešava zbog visokog polariteta ovih jedinjenja. Mobilna faza obično sadrži i vodenu i organsku fazu koja sadrži metanol i/ili acetonitril, dok vodena faza uključuje kiseli modifikator kao što je glacijalna sirćetna kiselina, mravlja kiselina, fosforna ili trifluorosirćetna kiselina (Sammani i sar., 2021).

Što se tiče kvantifikacije izdvojenih flavonoida u HPLC, dva sistema detekcije koja se najviše koriste za određivanje flavonoida su UV/Vis i masena spektroskopija (MS) (Sammani i sar., 2021).

Analizom sastava, uočen je uticaj flavonoida i fenolnih kiselina na određene biološke efekte roda *Plectranthus*. Fitohemijska analiza ekstrakata pokazala je prisustvo flavonoida, potvrđeno

kvantitativnom analizom HPLC. Antioksidativni potencijal ekstrakata je korelirao sa sadržajem flavonoida. Fenolne kiseline i flavonoidi u ekstraktima svježih listova *Plectranthus amboinicus*, *P. barbatus* i *P. ornatus* određivani su pomoću HPLC i detektovani pomoću detektora diodnog niza (HPLC/DAD), korištenjem autentičnih standarda, a iz uzoraka je određeno ukupno deset spojeva, sa značajnim razlikama u koncentracijama u navedene tri vrste ovog roda. Galna, hlorogenska i kafeinska kiselina, katehin, kvercetin, rutin, kvercitrin, izokvercitrin, kamferol su korišteni kao referentni standardi. RP hromatografska analiza sprovedena je u uslovima gradijentnog eluiranja, korištenjem C18 kolone (Rodrigues i sar., 2021). HPLC omogućava profiliranje biljaka i identifikaciju glavnih hemijskih komponenti. Prema literaturi, derivati flavonoida su glavni spojevi u vrstama rodova *Marrubium* i *Ballota*. Da bi se odvojili i istražili flavonoidni sastojci, te okarakterizirali specifični derivati flavonoida i hemotaksonomski markeri za oba roda, ukupno 10 vodenih frakcija metanola je podvrgnuto HPLC-MS/MS analizi. Identifikovano je ukupno 59 hemijskih spojeva, od kojih 49 flavonoida. Detektovane su različite klase flavonoida uključujući flavone, flavonole, izoflavonoide, flavanone, flavane, bioflavonoide, arilbenzofuran flavonoid, dihidrohalkon i dva nepoznata jedinjenja (Hashemi i Kharazian, 2021).

Ograničenja HPLC metode u analizi fitospojeva

Zbog složene prirode biljnih lijekova, hromatografske metode se obično koriste za razvijanje otiska prsta ili fingerprinta, odnosno profila različitih sastojaka unutar biljnog proizvoda. Pomoću fingerprinta moguća je identifikacija biljke, kvantificiranje aktivnih sastojaka i otkrivanje nečistoća. HPLC se često koristi u ovu svrhu, zbog uspješnog odvajanja hemijskih spojeva, a pri tome obezbjeđuje kvalitativne i kvantitativne podatke. Uprkos širokoj upotrebi i značaju ove metode, u nekim slučajevima postoje i njena ograničenja. Naime, HPLC je skupa metoda za izvođenje, a kolone mogu biti osjetljive na mobilne faze s vrlo visokim ili niskim pH. Ekstrakcija i priprema biljnih uzoraka za HPLC može biti dugotrajna, a vrijeme analize može varirati ovisno o složenosti uzorka. Zbog upotrebe većih količina organskih rastvarača, neophodno je njihovo pravilno odlaganje i razmatranje uticaja na okoliš. U određenim uslovima analize biljnih uzoraka, uz korištenje gradijentnog eluiranja, može doći do izmjene bazne linije hromatograma (eng. baseline), kako se sastav mobilne faze mijenja. Ovo je uobičajeno ograničenje pri upotrebi gradijentne elucije i UV-VIS detektora u HPLC-u. Zbog toga, u nekim slučajevima može biti otežana detekcija određenih spojeva (Loescher i sar., 2014).

Nedostatak osjetljive i univerzalne tehnike detekcije pogodna je za kvalitativnu i za kvantitativnu analizu u različitim uslovima izvođenja analize jedan je od razloga zašto je razvoj općenito primjenjivih metoda za HPLC još uvijek izazovan. Rezultati istraživanja prirodnih produkata pokazuju da se više od 70% HPLC aplikacija izvodi pomoću HPLC-UV i HPLC-DAD, a HPLC-MS tehnike čine oko 20%. UV-Vis detektor se često koristi jer fenolni spojevi pokazuju intenzivnu apsorpciju u UV dijelu spektra (Proestos i sar., 2005). Međutim, iako je široko korištena, jednostavna i prilagođena velikom broju fitospojeva, HPLC-UV tehnika nije primjenjiva na spojeve bez hromofora, pokazuje manjak selektivnosti, te nekada nije kompatibilna sa sastojcima mobilne faze. HPLC-DAD je primjenjiva za prirodne produkte sa karakterističnim hromoforima, posebno polifenole, alkaloidne, hinone. Ipak, informacije o strukturi spojeva su nekada ograničene. HPLC-MS je svestrana, osjetljiva metoda i može se smatrati specifičnom i univerzalnom metodom detekcije. Međutim, kvantitativna analiza sa HPLC-MS može biti otežana kod uzoraka sa kompleksnim smjesama spojeva. U slučaju složenih matrica moguća je supresija jonizacije, što rezultuje signalima manjeg intenziteta, te odstupanjima u detektovanoj koncentraciji analita. Također, metoda nije kompatibilna sa neisparljivim puferima. Obzirom na navedena ograničenja, potrebno je razviti načine detekcije koji bi ispunili potrebe

osjetljivosti, linearnosti, brzine, robusnosti i univerzalnog odgovora, što se zahtijeva u istraživanju prirodnih sirovina i proizvoda (Wolfender, 2009).

HPLC je metoda izbora za kvalitativnu i kvantitativnu analizu polifenola. Optimizacijom stacionarne faze, rastvarača i gradijenta u hromatografskim tehnikama, postiže se bolje određivanje različitih grupa i podgrupa polifenola. Analize složenih uzoraka pomoću HPLC često zahtijevaju visoku rezoluciju i dugo vrijeme analize, što može biti ograničenje kada se analizira veliki broj uzoraka (Motilva i sar., 2013). UV, DAD i PDA detektori se najčešće koriste za odvajanje fenolnih spojeva. U tabeli 1. prikazane su prednosti i ograničenja nekih od HPLC metoda, koje se najčešće koriste pri analizi fenolnih spojeva.

Tabela 1. Prednosti i ograničenja HPLC metoda u analizi polifenola

Metoda	Prednosti metode	Ograničenja metode	
HPLC-UV	HPLC-UV je rasprostranjena, jeftina, jednostavna tehnika za korištenje, prilagođena relativno velikom broju prirodnih spojeva sa detekcijom na malim talasnim dužinama.	Nije primjenjiva na spojeve bez hromofora, nije baš selektivna, nije kompatibilna sa sastojcima mobilne faze koji pokazuju visoke granice UV zračenja.	(Wolfender, 2009; Gao i sar., 2008)
HPLC-DAD	HPLC-DAD metoda omogućava snimanje svih talasnih dužina, te praćenje različitih talasnih dužina u isto vrijeme. Pogodna je metoda za prirodne spojeve sa karakterističnim hromoforima, posebno polifenole i alkaloida.	Strukturne informacije prema UV spektrima su ograničene.	(Wolfender, 2009; Flandez i sar., 2023)
HPLC/MS-MS	HPLC/MS-MS je univerzalna metoda, široko rasprostranjena, osjetljiva, pruža informacije o fragmentima, uglavnom za glikozide i polifenole.	Odziv ovisan o spoju, nije kompatibilan sa neisparljivim puferima, skupa metoda, nedostatak MS-MS baze podataka za prirodne produkte.	(Korfmacher, 2005; Cuyckens i Claeys, 2004)
RP-HPLC	Dominantna tehnika za razdvajanje i karakterizaciju fenolnih spojeva različitih polarnosti.	RP-HPLC analiza polifenola niže molekularne mase nekada oduzima mnogo vremena i može imati lošu rezoluciju, kako se povećavaju dužina polimernog lanca i strukturna raznolikost.	(Lozano-Sánchez, 2018; Ignat i sar., 2011)

Najjednostavniji i najrasprostranjeniji detektor pri izvođenju HPLC tehnika je UV detektor, jer većina prirodnih spojeva apsorbiraju UV svjetlost u rasponu od 200-550 nm, uključujući sve tvari koje imaju jednu ili više dvostrukih veza i sve tvari koje imaju nesparene elektrone. Osim toga, ovaj način detekcije pruža osjetljivost, linearnost i pouzdanost. Problem detekcije javlja se kod prirodnih spojeva, koji ne posjeduju UV hromofore (Gao i sar., 2008).

DAD detekcija je posebno korisna za detekciju prirodnih proizvoda sa karakterističnim hromoforima. Na primjer, polifenoli se mogu efikasno identifikovati ovom metodom jer posjeduju karakteristične hromofore. Značajna je mogućnost kreiranja DAD-UV spektralnih biblioteka za ove spojeve, koje se mogu koristiti za dereplikaciju, ali se spojevi moraju analizirati pod istim HPLC uslovima, pošto sastav mobilne faze može blago uticati na UV trake. Nedostatak je što strukturne informacije prema UV spektrima mogu biti ograničene (Larsen i Hansen, 2008). HPLC-DAD analiza je primjenjiva za djelimičnu karakterizaciju fenola jer oni posjeduju karakteristične hromofore. Tehnika se također uspješno koristi u kombinaciji sa reagensima za UV pomak, koji se inače koriste za strukturnu karakterizaciju flavonoida u njihovom čistom obliku. Još jedna značajka u vezi DAD-UV detekcija je da se sve talasne dužine pohranjuju tokom analize, pa se tako više talasnih dužina može pratiti istovremeno za detekciju različitih klasa spojeva (Wolfender i sar., 2006; Bennet i sar., 2003).

HPLC-MS ubraja se u ključne tehnike za identifikaciju prirodnih proizvoda. Osim detekcije, maseni spektrometar daje mogućnost generisanja molekularnih jona nominalne mase ili preciznih mjerenja mase za određivanje empirijskih formula (Korfmacher, 2005). U hemiji prirodnih proizvoda, MS-MS spektri su korisni pri klasičnoj fragmentaciji flavonoida ili srodnih spojeva za određivanje položaja supstituenata na A ili B prstenovima (Cuyckens i Claeys, 2004). Neki od nedostataka HPLC-MS i HPLC-MS-MS metoda uključuju odziv koji je ovisan o spoju, inkompatibilnost sa neisparljivim puferima, osjetljivost na efekte supresije jona u složenim matricama i visoku cijenu.

Uvođenje kolona sa reverznom fazom značajno je poboljšalo separaciju fenolnih spojeva. Particiona RP-HPLC koristi relativno nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu, zbog čega efikasno razdvaja širok spektar polifenola različitih polarnosti (Lozano-Sánchez, 2018). RP-HPLC omogućava odvajanje i određivanje polifenola pomoću različitih sistema detekcije, kao što je DAD detektor, masena ili tandem masena spektrometrija. Međutim, pri analizi niskomolekularnih fenolnih spojeva, ove tehnike oduzimaju mnogo vremena i mogu imati lošu rezoluciju, što je posljedica prisustva dužeg polimernog lanca i strukturne raznolikosti fenola. Shodno tome, detekcija spojeva veće molekularne mase, kao i određivanje distribucije molekulskih masa, ostaju glavni izazovi u analizi polifenola (Ignat i sar., 2011).

ZAKLJUČAK

HPLC je moćna tehnika koja se široko koristi za analizu polifenola u biljnim preparatima. Ističe se u razdvajanju složenih mješavina biljnih polifenola, koji često imaju slične strukture, ali HPLC ih može razlikovati na osnovu njihove jedinstvene interakcije sa stacionarnom fazom. Upoređujući vrijeme zadržavanja odvojenih pikova sa standardima, moguće je identifikovati specifične polifenole prisutne u uzorku. Osim identifikacije, moguća je i kvantifikacija polifenola u biljnom uzorku. Proučavanjem polifenolnih profila različitih biljnih vrsta ili dijelova biljaka, osigurava se autentičnost i konzistencija proizvoda bogatih polifenolima, kao što su biljni suplementi. HPLC omogućava izolaciju i identifikaciju potencijalno bioaktivnih polifenola za dalja istraživanja. Osim brojnih prednosti ove tehnike, razumijevanje njenih ograničenja omogućava istraživačima da odaberu najprikladniju analitičku metodu i precizno interpretiraju podatke.

LITERATURA

- Bennett RN, Mellon FA, Foidl N, Pratt JH, Dupont MS, Perkins L et al (2003) Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. J Agric Food Chem 51: 3546–53.
- Boligon AA, Athayde ML (2014) Importance of HPLC in analysis of plants extracts. Austin Chromatogr 1 (3): 2.
- Cimpan G, Gocan S (2002) Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches. J LIQ CHROMATOGR R T 25 (13-15): 2225-92.
- Cuyckens F, Claeys M (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. J Mass Spectrom 39: 1–15.
- Dehkordi FJ, Kharazian N, Lorigooini Z (2020) Characterization of flavonoid components in *Scutellaria* L. species (*Lamiaceae*) using finger-printing analysis. Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica 1 (62).
- Flandez LE, Castillo-Israel KA, Rivadeneira JP, Tuaño AP, Hizon-Fradejas AB (2023) Development and Validation of an HPLC-DAD Method for the Simultaneous Analysis of Phenolic Compounds. Mal. J. Fund. Appl. Sci. 19 (5): 855-64.
- Ganzera M, Sturm S (2018) Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. J Pharm Biomed Anal 147: 211-33.
- Gao XF, Dan M, Zhao AH, Xie GX, Jia W (2008) Simultaneous determination of saponins in flower buds of *Panax notoginseng* using high performance liquid chromatography. Biomed Chromatogr 22: 244–9.
- Hashemi M, Kharazian N (2021) Identification of flavonoids from *Marrubium* and *Ballota* species (*Lamiaceae*) and determination of chemotaxonomic markers using High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometer. J.Sci.I.R.I. 32 (4): 305-20.
- Ignat I, Volf I, Popa VI (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chem 126 (4): 1821-35.
- Korfmacher WA (2005) Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. Drug Discov Today 10: 1357–67.
- Larsen TO, Hansen MAE (2008) Dereplication and discovery of natural products by UV spectroscopy. In: Colegate SM, Molyneux RJ, editors. Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination, 2nd Edition London: CRC Press 221–44.
- Loescher CM, Morton DW, Razić S, Agatonovic-Kustrin S (2014) High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*- Advantages and limitations. J Pharm Biomed Anal 98: 52-9.
- Lozano-Sánchez J, Borrás-Linares I, Sass-Kiss A, Segura-Carretero A (2018) Chromatographic technique: High-performance liquid chromatography (HPLC). Modern techniques for food authentication 459-526.

Moshari-Nasirkandi A, Alirezalu A, Alipour H, Amato J (2023) Screening of 20 species from Lamiaceae family based on phytochemical analysis, antioxidant activity and HPLC profiling. *Sci. Rep.* 13 (1): 16987.

Motilva MJ, Serra A, Macià A (2013) Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *J. Chromatogr. A* 1292: 66-82.

Mradu G, Saumyakanti S, Sohini M, Arup M (2012) HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 4 (3): 162-7.

Napoli E, Ruberto G, Carrubba A, Sarno M, Muscarà C, Speciale A, Cristani M, Cimino F, Saija A (2022) Phenolic profiles, antioxidant and anti-inflammatory activities of hydrodistillation wastewaters from five Lamiaceae species. *Molecules* 27 (21): 7427.

Proestos C, Chorianopoulos N, Nychas GJ, Komaitis M (2005) RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53 (4): 1190-5.

Rodrigues FF, Boligon AA, Menezes IR, Galvão-Rodrigues FF, Salazar GJ, Nonato CF, Braga NT, Correia FM, Caldas GF, Coutinho HD, Siyadatpanah A (2021) HPLC/DAD, antibacterial and antioxidant activities of *Plectranthus* species (Lamiaceae) combined with the chemometric calculations. *Molecules* 26 (24): 7665.

Sammani MS, Clavijo S, Cerdà V (2021) Recent, advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 138: 116220.

Skendi A, Irakli M, Chatzopoulou P (2017) Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 6: 62-9.

Steinmann D, Ganzera M (2011) Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *J Pharm Biomed Anal* 55 (4): 744-57.

Trivellini A, Lucchesini M, Maggini R, Mosadegh H, Villamarin TS, Vernieri P, Mensuali-Sodi A, Pardossi A (2016) Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Ind. Crop. Prod.* 83: 241-54.

Tzima K, Brunton NP, Rai DK (2018) Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in Lamiaceae plants—A review. *Plants* 7 (2): 25.

Wolfender JL (2009) HPLC in natural product analysis: the detection issue. *Planta medica* 75 (07): 719-34.

Wolfender JL, Queiroz EF, Hostettmann K (2006) The importance of hyphenated techniques in the discovery of new lead compounds from nature. *Exp Opin Drug Discov* 1: 237–60.

Zgórka G, Głowniak K (2001) Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J Pharm Biomed Anal* 26 (1): 79-87.

Ziaková A, Brandšteterová E (2003) Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some Lamiaceae family plants. *J LIQ CHROMATOGR R T* 26 (3): 443-53.

INDIKACIJE I SIGURNOSNI PROFIL BOTULINUM NEUROTOKSINA ZA PRIMJENU U KOZMETOLOGIJI

**Belkisa Djedović, Samir Ćurić, Amina Hasikić, Sumea Haušić, Elvira Jukić, Hedija Starčević,
Merima Ibišević, Maida Šljivić Husejnović***

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75 000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

Pregledni rad

SAŽETAK

Clostridium botulinum predstavlja bakteriju poznatu po sposobnosti produkcije botulinum neurotoksina (BoNT), koji već 35 godina nalazi svoju primjenu u medicini i farmaciji. Iako toksičan čak i u jako maloj dozi (letalna doza za čovjeka iznosi 0,1 – 1 ng/kg tjelesne mase), primijenjen na pravi način može biti korišten za veliki broj indikacija pri čemu se danas posebno izdvaja primjena u dermatologiji. Mehanizam djelovanja se zasniva na inhibiciji oslobađanja neurotransmitera acetilholina na nivou neuromuskularne spojnice, čime izostaje kontrakcija mišićnih vlakana te nastupa mišićna paraliza.

Ovaj rad obuhvata relevantne podatke o mehanizmu djelovanja, farmakokinetičkom profilu, indikacijama za primjenu, kontraindikacijama i neželjenim dejstvima botulinum toksina primijenjenog u estetske svrhe, sa posebnim osvrtom na formulacije koje se najčešće koriste te opasnostima po zdravlje koje se mogu javiti usljed neadekvatnog injiciranja i doziranja.

Ključne riječi: BoNT, estetski zahvati, zdravstveni rizici i benefiti

Autor za korespodenciju: dr sc. Maida Šljivić Husejnović, docent
E-mail: maida.sljivic-husejnovic@untz.ba

INDICATIONS AND SAFETY PROFILE OF BOTULINUM NEUROTOXIN FOR USE IN COSMETOLOGY

Belkisa Djedović, Samir Ćurić, Amina Hasikić, Sumea Haušić, Elvira Jukić, Hedija Starčević, Merima Ibišević, Maida Šljivić Husejnović*

Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića 8, 75 000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

Review paper

SUMMARY

Clostridium botulinum is a bacterium known for its ability to produce botulinum neurotoxin (BoNT), which has been used in medicine and pharmacy for 35 years. Although toxic even in a very small dose (the lethal dose for humans is 0.1-1 ng/kg of body weight), when applied in the right way it can be used for a large number of indications, with the use in dermatology being particularly prominent today. The mechanism of action is based on the inhibition of the acetylcholine release in the neuromuscular junction, which prevents the contraction of muscle fibers and results in muscle paralysis.

This paper includes relevant data on the mechanism of action, pharmacokinetic profile, indications for use, contraindications and side effects of botulinum toxin used for aesthetic purposes, with special reference to the most commonly used formulations and health hazards that may occur due to inadequate initiation and dosing.

Key words: *BoNT, aesthetic procedures, health risks and benefits*

Corresponding author: Maida Šljivić Husejnović PhD, Assistant Prof.
E-mail: maida.sljivic-husejnovic@untz.ba

UVOD

Botulinum toksin (BoNT), porijeklom iz bakterije *Clostridium botulinum*, predstavlja egzogeni neurotoksin koji može izazvati paralitičko oboljenje poznato pod nazivom botulizam. Nazivamo ga i „čudotvornim otrovom“, te je jedna od najotrovnijih poznatih bioloških supstanci. Prvi put je odobren za primjenu u medicinske svrhe 1989. godine od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (eng. United States Food and Drug Administration, US FDA), prvenstveno za liječenje strabizma, blefarospazma i hemifacijalnog spazma, a od 2002. godine nalazi svoju primjenu u poboljšanju izgleda glabelarnih linija i lateralnih kantalnih bora. U posljednjih 20 godina primjena botulinum neurotoksina primarno dominira u području estetske medicine (Kedlaya, 2024).

Iako postoji 7 serotipova botulinum toksina (A, B, C, D, E, F i G), u kliničkoj praksi se isključivo primjenjuju serotip A i B. Ovakva klasifikacija je izvršena na temelju antigenosti, pri čemu anti-serum generiran protiv jednog serotipa toksina ne može prepoznati i neutralizirati drugi serotip (Whitcup i Hallett, 2021; Eleopra i sar. 2004).

Sekvenciranje gena toksina također je otkrilo sve veći broj podtipova toksina sa značajnim varijacijama sekvenci proteina u odnosu na poznate sekvence toksina. Ove varijacije mogu značajno smanjiti učinkovitost standardnih anti-seruma. Npr. postoji osam podtipova serotipa A (A1-8), pri čemu je jedino podtip A1 odobren za upotrebu na ljudima, od strane FDA. Serotipovi i podtipovi ne razlikuju se samo strukturno, već su očite i značajne razlike u njihovim toksikofarmakološkim svojstvima (Choudhury i sar. 2021).

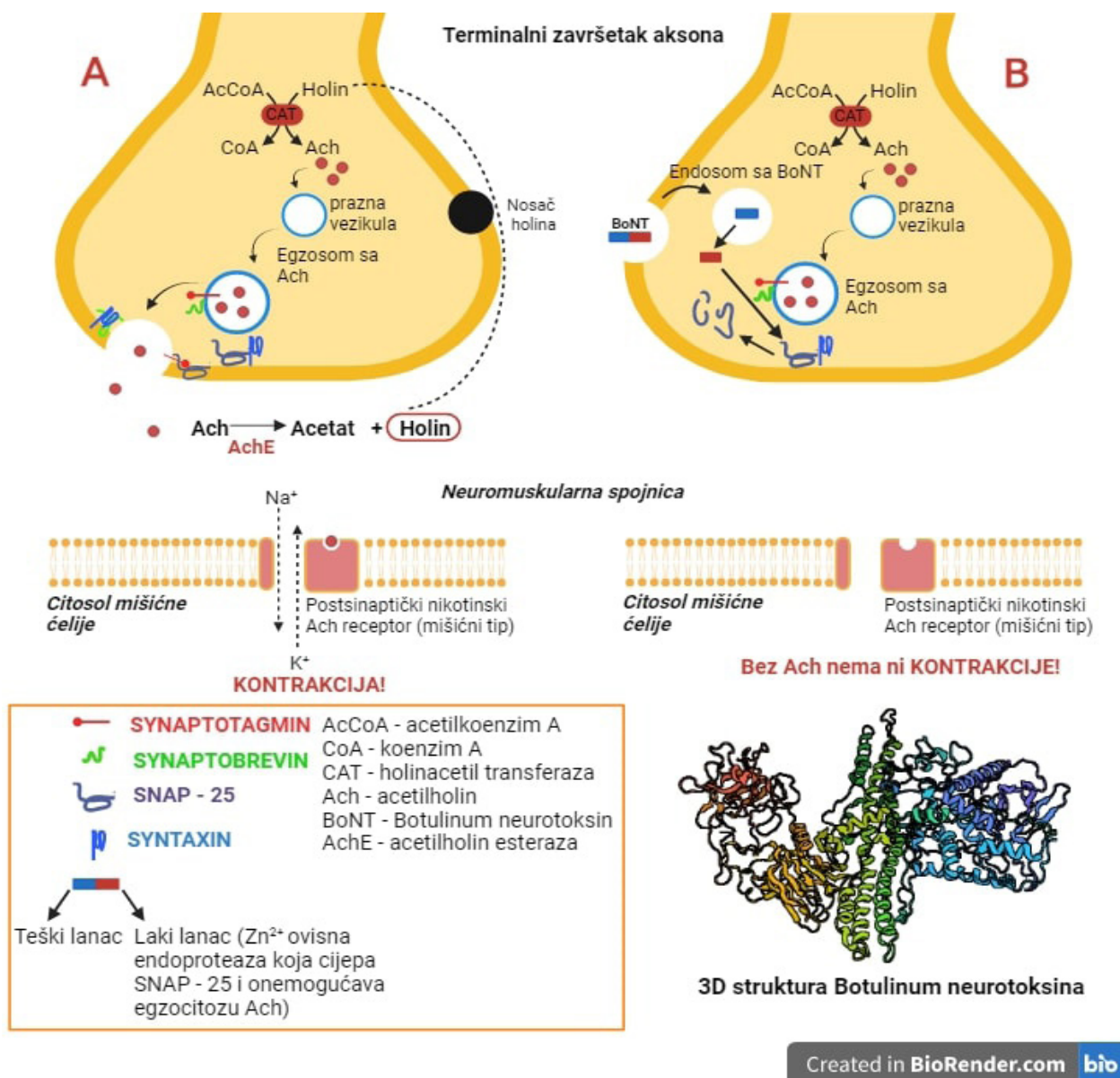
Strukturalno razumijevanje varijacija botulinum toksina doprinosi proširenju njihove kliničke primjene i terapijske efikasnosti (Whitcup i Hallett, 2021).

MEHANIZAM DJELOVANJA BoNT

Poznavanje osnova molekularne strukture botulinum toksina je neophodno za razumijevanje njegove farmakokinetike i mehanizma djelovanja. Botulinum neurotoksin se sintetizira kao kompleks od 900kDa, pri čemu najveći dio čine fiziološki neaktivni hemaglutinini i drugi proteini, za koje se smatra da štite biološki aktivan dio od proteolize i denaturacije prilikom prolaska kroz probavni sistem ili u ekstracelularnoj tečnosti. Biološki aktivan dio botulinum toksina čini jednolančani protein prosječne molekulske mase ~150kDa, građen od 1296 aminokiselinskih ostataka. Usljed proteolize indukovane niskim pH on se cijepa na laki (L – lanac, 50 kDa) i teški lanac (H – lanac, 100kDa) koji su međusobno povezani disulfidnom vezom. Teški lanac se sastoji od tri subdomene: terminalne translokacijske domene (TD) koja je zaslužna za translokaciju L lanca iz endosoma u citosol neurona te C – i N – terminalne receptor-vezujuće domene. S druge strane laki lanac je Zn²⁺ ovisna endoproteaza koja cijepa SNARE (eng. soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) protein koji ima važnu ulogu u egzocitozi acetilholina u neuromuskularnu spojnicu. Formiranjem kompleksa između različitih podtipova ovih proteina omogućeno je spajanje ćelijske membrane sa membranom endosoma, a samim time i Ca²⁺ ovisna egzocitoza. Botulinum toksin tipa A cijepa SNAP – 25 (eng. synaptosome-associated protein of 25 kDa) kao važan SNARE protein i na taj način inhibira oslobađanje neurotransmitera (Lam i Jin, 2015).

Botulinum toksin dovodi do inhibicije oslobađanja acetilholina (ACh) kroz višestepeni proces:

- Prvenstveno se vezuje svojim teškim lancem za receptore (polisialogangliozide i glikoproteine sinaptičkih vezikula) asocirane na membrani presinaptičkog neurona tokom oslobađanja neurotransmitera. Usljed procesa recikliranja sinaptičkih vezikula BoNT se putem endocitoze unosi u presinaptički neuron.
- S obzirom na sniženje pH u endosomu, dolazi do strukturnih promjena koje omogućavaju da se preko N – domene teškog lanca izvrši translokacija lakog lanca u citosol, a zatim redukuje disulfidna veza koja je uvjet za stabilnost.
- Oslobođeni laki lanac BoNT hidrolizira 197-Gln-|-Arg-198 vezu SNAP – 25 proteina kao jednog od odgovornih proteina za proces Ca²⁺ ovisne egzocitoze neurotransmitera (slika 1) (Lam i Jin, 2015).



Slika 1. Mehanizam djelovanja BoNT: A) normalna holinergička transmisija na nivou neuromuskularne spojnice; B) inhibirana holinergička transmisija usljed djelovanja BoNT, čiji laki lanac kao endoproteaza cijepa SNAP – 25 protein neophodan za egzocitozu acetilholina (Ach).

TOKSIKOKINETIKA I FARMAKOKINETIKA BOTULINUM NEUROTOKSINA

Uprkos velikom toksikološkom i farmakološkom interesu, farmakokinetički i toksikokinetički profil botulinum neurotoksina još uvijek nije dovoljno objašnjen, odnosno biodistribucija je ispitana samo za supraterapijske doze toksina koje nemaju terapijsku primjenu. Progutan ili inhaliran kompleks botulinum neurotoksina dolazi u lumen probavnih organa ili plućnih alveola gdje aktivni dio toksina mehanizmom transcitoze dolazi u krv, nakon čega slijedi sistemska distribucija. Ispitivanja su pokazala da je molekula toksina izuzetno otporna na razgradnju u krvi, pri čemu se kod eksperimentalnih

miševa može detektirati i nekoliko sati nakon i.v. primjene, a kod ljudi čak i do 10 dana nakon oralnog trovanja. O daljoj sudbini botulinum neurotoksina zna se jako malo. Smatra se da se metabolizira u jetri jer je jetra mjesto njegove akumulacije u organizmu, međutim još uvijek nemamo podatke koji to podupiru. Sistemskom distribucijom ili direktnim intramuskularnim iniciranjem, botulinum toksin dolazi do neuromuskularne spojnice gdje ispoljava svoje djelovanje. Prilikom intramuskularnog iniciranja, primijećena je distribucija izvan mjesta iniciranja, što rezultira pojavom lokalnih neželjenih efekata u vidu prolazne paralize susjednih mišića. Cirkulišući neurotoksin ne prolazi hematoencefalnu barijeru, međutim dio botulinum toksina se retrogradno transportira putem perifernih nerava do CNS – a (Ravichandran i sar. 2006).

Farmakokinetički parametri koji uvjetuju visoku toksičnost botulinum toksina obuhvataju: sposobnost apsorpcije kroz epitelne slojeve nakon ingestije i inhalacije i ulazak u krvotok, te relativno dugo poluvrijeme eliminacije u sistemskoj cirkulaciji što omogućava distribuciju do ciljanog mjesta djelovanja (Radoš - Filipović, 2019).

TERAPIJSKE INDIKACIJE

Uprkos njihovoj izrazitoj toksičnosti, BoNT se često koriste za brojne indikacije uključujući strabizam, distoniju, zarastanje rana, liječenje poremećaja CNS-a poput migrene, cerebralne paralize i moždanog udara (Gutting i sar. 2023). Međutim, to nisu jedine terapijske indikacije BoNT-a. Brojne su okončane kliničke studije sa rezultatima istraživanja koja podupiru hipotezu da je interes naučne javnosti prema terapijskim mogućnostima BoNT-a ogroman. Pretragom baza kliničkih ispitivanja (clinicaltrials.gov) koristeći termin „botulinum toxin“ sredinom marta 2024. godine identificirano je više od 300 završenih i više od 150 aktivnih, regrutirajućih ili regrutiranih studija.

Ipak, najpoznatija primjena BoNT-A je u kozmetičke svrhe, koja i dalje bilježi trend rasta upotrebe. Naprimjer, u Sjedinjenim Američkim Državama, najučestaliji minimalno invazivni estetski zahvati su upravo tretmani BoNT-A (Dover i sar. 2018).

Tada se botulinum toksin prevashodno primjenjuje za poboljšanje izgleda:

- vertikalnih bora između obrva vidljivih pri najjačem mrštenju i/ili,
- lepezastih bora koje se šire s ugla očiju, vidljivih pri najjačem smijehu i/ili,
- čeonih bora vidljivih pri najjačem podizanju obrva.

Pozitivni efekti su vidljivi 2 do 3 dana nakon injekcije, a mogu se održati 12 do 24 sedmice, tako da je tretman potrebno ponoviti otprilike nakon pola godine.

Ostala polja primjene unutar dermatologije obuhvataju nekoliko stanja praćenih promjenom fizioloških funkcija. FDA je odobrila primjenu BoNT u tretmanu liječenja hiperhidroze, kao stanja kože u kojima dolazi do prekomjernog rada žlijezda znojnice na dlanovima, tabanima i u aksilarnom području. U cilju liječenja BoNT se aplicira intradermalno kako bi se inhibirala neurotransmisija na nivou nerava koji dolaze u kontakt sa samim žljezdanim ćelijama.

Upotreba BoNT u liječenju hipertrofičnih ožiljaka sprovodi se u cilju smanjenja kontrakcije mišića u području ožiljka i smanjenja infekcije. Pored ovog mehanizma dolazi i do inhibicije transformirajućeg faktora rasta beta (TGF – β) koji je uključen u mehanizam formiranja ožiljka. Upotreba se našla i u liječenju stanja u kojima se javlja vazospazam praćen ulceracijama sa pojavom bola, kao što je

Raynaudov sindrom. Može naći primjenu i u liječenju prekomjernog crvenila lica, seboroične kože i psorijaze (Guida i sar. 2018).

Botulinum neurotoksin sve čeće nalazi primjenu izvan kozmetologije i estetske medicine, uključujući čestu upotrebu u liječenju strabizma, blefarospazma, hemifacijalnog spazma, cervikalne distonije, liječenje mišićnog spazma gornjih i donjih ekstremiteta, cerebralne paralize i kod odraslih nakon moždanog udara. Ako se mehanizam djelovanja lijeka zasniva na autonomnim sinapsama onda je indiciran za primjenu kod primarne aksilarne hiperhidroze, urinarne inkontinencije s prekomjernom neurogenom aktivnošću *m.detursora*, pretjerano aktivnog mokraćnog mjehura, te sijalorije. Ukoliko djeluje na senzorne sinapse, može se koristiti kao profilaksa migrenoznih napada (Radoš – Filipović, 2019).

KONTRAINDIKACIJE

Botulinum toxin se ne preporučuje trudnicama, majkama koje aktivno doje ili osobama koje boluju od neuromišićnih stanja. Prema FDA klasifikaciji lijekova za primjenu u trudnoći spada u kategoriju C, jer nije čvrsto utvrđeno da li može uzrokovati oštećenje fetusa niti da li se izlučuje u majčinom mlijeku. Pacijenti sa neuromuskularnim oboljenjima kao što su miastenija gravis, Eaton-Lambertov sindrom nisu prikladni kandidati za upotrebu botulinum toksina. Ne preporučuje se istovremena upotreba botulinum toksina i aminoglikozidnih antibiotika, spektinomocina, varfarina, kinidina ili drugih lijekova koji ometaju neuromuskularni prijenos (Klein, 2004).

FARMACEUTSKI OBLICI DOSTUPNI NA TRŽIŠTU

Botulinum toksin kao aktivna komponenta je prisutan u dva farmaceutska oblika: prašak za otopinu za injekciju i injekcioni rastvor. U cilju poboljšanja izgleda lepezastih, vertikalnih i čeonih bora odobrena su tri oblika BoNT: onabotulinumtoksin A, abobotulinumtoksin A i incobotulinumtoksin A, koja se na tržištu nalaze u obliku praška za otopinu za injekcije. Rinabotulinumtoksin B predstavlja injekcioni rastvor, te se prevashodno koristi u liječenju cervikalne distonije.

U svim navedenim formulacijama korišten je humani serumski albumin (HSA) koji je potreban za stabilizaciju botulinum toksina, te kako bi se spriječilo prijanjanje na unutrašnjost bočice (viale) ili šprice. Druge pomoćne supstance dodaju se sa ciljem smanjenja rizika od inaktivacije toksina tokom proizvodnog procesa i dugotrajnog skladištenja (Walker i Dayan, 2014).

Formulacije koje su u obliku praška prije upotrebe se razrijeđuju dodatkom sterilne 0,9% otopine natrijum hlorida. Razrijeđivanje praška u fiziološkoj otopini zahtijeva oprez. Nakon razrijeđivanja smije se upotrijebiti samo bistra, bezbojna do žućkasta otopina bez čestica (Walker i Dayan, 2014). S obzirom na mogućnost greške prilikom razrijeđivanja praška, kao i potencijalne kontaminacije jer se kao stabilizator koristi albumin, javila se potreba za razvojem novih formulacija upotrebom stabilizatora koji nisu animalnog porijekla. Npr. liposomalna enkapsulacija BoNT-A za transurotelnu primjenu kod pretjerano aktivnog mokraćnog mjehura ili razvoj gela s BoNT-A za intranazalnu primjenu u terapiji alergijskog rinitisa (Radoš - Filipović, 2019).

**Tabela 1. Usporedba formulacija botulinum toksina
(Walker i Dayan, 2014; Radoš - Filipović, 2019)**

	Onabotulinumtoksin A	Abobotulinumtoksin A	Incobotulinumtoksin A	Rinabotulinumtoksin B
Komercijalni naziv	Botox®, Vistabel ®	Dysport®, Azzalure®	Xeomin®, Boccouture®	Myobloc®, NeuroBloc®
Proizodač	Allergan (SAD)	Ipsen Pharmaceuticals (Francuska)	Merz Pharmaceuticals (Njemačka)	US WorldMeds (SAD)
Vrsta	A1	A1	A1	B1
Države	Širom svijeta, SAD i Kanada	>65 zemalja, SAD i Kanada	SAD, Njemačka i ostale evropske zemlje, Brazil	SAD, samo u nekim evropskim državama
Aktivna supstanca (težina)	BoNT-A kompleks (900 kD)	BoNT-A kompleks (500-900 kD)	BoNT-A kompleks (150 kD)	BoNT-B kompleks (700 kD)
Farmaceutski oblik	Vakuum sušeni prašak za rekonstituciju	Liofiliziran prašak za rekonstituciju	Liofiliziran prašak za rekonstituciju	Injekcioni rastvor spreman za upotrebu
Rok trajanja	2-8 °C 36 mjeseci	2-8 °C 24 mjeseca	Sobna temperatura 36 mjeseci	2-8 °C 24 mjeseca
Jedinica (i.j.)/ viala	100 i.j. ili 200 i.j. Botox 50 i.j. Vistabel	300 i.j. ili 500 i.j. Dysport 125 i.j. Azzalure	50, 100 ili 200 i.j. Xeomin 50 i.j. Boccouture	2500 i.j. /0,5mL 5000 i.j./1mL 10.000 i.j./2mL
Količina proteina/viala	5 ng/100 i.j.	4,87 ng/100 i.j.	0,44 ng/100 i.j.	55 ng/2500 i.j.
pH	7,4	7,4	7,4	5,6
Volumen	1,25 ili 2,5 ml, 10 ml maksimalno	2,5 ml ili 5ml maksimalno	8ml	0,5ml; 1ml; 2ml
Razrjeđivanje	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	Nije potrebno
Pomoćne supstance	HSA i NaCl	HSA i laktoza	HSA i saharoza	HSA, NaCl, dinatrijum sukcinat i voda
Čuvanje nakon razrjeđivanja	24h/2-8 °C	4h/2-8 °C	24h/2-8 °C	4h/2-8 °C
Klinička aktivnost u odnosu na Botox	1	1:2-1:3	1:1	1:40-1:50

Sve četiri formulacije se međusobno razlikuju prema količini biološki aktivnog dijela molekule i prema biološkoj potentnosti. Biološka potentnost se bazira na određivanju LD₅₀ (srednja letalna doza), pri čemu je 1 jedinica toksina definisana kao LD₅₀ za miša tj. ona doza toksina koja nakon intraperitonealne primjene dovodi do smrti kod 50% eksperimentalnih životinja. Svaki proizvođač određuje svoj postupak za određivanje LD₅₀ vrijednosti, te razvija vlastitu ćelijsku liniju i protokol za određivanje potentnosti. Tako je koristeći ELISA (eng., enzyme-linked immunoadsorbent assay) metodu pokazano da 1 internacionalna jedinica za incobotulinumtoksin A (Xeomin) odgovara 0,44 ng, za onabotulinumtoksin A (Botoks, Vistabel) 0,73 ng, a za abobotulinumtoksin A (Dysport, Azzalure) 0,65 ng toksina. Najveću biološku potentnost (i.j.) po masi proteina daje incobotulinumtoksin A (227

i.j./ng), u usporedbi sa 137 i.j./ng za onabotulinumtoksin A i 154 i.j./ng za abobotulinumtoksin A (Radoš - Filipović, 2019).

SIGURNOSNI PROFIL BoNT

Pojava botulizma nakon intramuskularne primjene botulinum neurotoksina u estetske svrhe je rijetka, ali moguća. Javlja se najčešće usljed primjene prevelike doze, greške prilikom injiciranja, te primjene neregistrovanih proizvoda BoNT. Klinički simptomi botulizma mogu se javiti 1 – 36 dana nakon tretmana, a najčešće 2 – 6 dana nakon estetskog zahvata. Nuspojave povezane s primjenom su lokalizirana bol, upala, parestezija, hipostezijska, osjetljivost, oticanje, edem, eritem, svrbež, lokalizirana infekcija, hematoma, krvarenje i/ili nastanak modrice koji mogu biti povezani s injiciranjem. Bol i/ili anksioznost povezani s primjenom igle mogu rezultirati vazovagalnim odgovorima uključujući prolaznu simptomatsku hipotenziju, mučninu, tinitus i sinkopu (Lovreković, 2015).

Ozbiljne nuspojave poput urtikarije, dispneje i oticanja mekog tkiva se rijetko javljaju, međutim ako se pojave potrebno je odmah započeti liječenje. Može se također pojaviti periokularni edem koji traje nekoliko dana nakon periokularne injekcije. Ova se reakcija može pripisati zastoju limfe, što dovodi do zadržavanja limfne tekućine u susjednim područjima. Difuzija toksina u pridružene mišiće i žlijezde, može rezultirati neželjenim efektima koji obično traju od 2 do 12 sedmica. Tako zbog slabljenja frontalnog mišića može nastati privremena ptoza obrva. Ptoza obrva nastaje zbog slabljenja mišića podizača, kao posljedica difuzije toksina u septum orbite. U području gornjeg lica mogu nastati i diplopija, ektropij, entropij, epifora ili kseroftalmija. Komplikacije tretmana u donjem djelu lica najčešće se očituju kao otežana facijalna ekspresija i najčešće nastaju kao posljedica prevelike doze toksina ili zbog pogrešnog mjesta aplikacije. Mlohavi obrazi, asimetrični osmijeh i nemogućnost zviždanja neke su od tih komplikacija, a nastaju kada je mjesto injiciranja preblizu ustima pa dolazi do zahvaćanja orbikularnog mišića. Neželjeni efekti nestaju eliminacijom toksina iz tkiva (Lovreković, 2015).

Lokalizirana slabost mišića je očekivani farmakološki efekat botulinum toksina tipa A. Vrlo rijetko su prijavljene nuspojave vezane uz širenje toksina udaljeno od mjesta primjene, što rezultira paralizom zahvaćenih mišića (Radoš - Filipović, 2019; Gutting i sar. 2023).

Ozbiljne nuspojave koje uključuju i nuspojave sa smrtnim ishodom su prijavljene kod pacijenata kojima je injiciran botulinum toksin tip A u pljuvačnu žlijezdu, u oro-lingvalno-faringealnu regiju, ezofagus ili trbuh. Neki su pacijenti imali u anamnezi disfagiju ili značajnu slabost (Lovreković, 2015).

U liječenju botulizma koriste se različite formulacije botulinum antitoksina, koje se međusobno razlikuju prema serotipovima BoNT na koje djeluju. Na tržištu je dostupan monovalentni (A), trivalentni (A, B, E) i heptavalentni (A, B, C, D, E, F, G) botulinum antitoksin, pri čemu heptavalentni pokazuje efikasnost kod svih oblika botulizma. Ovi antitoksini su ključni u liječenju, posebno u teškim slučajevima kada postoji rizik od ozbiljnih komplikacija. Međutim važno je naglasiti da su efikasni samo kada se primijene u ranoj fazi bolesti, odnosno prije nego što dođe do očite paralize mišića (Sobel, 2005).

U svom sistemskom pregledu i meta analizi iz 2004. godine Nauman i Janković su identificirali 36 randomiziranih kontrolnih studija BoNT-A u periodu od 1966-2003. godine. Studijama je obuhvaćeno 2309 ispitanika, od kojih je 1425 imalo estetski zahvat korištenjem BoNT-A. Nijedna studija nije prijavila bilo kakve ozbiljne nuspojave. Meta-analiza bilo kojih blagih do umjerenih nuspojave je pokazala stopu od otprilike 25% u grupi liječenoj BoNT-A (353/1425 pacijenata) u poređenju sa 15% u kontrolnoj grupi (133/884 pacijenata, $p < 0,001$). Fokalna slabost bila je jedini neželjeni događaj koji se

javlja značajno češće pri tretmanu BoNT-A nego u kontroli. Ovom meta-analizom Nauman i Janković su potvrdili iskustva iz dugoročnih, otvorenih istraživanja da formulacija BoNT-A koja ima povoljan sigurnosni profil i podnošljivost u širokom spektru terapijskih upotreba (Nauman i Janković, 2004).

Cavallini i sar. (2014) sistemski pregled randomiziranih ili otvorenih kliničkih studija tokom dvanaestogodišnjeg perioda od 2000-2012. godine u kojima se procjenjivao sigurnosni profil BoNT. Ukupno je odabrano 35 studija, sa 8787 uključenih ispitanika koji su primili tretman onabotulinumtoksinom A (60%) abobotulinumtoksinom A (37,1%) i incobotulinumtoksinom A (2,8%). Među najčešće tretiranim područjima bilo je područje između obrva (51,4), gornji (25,7%) i donji dio lica (11,4%) i područje oko očiju (11,4%). Neželjeni efekti povezani sa tretmanom uključivali su reverzibilne spontane promjene u vidu asimetrije usana i donjeg dijela lica, kao najučestaliji nus efekat, preko ptoze obrva, očnog senzornog poremećaja do blefaroptoze. Prema tome, zaključeno je da je sigurnosni profil BoNT-A u kozmetičkim nehirurškim intervencijama nakon kratkotrajne izloženosti zadovoljavajući.

Ramirez-Castaneda i Janković su sproveli jednu od najdužih studija BoNT tretmana u kojoj su pratili efikasnost i sigurnost BoNT u tretmanu distonije. Studija je uključila 89 pacijenata sa dijagnozom distonije koji su koristili farmakoterapijske prednosti BoNT tokom 20-tak godina. Najčešći prijavljeni neželjeni efekat je bio lokalni efekat na mjestu injektovanja toksina. U ovoj longitudinalnoj retrospektivnoj studiji, Ramirez-Castaneda i Janković, pokazali su da je, uprkos kontinuiranoj i/ili ponovljenoj ekspoziciji toksinu tokom posmatranog vremena, odnos koristi i rizika dugotrajne upotrebe BoNT pozitivan, sa povremenim štetnim, ali podnošljivim nuspojavama (Ramirez-Castaneda i Janković, 2014).

ZAKLJUČAK

Iako botulinum toksin predstavlja jako otrovnu supstancu, našao je veliku primjenu u medicini i farmaciji, a posljednjih nekoliko godina i sve veću primjenu u estetske svrhe. Primijenjen u pravilnoj dozi dokazano je efikasan i siguran za veliki broj indikacija. Budućnošću primjene botulinum toksina se smatra sinteza analoga onabotulinumtoksina A i incobotulinumtoksina A koji će pružiti preciznije i dugotrajnije rezultate, uz smanjenje neželjenih efekata i brži oporavak. Shodno tome za očekivati je da će se nastaviti dalja istraživanja i razvoj novih formulacija, s ciljem prilagođavanja tretmana i proširenja indikacijskog područja.

LITERATURA

1. Cavallini, M., Cirillo, P., Fundarò, S. P., Quartucci, S., Sciuto, C., Sito, G., Tonini, D., Trocchi, G., Signorini, M. (2014). Safety of botulinum toxin A in aesthetic treatments: a systematic review of clinical studies. *Dermatologic Surgery*, 40(5), 525-536.
2. Choudhury, S., Baker, M. R., Chatterjee, S., Kumar, H. (2021). Botulinum toxin: An update on Pharmacology and Newer Products in Development. *Toxins*, 13(1), 58.
3. Dover, J. S., Monheit, G., Greener, M., Pickett, A. (2018). Botulinum toxin in aesthetic medicine: myths and realities. *Dermatologic surgery*, 44(2), 249-260.
4. Eleopra, R., Tugnoli, V., Quatrone, R., Rossetto, O., Montecucco, C. (2004). Different types of botulinum toxin in humans. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 19(S8), S53-S59. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15027055/>

5. Fonfria E, M. J. (2018). The Expanding Therapeutic Utility of Botulinum Neurotoxins. *Toxins*, 10(5):208. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983264/>
6. Guida, S., Farnetani, F., Nisticò, S. P., Mariarosaria, C. G., Babino, G., Pellacani, G., & Fulgione, E. (2018). New trends in botulinum toxin use in dermatology. *Dermatology practical & conceptual*, 8(4), 277.
7. Gutting, B., Gillard, J., Intano, G. (2023). Physiologically-based toxicokinetic model of botulinum neurotoxin biodistribution in mice and rats. *Computational Toxicology*, 27, 100278. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7828686/>
8. Kedlaya, D. (2024). Botulinum toxin. *Medscape*. <https://emedicine.medscape.com/article/325451-overview?form=fpf>
9. Klein, A. W. (2004). Contraindications and complications with the use of botulinum toxin. *Clinics in dermatology*, 22(1), 66-75. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15158548/>
10. Lam, K.-H., Jin, R. (2015). Architecture of the botulinum neurotoxin complex: a molecular machine for protection and delivery. *Current Opinion in Structural Biology*, 31, 89 - 95. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4476938/>
11. Lovreković, A. (2015). *Suvremeni pristup liječenju starenja kože*. Zagreb: Dr Med - digitalni repozitorij Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:411059>
12. Naumann, M., Jankovic, J. (2004). Safety of botulinum toxin type A: a systematic review and meta-analysis. *Current medical research and opinion*, 20(7), 981-990.
13. Radoš - Filipović, M. (2019). *Botulinum toksin tip A - farmakološka svojstva i terapijska primjena*. Zagreb: Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:107433>
14. Ravichandran, E., Gong, Y., Saleem, F. H., Ancharski, D. M., Joshi, S. G., Simpson, L. L. (2006). An Initial Assessment of the Systemic Pharmacokinetics of Botulinum Toxin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1343 - 1351. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16782822/>
15. Ramirez-Castaneda, J., Jankovic, J. (2014). Long-term efficacy, safety, and side effect profile of botulinum toxin in dystonia: a 20-year follow-up. *Toxicon*, 90, 344-348.
16. Sobel, J. (2005). Botulisam. *Clinical Infectious Diseases*, 41(8) 1167 - 1173. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16163636/>
17. Walker, T. J., & Dayan, S. H. (2014). Comparison and Overview of Currently Available Neurotoxins. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935649/>
18. Whitcup, S. M., Hallett, M. (2021). *Botulin toxin therapy*. Springer Cham, Switzerland

SAVREMENI PRISTUPI U FARMAKOTERAPIJI PRETILOSTI: IZAZOVI, RIZICI I PERSPEKTIVE

**Faruk Kajtazović, Laura Divković, Emina Ahmetović, Ajla Džafić, Maida Beganović,
Merima Ibišević, Maida Šljivić Husejnović**

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

Pregledni rad

SAŽETAK

Pretilost je kompleksno zdravstveno stanje karakterizirano viškom tjelesne masti, praćeno povećanim rizikom od dijabetesa tipa 2, masne jetre, hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i raka, uzrokujući pad kvalitete života i očekivanog životnog vijeka. Terapija pretilosti obuhvata različite strategije i pristupe usmjerene na smanjenje tjelesne težine i poboljšanje zdravlja pretilih osoba, uključujući dijetetske intervencije, promjene životnog stila, povećanje fizičke aktivnosti, farmakoterapiju i hirurško liječenje. U eri ubrzanog načina života, sve je češće da osobe s pretilošću posežu za farmakološkim tretmanima kako bi kontrolirale svoju težinu. Međutim, razvoj efikasnih i dostupnih lijekova ne prati višegodišnji porast incidencije pretilosti. S obzirom na visoku stopu neuspjeha, visoku cijenu i dug proces dizajna i testiranja za otkrivanje i razvoj novih lijekova za liječenje pretilosti, prenamjena postojećih lijekova mogla bi ponuditi rješenje u ovom kontekstu. Klinički tretman, međutim, trenutno nudi razočaravajuće rezultate, s vrlo visokim stopama neuspjeha u gubitku težine ili ciklusima povrata težine, i samo jedan lijek odobren je za dugotrajnu upotrebu. Kombinacije lijekova mogu biti opcija za liječenje, ali, iako se široko koriste u kliničkoj praksi, u literaturi je dostupno vrlo malo podataka za njihovu validaciju. Pored toga, postoje jasni dokazi o ispoljavanju toksičnih efekata nastalih kao rezultat polimedikamentozne terapije pretilosti. Ovaj pregled se fokusira na savremene pristupe u farmakoterapiji pretilosti i o novim perspektivama kombinacija lijekova sa osvrtom na neželjene i toksične implikacije do kojih dolazi u toku liječenja.

Ključne riječi: pretilost, farmakoterapija, neželjeni i toksični efekti

Autor za korespodenciju: dr sc. Maida Šljivić Husejnović, docent
E-mail: maida.sljivic-husejnovic@untz.ba

CONTEMPORARY APPROACHES IN OBESITY PHARMACOTHERAPY: HALLENGES, RISKS, AND PERSPECTIVES

Faruk Kajtazović, Laura Divković, Emina Ahmetović, Ajla Džafić, Maida Beganović, Merima Ibišević, Maida Šljivić Husejnović

Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Hercegovina

Review paper

ABSTRACT

Obesity is a complex health condition characterized by excess body fat, accompanied by an increased risk of type 2 diabetes, fatty liver, hypertension, cardiovascular diseases, and cancer, leading to a decline in quality of life and life expectancy. Obesity therapy encompasses various strategies and approaches aimed at reducing body weight and improving the health of obese individuals, including dietary interventions, lifestyle changes, increased physical activity, pharmacotherapy, and surgical treatment. In the era of accelerated lifestyles, individuals with obesity are increasingly resorting to pharmacological treatments to control their weight. However, the development of effective and accessible drugs does not align with the long-term increase in the incidence of obesity. Considering the high failure rate, high cost, and lengthy process of designing and developing new anti-obesity drugs, repurposing existing drugs could offer a solution in this context. However, clinical treatment currently offers disappointing results, with very high failure rates in weight loss or weight regain cycles, and only one drug approved for long-term use. Drug combinations may be an option for treatment, but although widely used in clinical practice, there are limited data in the literature to validate them. Additionally, there is clear evidence of toxic effects resulting from polypharmacological therapy for obesity. This review focuses on contemporary approaches in obesity pharmacotherapy and on new perspectives of drug combinations with an emphasis on the adverse and toxic implications that occur during treatment.

Keywords: *obesity, pharmacotherapy, adverse and toxic effects*

Corresponding author: Maida Šljivić Husejnović, PhD, Assistant Prof.
E-mail: maida.sljivic-husejnovic@untz.ba

UVOD

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), pretilost je definirana kao abnormalno ili prekomjerno nakupljanje masti koje može negativno utjecati na zdravlje ljudi. Glavni pokazatelj pretilosti je indeks tjelesne mase (BMI), koji se izračunava kao omjer tjelesne težine u kilogramima podijeljene sa kvadratom visine u metrima (kg/m^2). Prema SZO, odrasle osobe s $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ smatraju se pretilima, dok se BMI između 25 i 29,9 smatra prekomjernom težinom (WHO, 2024). BMI kategorije za definiranje pretilosti razlikuju se prema dobi i spolu kod novorođenčadi, djece i adolescenata. Samo u SAD-u više od jedne trećine odraslih je pretilo, dok druga trećina spada u grupu ljudi sa prekomjernom težinom. Više od milijardu ljudi širom svijeta je pretilo – 650 miliona odraslih, 340 miliona adolescenata i 39 miliona djece. Ovaj broj se i dalje povećava. SZO procjenjuje da će do 2025. godine otprilike 167 miliona ljudi, odraslih i djece, pretrpiti zdravstvene posljedice jer imaju prekomjernu težinu ili su pretili. Uz visoku prevalenciju pretilosti dolazi i visoka stopa smrtnosti, jer je skoro 3 miliona smrti godišnje direktno povezano sa prekomjernom težinom ili pretilosti. Pretilost korelira sa ozbiljnim hroničnim poremećajima uključujući dijabetes tipa 2, nealkoholnu masnu bolest jetre (NAFLD), bubrežnu bolest, opstruktivnu apneju u snu, endokrine i reproduktivne poremećaje (sindrom policističnih jajnika, muški hipogonadizam), osteoartritis, dislipidemija, hipertenzija, koronarna bolest srca i moždani udar (Huang i sar. 2024). Prekomjerna tjelesna težina je jedan od glavnih riziko faktora za razvoj malignih oboljenja debelog crijeva, dojki, endometrija, jednjaka i bubrega. Djelimično, ove povezanosti sa povećanim rizikom od razvoja karcinoma mogu se objasniti promjenama u metabolizmu endogenih hormona uključujući spolne steroide, inzulin i faktore rasta slične inzulinu što može dovesti do narušavanja normalne ravnoteže između proliferacije, diferencijacije i apoptoze ćelija. Stoga se čini da je izbjegavanje debljanja važan faktor za prevenciju malignih bolesti (Farhat i sar. 2010). Nije dokazano da održavani gubitak težine korištenjem lijekova protiv pretilosti smanjuje kardiovaskularni rizik međutim, epidemiološki podaci ukazuju da smanjenje tjelesne težine, čak i ako se ne održava, može biti povezano sa smanjenjem kumulativnog rizika od kardiovaskularnih bolesti. U ovom širem kontekstu, treba napomenuti da klinička ispitivanja lijekova protiv pretilosti općenito nisu imala dovoljnu statističku moć da pokažu smanjenu smrtnost uzrokovanu kardiovaskularnim bolestima. Trenutni najvažniji način za liječenje i preveniranje pretilosti jeste promjena načina života, kao što su korekcija ishrane i adekvatna fizička aktivnost. Dobro poznata sklonost ponovnom dobivanju težine nakon uspješnog gubitka težine također pokreće potrebu za dodatnom farmakoterapijom protiv pretilosti.

FARMAKOTERAPIJA PRETILOSTI

Farmakoterapija usmjerena ka smanjenju tjelesne težine može pružiti koristi i za suzbijanje pretilosti i za smanjenje rizika od komorbiditeta povezanih s pretilosti. Farmakološki pristupi uključuju ciljanje enzima i hormona koji su uključeni u patofiziologiju pretilosti. Ovi ciljevi uključuju lipazu (enzim uključen u razgradnju i apsorpciju masti), glukagon peptid 1 (GLP-1; hormon koji potiče postprandijalnu sitost), leptin (ključni regulator gladi) i MC4R (receptor povezan sa G-proteinom koji reguliše energetske homeostazu) (Parmar, 2023). Međutim, mnogi lijekovi za mršavljenje su povučeni sa tržišta zbog ozbiljnih štetnih efekata. Primjeri uključuju plućnu hipertenziju (aminoreks), kardiovaskularnu toksičnost, npr. valvopatija izazvana flenfluraminom, moždani udar (fenilpropanolamin (PPA)), višak nefatalnih kardiovaskularnih događaja (sibutramin) i neuropsihijatrijski problemi (rimonabant; odobren u Evropi, ali ne i u SAD). Ovo negativno iskustvo je pomoglo u oblikovanju trenutnog razvoja

lijekova i procesa odobravanja novih lijekova protiv pretilosti. U stvari, dozvole za rimonabant i sibutramin su povučene zbog povećanog rizika od psihijatrijskih poremećaja, nefatalnog infarkta miokarda i/ili moždanog udara. Mnogi lijekovi su odobreni u SAD-u i Europi za liječenje pretilosti, bilo kao kratkoročno ili kao dugotrajno liječenje. Međutim, razlike između američke Uprave za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA) i Evropske agencije za lijekove (eng. European Medicines Agency, EMA), u percepciji odnosa rizika i koristi za pojedinačne lijekove, dovele su do neslaganja u odobravanju i/ili povlačenju lijekova za smanjenje tjelesne težine (Krentz i sar. 2016).

Tabela 1. Razlike u mišljenjima za odobravanje lijekova za pretilost između FDA i EMA. † Odobren samo od strane EMA.

Naziv lijeka	Godina izdavanja lijeka u tržište	Godina povlačenja lijeka sa tržišta
Sibutramin	1977	2010
Orlistat	1999	
Rimonabant †	2006	2009
Qsymia	2012	
Saxenda	2014	
Contrave	2014	
Liraglutid 3,0 mg	2014 (FDA) 2015 (EMA)	

Ekstrapolacija farmakoloških efekata lijekova protiv pretilosti sa životinja na ljude u smislu efikasnosti i toksičnosti je historijski bila loša. Na primjer, agensi koji utiču na potrošnju energije vrlo se slabo prevode s glodara ili pasa na ljude zbog razlika u metaboličkoj regulaciji. Iako je nekoliko ciljeva istraženo na životinjskim modelima kao potencijalne mete za liječenje pretilosti, vrlo malo agenasa je zapravo napredovalo do dokaza faza koncepta i kliničkih ispitivanja na ljudima. Što se tiče toksičnosti, agensi protiv pretilosti koji djeluju izuzetno dobro mogu imati komplicirane probleme u procjeni sigurnosti (tj. gubitak težine ograničava doziranje i smanjuje terapijsku marginu sigurnosti). Do danas, ne postoje validirani životinjski modeli ili pretklinički i/ili toksikološki pregledi za precizno predviđanje anoreksigenom izazvane valvulopatije i plućne arterijske hipertenzije (PAH) kod ljudi. Nadalje, ne postoji dobar način za predviđanje rijetkih i naizgled štetnih efekata specifičnih za ljude. Rijetki efekti će vjerovatno biti identificirani samo kroz provođenje izuzetno velikih postmarketinških kliničkih ispitivanja ili opsežnog praćenja (Elangbam, 2009)

HRONOLOGIJA TOKSIČNOSTI LIJEKOVA ZA PRETILOST

Smatra se da su efekti stimulanasa centralnog nervnog sistema (amfetamina i analoga sličnih amfetaminu) na smanjenje težine posredovani prvenstveno smanjenim unosom hrane. Ovi simpatomimetički agensi oslobađaju noradrenalin iz presinaptičkih vezikula u hipotalamusu. Ranije su bili široko korišteni, ali je njihova upotreba opala zbog zabrinutosti za kardiovaskularnu sigurnost i potencijalnu zloupotrebu. Aminoreks je bio povezan sa nastankom jatrogene primarne plućne hipertenzije u Evropi. Tokom ranih 90-ih Weintraub i sar. ukazali su na dosljedan gubitak težine sa kombinacijom fentermina i fenfluramina koja je postala poznata kao “Phen-Fen”. Kombinacija je

bila široko korištena dok nisu zabilježeni periodični slučajevi lijevostrane srčane vulvopatije i plućne hipertenzije. Ovo je dovelo do povlačenja fenfluramina i deksfenfluramina sa tržišta. Dokazano je da je rizik od nastanka valvopatije povezan sa dugotrajnom izloženošću ovim lijekovima.

U populaciji Velike Britanije istražen je rizik kod pacijenata koji su primili 3 ili više propisanih terapija i bio je nizak - 7,1 na 10000 izloženih subjekata tokom petogodišnjeg razdoblja. Nasuprot tome, pacijenti koji su koristili lijekove više od 4 mjeseca bili su pod znatno većim rizikom - 35 na 10000 izloženih subjekata u periodu od pet godina. Kontrolna analiza subjekata koji su koristili bilo koji lijek više od 4 mjeseca pokazala je da su pod znatno većim rizikom za nastanak abnormalnosti srčanih zalistaka u odnosu na one koji su lijek uzimali 1-3 mjeseca (Krentz i sar. 2016).

Još jedan primjer široko korištenog lijeka koji je povučen s tržišta je spoj fenilpropanolamin (PPA), koji se nalazio u mnogim preparatima za pomoć pri mršavljenju. Studija je povezala korištenje PPA sa povećanim rizikom za nastanak hemoragičnog udara. Ovo otkriće potaknulo je FDA da 2000. godine od farmaceutskih kuća zatraži da prestanu stavljati ovaj lijek na tržište. Međutim, još uvijek se nalazi i dostupan je u nekim evropskim zemljama.

Takođe 2000. godine, EMA je preporučila povlačenje nekoliko lijekova protiv pretilosti zbog nepovoljnog odnosa rizika i koristi uključujući fentermin, dietilpropion i mazindo. Među podacima, fentermin je još uvijek daleko najpropisivaniji lijek protiv pretilosti u SAD-u. Meta-analiza šest kratkoročnih studija fentermina pokazala je da su prolazni simptomi stimulacije centralnog nervnog sistema, kao što su nesаница, razdražljivost i anksioznost, bili češći kod pacijenata koji su primali ili kontinuiranu (24%) ili intermitentnu (27%) terapiju nego kod onih koji su primali placebo (8%). Smatra se da dietilpropion, fendimetrazin ili benzfetamin, koji su mnogo rjeđe propisivani lijekovi, imaju profile nuspojava slične onima kod fentermina, iako je dostupno manje informacija o ovim lijekovima (Krentz i sar. 2016).

ORLISTAT I RAZVOJ NOVIH LIJEKOVA PROTIV PRETILOSTI

Orlistat je sintetički hidrogenirani derivat lipstatina koji djelimično inhibira enzime želučane lipaze, pankreasne lipaze i karboksi ester lipaze. Ovi enzimi djeluju tako što hidroliziraju trigliceride iz ishrane u masne kiseline i monogliceride, koje potom apsorbuju ćelije sluzokože probavnog trakta. Orlistat smanjuje apsorpciju unesene masti za 30%, povećavajući njeno izlučivanje fecesom. Tokom mnogo godina bio je jedini dostupan lijek za dugoročno liječenje pretilosti. U SAD-u, Evropskoj uniji i nekim drugim zemljama orlistat je dostupan u slobodnoj prodaji u nižoj (50% smanjenoj) dozi od 60 mg. Tretman Orlistatom u dozi od 120 mg snižava tjelesnu težinu, poboljšava kardiovaskularne faktore rizika, uključujući snižavanje ukupnog LDL holesterola, sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, kao i glukoze u plazmi. Najčešći predvidivi neželjeni efekti orlistata su efekti na nivou probavnog sistema kao što su dijareja, inkontinencija, pojačano znojenje, nadutost, dispepsija. Kao posljedica toga, ovaj lijek se u velikoj većini slučajeva ne podnosi dobro. Orlistat je kontraindikovano kod pacijenata sa holestazom ili sindromom hronične malapsorpcije (Rodger i sar. 2012).

Dešavale su se određene prijave nastanka oštećenja jetre, uključujući i slučajeve zatajenja jetre što je navelo FDA da poduzme određene korake u procjeni sigurnosti orlistata. Procjenom je otkriveno 13 slučajeva teškog oštećenja jetre u periodu od 10 godina. Utvrđeno je da je 40 miliona ljudi širom svijeta koristilo orlistat u cijeloj ili polovičnoj dozi. Veza između oštećenja jetre i terapije orlistatom ostala je nerazjašnjena CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use) EMA-e smatrao je da nije poznat mehanizam i da nema jakog dokaza o tome da orlistat povećava rizik nastanka teškog oštećenja jetre (Zhou i sar. 2012).

Provedene su meta-analize randomiziranih kontroliranih studija kako bi se sumirala efikasnost lijekova protiv pretilosti u smanjenju BMI i poboljšanju zdravlja kod djece i adolescenata. Izvori podataka uključuju Medline, Embase, Cochrane registar kontrolisanih ispitivanja i druge registre kontrolisanih ispitivanja, zajedno sa referentnim listama identifikovanih članaka. Orlistat umjereno smanjuje BMI uz visoku prevalenciju gastrointestinalnih nuspojava. (Janelle i sar. 2018).

Trenutno je dostupno malo informacija za pružanje smjernica u vezi s doziranjem kod pretilih pedijatrijskih pacijenata. U budućnosti, regulatori, kliničari i farmaceutska industrija trebali bi razmotriti situacije u razvoju lijekova u kojima je uključivanje pretilih pacijenata u pedijatrijska ispitivanja neophodno kako bi se olakšala sigurna i efikasna upotreba novih lijekova u pedijatrijskoj populaciji (Viner i sar. 2010).

Budući da je orlistat trenutno jedini lijek protiv pretilosti odobren za dugotrajnu upotrebu, hitno je potreban razvoj novih lijekova protiv pretilosti. Ovo rezonovanje je dovelo do razvoja brojnih novih tretmana za pretilost u kojima je ciljano više mehanizama, bilo jednim lijekom, kao što je tezofenzin ili kombinacijom lijekova kao što su fentamin/topiramid, naltrekson/bupropion i kupropion/zonisamid. Međutim, prethodna povlačenja također sugeriraju da regulatorni odbori sve više oklijevaju da odobre preporuku za liječenje pretilosti korištenjem novih lijekova, uključujući lorkaserin, fentamin/topiramid i naltrekson/bupropion, bez podataka koji jasno podržavaju dugoročnu sigurnost. Naglasak koji su i američka FDA i EMA stavili na metaboličke indekse temelji se na prepoznavanju da lijekovi utiču na početak kardiovaskularnog ishoda direktnije nego sam gubitak težine. Iako su smjernice za odobrenje i povlačenje sa tržišta značajne prepreke razvoju novih lijekova protiv pretilosti, dugoročnu sigurnost i djelotvornost novorazvijenih lijekova također treba procijeniti u liječenju pretilosti, što često zahtijeva stalnu terapiju da bi se postigao i održavao gubitak tjelesne težine (Kang i sar. 2012).

Konačno, vlada bi trebala da podrži društvenu intervenciju kao sredstvo za upravljanje pretilosti, jer se pretili pacijenti često vraćaju u toksično okruženje i ponašanje. Prilikom razmatranja terapije protiv pretilosti, pored naučnih i regulatornih razmatranja, treba uzeti u obzir i finansijske barijere pacijenata.

SEMAGLUTID

Glukagonu sličan, agonist peptid-1 receptora (GLP-1RA) semaglutid je najnoviji odobreni lijek koji je trenutno dostupan u obliku subkutane i oralne formulacije (Smits i sar. 2021).

Semaglutid je prvobitno dobio tržišnu dozvolu za liječenje dijabetesa tipa 2 2021. i 2022. godine. Regulatorne agencije u SAD-u i Evropi licencirale su semaglutid za liječenje osoba koje su pretile i koje imaju barem jedan komorbiditet povezan s težinom. Randomizirana kontrolisana ispitivanja pod pokroviteljstvom proizvođača pokazala su gubitak od skoro 12% tjelesne težine u periodu od 68 sedmica, međutim, kada se lijek prestane koristiti, ljudi vraćaju većinu svoje težine od prije liječenja (Singh i sar. 2023).

Neželjeni efekti povezani sa korištenjem semaglutida obuhvataju hipoglikemiju, gastrointestinalne nuspojave, pankreatitis i karcinom pankreasa, karcinom štitnjače, oštećenja žučne kese, kardiovaskularne bolesti, akutna oštećenja bubrega, dijabetičku retinopatiju i alergijske reakcije. Semaglutid izaziva uglavnom blage do umjerene i prolazne probavne smetnje i povećava rizik od žučnih bolesti (kolelitijaze). S obzirom na njegovo blagotvorno metaboličko i kardiovaskularno djelovanje, te nizak rizik od teških nuspojava, semaglutid ima ukupan povoljan profil rizika/koristi za pacijente s dijabetesom tipa 2 (Smits i sar. 2021).

U Velikoj Britaniji, Nacionalni institut za zdravlje preporučio je semaglutid kao opciju za kontrolu tjelesne težine uz maksimalno trajanje liječenja od 2 godine. U toku su daljnje studije kako bi se procijenio efekat semaglutida na dugoročne zdravstvene koristi (Singh i sar. 2023).

KOMBINOVANA TERAPIJA ZA LIJEČENJE PRETILOSTI

Moguće prednosti kombinovane terapije lijekovima su sljedeće: povećana efikasnost tretmana kroz sinergističko ili aditivno djelovanje, promicanje endogenog sinergizma, lijekovi sa različitim farmakodinamičkim djelovanjem i koji djeluju na različite puteve mogu “pobijediti” kompenzacijske mehanizme uključene u homeostazu i na taj način spriječiti ili odgoditi formiranje platoa tokom nastojanja da se izgubi težina ili kombinacija lijekova sa suprotnim nuspojavama, kao što je lijek povezan s nesanicom sa drugim do pospanosti, može povećati podnošljivost liječenja (Halpern i sar. 2010)

Kombinacija niskih doza može smanjiti rizik od neželjenih efekata. Nedostaci kombinovane terapije uključuju: povećanu učestalost nuspojava usljed aditivnog djelovanja i interakcija lijekova, nefleksibilnost doziranja u kombinovanim lijekovima propisanim u jednom lijeku, povećane troškove liječenja.

Neke kombinacije lijekova su već proučavane u prošlosti i prestale se koristiti. Vrijedi podsjetiti da je obustava komercijalizacije ovih kombinacija nastala zbog nuspojava jedne od njihovih komponenti, a ne zbog bilo kakve negativne interakcije između lijekova.

Fentermin je kateholaminiergička supstanca koja povećava oslobađanje noradrenalina u CNS-u. Fenfluramin podiže sinaptičke nivoe serotonina u CNS-u tako što stimuliše lučenje i inhibira ponovni unos serotonina.

Kombinacija fenfluramina i fentermina rezultirala je smanjenjem nuspojava i povećanom djelotvornošću, čak i u nižim dozama, u poređenju sa upotrebom bilo kojeg lijeka samostalno. Ova kombinacija je bila široko korištena prije nego što je fenfluramin zabranjen sa tržišta zbog povećanog rizika od valvulopatije i primarne plućne hipertenzije (Halpern i sar. 2010).

BUPROPION I NALTREKSON (CONTRAVE)

Kombinaciju bupropiona sa naltreksonom već nekoliko godina proučava farmaceutska kompanija Orexigen Therapeutics Inc. kao potencijalni agens u liječenju pretilosti. Bupropion je inhibitor ponovnog preuzimanja dopamina i norepinefrina koji je trenutno odobren za liječenje depresije i kao pomoćno sredstvo za prestanak pušenja, sa učinkovitim, ali skromnim rezultatima u gubitku težine. Naltrekson je antagonist opioidnih receptora, prvobitno odobren kao tretman za ovisnost o opijatima, a kasnije i za ovisnost o alkoholu. Studije provedene na malom broju pacijenata koji su koristili Naltrekson u monoterapiji kao lijek protiv pretilosti pokazale su se frustrirajućim, uz malo ili nimalo smanjenje tjelesne težine. Uprkos tome što ovi lijekovi imaju skromnu efikasnost kada se koriste, omogućilo je i hipotezu o mogućem sinergističkom efektu njihove kombinacije.

Sinergistički efekat ove kombinacije dokazan je u studijama na glodarima, u kojima je pokazano smanjenje unosa hrane i kod mršavih i dijetom izazvanih pretilih miševa, u poređenju sa oba lijeka u monoterapiji i placebo. Najčešće uočena nuspojava bila je mučnina (Son i sar. 2020).

ENTERMIN/TOPIRAMAT (QSYMIA)

Fentermin/topiramata je dugodjelujuća kombinacija fentermina, kratkoročnog sredstva za suzbijanje apetita i antiepileptika topiramata. Ovaj lijek je razvijen kako bi se smanjila učestalost nuspojava i povećala efikasnost lijeka. U kombinaciji, ova dva lijeka imaju sinergistički efekat i koriste se u nižim dozama nego kada se koriste samostalno. Fentermin suzbija apetit povećavajući lučenje epinefrina u hipotalamusu i odobren je za kratkotrajnu upotrebu u liječenju pretilosti. Topiramata je agonist gama-aminobuterne kiseline, antagonist glutamata i inhibitor karboanhidraze koji se koristi za liječenje epilepsije i prevenciju migrena, iako je njegov mehanizam za liječenje pretilosti neizvjestan.

Kako upotreba topiramata tokom trudnoće povećava rizik od rascjepa nepca kod beba, za žene koje bi mogle zatrudnjeti, testiranje na trudnoću treba obaviti prije početka terapije ovim lijekom i svaki mjesec tokom upotrebe. Mnoge nuspojave topiramata povezane su sa inhibicijom aktivnosti karboanhidraze, uključujući metaboličku acidozu, hipokalemiju, bubrežne kamence, glaukom, miopiju i anhidrozu. Povezane simptome treba pažljivo pratiti i korištenje lijeka treba prekinuti čim se simptomi pojave. Važno je da se topiramata ne smije kombinovati s drugim lijekovima koji inhibiraju karboanhidrazu. Upotreba kombinacije fentermina/topiramata povećava rizik od depresije, anksioznosti, poremećaja spavanja, suicidalnih misli i poteškoća u koncentraciji. Lijek treba odmah prestati koristiti ako se uoče suicidalne misli ili neadekvatno ponašanje. Ako pacijent rukuje opasnim mašinama, potrebno je poduzeti dodatni oprez. Također, fentermin/topiramata je povezan sa abnormalnostima ukusa na način koji zavisi od doze (Son i sar. 2020).

LORKASERIN

Lorkaserin je selektivni agonist 5-hidroksitriptamin (5-HT) 2C receptora. Sigurnosno kliničko ispitivanje pokazalo je mogući povećan rizik od raka zbog korištenja lijeka za mršavljenje Belviq, Belviq XR (lorkaserin) izdanim 14. januara 2020. Ovo povlačenje je uslijedilo nakon što je FDA pregledala podatke o kardiovaskularnim i metaboličkim efektima lorkaserina kod pacijenata s prekomjernom težinom i pretilosti – tromboliza kod infarkta miokarda.

Primarna sigurnosna analiza nije pokazala značajnu razliku između lorkaserina i placeba u riziku od velikih štetnih kardiovaskularnih bolesti. Međutim, otkriveno je da je kod više pacijenata koji su uzimali lorkaserin (n=462; 7,7%) dijagnosticiran karcinom u odnosu na one koji su uzimali placebo (n=423; 7,1%). Prijavljen je niz tipova karcinoma, koji se češće javljaju u skupini koja je primala lorkaserin, uključujući karcinom pankreasa, kolorektalni i plućni karcinom. Nije bilo očigledne razlike u incidenciji raka u početnim mjesecima liječenja, ali se neravnoteža povećavala s dužim trajanjem terapije lorkaserinom.

S druge strane, lorkaserin nije uspio dobiti odobrenje EMA-e zbog pretkliničkih podataka koji su otkrili potencijal za razvoja karcinoma dojke i zabrinutosti u vezi sa psihijatrijskim problemima uključujući pogoršanje depresije, pojavu suicidalnih misli i psihozu (Tak i sar. 2020).

SIBUTRAMIN

Sibutramin i njegovi metaboliti djeluju na CNS-u inhibirajući ponovni unos serotonina i norepinefrina, što rezultira smanjenjem apetita, povećanjem sitosti i mogućim povećanjem termogeneze. Sibutramin se često koristi u kombinaciji sa orlistatom. Budući da su mehanizmi djelovanja ova dva lijeka vrlo

različiti, njihova kombinovana primjena je ocijenjena u nekim studijama. Kod pretilih žena koje su već godinu dana koristile sibutramin, kombinacija sa orlistatom u odnosu na placebo tokom 16 sedmica nije rezultirala većim gubitkom težine. Provedene su dvije studije u različitim centrima u Turskoj, sa sličnim rezultatima. U randomiziranoj otvorenoj studiji od 12 sedmica, liječenje samo dijetom upoređeno je s dijetom u kombinaciji s upotrebom sibutramina, orlistata i sibutramina u kombinaciji s orlistatom. Kombinacija sibutramina i orlistata pokazala se efikasnijom u smanjenju BMI u odnosu na monoterapiju orlistatom, ali nije značajno bolja od samog sibutramina. Oduzeti placebo gubitak težine kombinovanom terapijom bio je 6,5%. Druga studija koja je uključivala 89 pretilih žena, pokazala je prosječan gubitak težine od 5,5%, 10,2% i 10,6% uz monoterapiju orlistatom, sibutraminom i kombinovanom terapijom, respektivno, još jednom bez statističke razlike između posljednje dvije grupe. Uprkos ovim razočaravajućim rezultatima, oko 14% specijalista za pretilost se izjasnilo da koristi ovu kombinaciju u kliničkoj praksi (Halpern i sar. 2010).

PRIRODNI LIJEKOVI ZA LIJEČENJE PRETILOSTI

Biljni proizvodi protiv pretilosti, uključujući i one dostupne u trgovinama i na internetu, mogu biti vrlo heterogene prirode. Imaju nepredvidive nivoe aktivnih sastojaka i nepredvidive i potencijalno štetne efekte. Neželjeni efekti ovih proizvoda mogu se pripisati unutrašnjoj toksičnosti biljaka i interakcijama između biljaka i lijekova.

Nekoliko vrsta *Aristolochiae* korišteno je u tradicionalnoj medicini u mnogim dijelovima svijeta. Međutim, njihova upotreba više nije dozvoljena u mnogim zemljama zbog toksičnosti kiselih sastojaka ove vrste koji su snažni nefrotoksini i kancerogeni. Usljed grešaka, dolazi do zamjena i pogrešne identifikacije zbog sličnog izgleda, ili zabune oko nomenklature, jer biljni preparati protiv pretilosti mogu sadržavati *Aristolochia* vrstu (*A. fangchi*) umjesto namijenjene netoksične biljke *Stephania tetrandra*. Neodgovarajuća i dugotrajna upotreba *Aristolochia* vrste može dovesti do nefropatije, brzo progresivnog intersticijskog nefritisa i urotelnog maligniteta (Chan i sar. 2009).

Biljni proizvodi protiv pretilosti mogu sadržavati biljke koje nisu namijenjene za kontrolu tjelesne težine. Na primjer, dodaci prehrani koji sadrže alkaloidne efedre i kofein, dobijeni od guarane su naširoko promovisani u svrhu smanjenja težine. Efedrin i srodni alkaloidi imaju agonistički efekat na α - i β -adrenergičke receptore. Njihova zloupotreba može dovesti do teške hipertenzije, palpitacije, tahikardije, infarkta miokarda, moždanog udara, psihijatrijskih poremećaja i smrti. Kardiovaskularni i CNS efekti efedrinske su potencirani drugim stimulansima kao što je kofein.

Biljni proizvodi protiv pretilosti mogu sadržavati antrahinonske laksative. Zbog mogućnosti povećanog kancerogenog rizika, ne preporučuje se hronična ili dugotrajna upotreba. Zbog njihovog potencijalnog hepatotoksičnog i nefrotoksičnog djelovanja, takve biljne lijekove treba koristiti pod medicinskim nadzorom.

Toksični efekti mogu biti posljedica štetnih interakcija između biljnih proizvoda protiv pretilosti i lijeka. Efedrin može proizvesti simpatomimetički toksični sindrom obilježen hipertenzijom, tahikardijom, midrijazom, dijaferezom, hipertermijom, uznemirenošću i halucinacijama, posebno u slučaju predoziranja i u prisustvu drugih simpatomimetika. Hronična upotreba i predoziranje antrahinonima može dovesti do bolova u trbuhu, dijareje i gubitka tečnosti i elektrolita (Chan i sar. 2009).

ZAKLJUČAK

Lijekovi protiv pretilosti imaju vrlo lošu sigurnosnu evidenciju. Zbog mogućnosti široko rasprostranjene zloupotrebe, granica sigurnosti lijekova protiv pretilosti postavljena je na mnogo viši nivo nego za druge hronične bolesti, kao što su dijabetes i hipertenzija. Zapravo, klinička ispitivanja za odobrenje lijekova protiv pretilosti su dvostruko duža od ispitivanja lijekova za liječenje nekih hroničnih bolesti. Komplikacije opasne po život dovele su do povlačenja mnogo lijekova koji su se koristili za terapiju pretilosti. Dodaci prehrani koji se prodaju bez recepta koji sadrže alkaloidne efedre povučeni su sa tržišta. Čak i za trenutno odobrene lijekove, podaci o sigurnosti uglavnom nedostaju, a njihovo odobrenje za liječenje pretilosti ograničeno je na kratkotrajnu upotrebu. Profili koristi i rizika sibutramina i orlistata, koji su trenutno odobreni za dugotrajnu upotrebu, izgledaju pozitivni, međutim, sibutramin se i dalje prati zbog dugoročnih sigurnosnih razloga, uključujući hipertenziju i tahikardiju. Kao rezultat toga, postoji sve veća potreba farmaceutskih kompanija da pronađu efikasne, sigurne i dobro podnošljive lijekove protiv pretilosti. Preko 100 molekularnih meta za potencijalne lijekove protiv pretilosti nalaze se u različitim fazama prekliničkog i kliničkog razvoja.

LITERATURA

1. A. J. Krentz, K. Fujioka, M. Hompesch (2016) Evolution of pharmacological obesity treatments: focus on adverse side-effect profiles. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 18: 558–570.
2. Bruno Halpern, Eduardo S. L. Oliveira, Eduardo S. L. Oliveira, André M. Faria, Alfredo Halpern, Maria Edna de Melo, Cintia Cercato and Marcio C. Mancini (2010) Combinations of drugs in the Treatment of Obesity. *Pharmaceuticals* 3(8), 2398-2415
3. C. S. Elangbam (2009) Current Strategies in the Development of Anti-obesity Drugs and Their Safety Concerns doi.org/10.1354/vp.46-1-10
4. George A. Bray, MD, MACP, MACE, MABOM and Jonathan Q. Purnell, MD, FTOS (2022) An Historical Review of Steps and Missteps in the Discovery of Anti-Obesity Drugs (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581942/>) (pristupljeno 12.3.2024.)
5. Gurdeep Singh, Matthew Krauthamer, Meghan Bjalme-Evans (2023) Wegovy (Semaglutide): A New Weight Loss Drug for Chronic Weight Management doi.org/10.1136/jim-2021-001952
6. Huang, Pan-feng; Wang, Qi-Yu; Chen, Rong-Bin; Wang, Ya-Di; Wang, Yuan-Yuan; Liu, Jiang-Hua; Xiao, Xin-Hua; Liao, Zhe-Zhen (2024) A New Strategy for Obesity Treatment: Revealing the Frontiers of Anti-obesity Medications DOI: 10.2174/0115665240270426231123155924
7. Janelle D. Vaughns MD, Laurie S. Conklin MD, Ying Long PharmD, Panli Zheng PharmD, Fahim Faruque PharmD, Dionna J. Green MD, John N. van den Anker MD, PhD, Gilbert J. Burckart PharmD (2018) Obesity and Pediatric Drug Development doi/abs/10.1002/jcph.105
8. Jang Won Son and Sungrae Kim (2020) Comprehensive Review of Current and Upcoming Anti-Obesity Drugs. *Diabetes Metab J.* 44(6): 802–818
9. Jun Goo Kang and Cheol-Young Park (2012) Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety *Diabetes Metab J.* 36(1): 13–25.
10. Mark M. Smits, Daniël H. Van Raalte (2021) Safety of Semaglutide, *Sec. Clinical Diabetes*
11. Mayur S. Parmar (2023) Advances in Anti-obesity Pharmacotherapy: Current Treatments, Emerging Therapies, and Challenges DOI: 10.7759/cureus.46623

12. R. John Rodgers, Matthias H. Tschöp, John P. H. Wilding (2012) Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis Model Mech* 5 (5): 621–626.
13. R. M. Viner, Y. Hsia, T. Tomsic, I. C. K. Wong (2010) Efficacy and safety of anti-obesity drugs in children and adolescents: systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews* 11(8): 593-602
14. Thomas Y.K. Chan (2009) Potential Risks Associated with the Use of Herbal Anti-Obesity Products *Drug Safety* 32 (6): 453-456
15. Tilda Farhat PhD, MPH, Ronald J. Iannotti PhD, Bruce G. Simons-Morton EdD, MPH (2010) Overweight, Obesity, Youth, and Health-Risk Behaviors. *American Journal of Preventive Medicine*, Volume 38(3):258-267
16. WHO (2022) World Obesity Day 2022 – Accelerating action to stop obesity
17. WHO (2024) Obesity and overweight <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (pristupljeno 13.3.2024.)
18. Young Jin Tak and Sang Yeoup Lee (2020) Anti-Obesity Drugs: Long-Term Efficacy and Safety: An Updated Review. *World J Mens Health*. 39(2): 208–221
19. Yu-Hao Zhou, Xiu-Qiang Ma, Cheng Wu, Jian Lu, Shan-Shan Zhang, Jia Guo, Shun-Quan Wu, Xiao-Fei Ye, Jin-Fang Xu, Jia He (2012) Effect of Anti-Obesity Drug on Cardiovascular Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. doi.org/10.1371/journal.pone.0039062

Generalni pokrovitelj



Sponzori



BERLIN-CHEMIE
MENARINI

eliksir
PHYTOPHARM



ABDIIBRAHIM



TOSAMA

Since 1923



ZADA
PHARMACEUTICALS



FARMALOGIST ALLBIX
Member of ERGO wbs Group



HERCEGOVINALIJEK
S punim povjerenjem

CYDONIA[®]
PHYTOPHARMACEUTICALS



AbelaPharm



ALKALOID
Brinemo o zdravlju



THE HOLISTIC CHOICE



SANDOZ

SALVUS

PharmaS[®]



VIATRIS



Komora magistara farmacije
Tuzlanskog kantona



Farmaceutski fakultet
Univerziteta u Tuzli



Tehnološki fakultet
Univerziteta u Tuzli



Udruženje za nutricionizam i
dijetetiku BiH



Prehrambeno tehnološki
fakultet Osijek