



KOMORA MAGISTARA FARMACIJE TUZLANSKOG KANTONA

ZBORNIK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE
TUZLANSKOG KANTONA

DVANAESTI SIMPOZIJ





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

ZBORNIK RADOVA

SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE
TUZLANSKOG KANTONA

DVANAESTI SIMPOZIJ

Tuzla, 01.10.2025.

ZBORNİK RADOVA
SA SIMPOZIJA MAGISTARA FARMACIJE TUZLANSKOG KANTONA
DVANAESTI SIMPOZIJ

God. 12, br. 12 (2025)
ISSN: 2490-2284 (Štamp. izd.)
ISSN 2303-7229 (CD-ROM)
ISSN 2566-4271 (Online)

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK: Dr.sci. Nahida Srabović, van. prof. (Tuzla, BiH)

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

NAUČNI SAVJET:

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

UREĐIVAČKI ODBOR:

1. Dr.sci. Alija Uzunović, van. prof. (Sarajevo, BiH)
2. Dr.sci. Amra Džambić, docent (Tuzla, BiH)
3. Dr.sci. Anđelka Lukić Račić, docent (Banja Luka, BiH)
4. Dr.sci. Ante Lončarić, van. prof. (Osijek, Hrvatska)
5. Dr.sci. Antun Jozinović, van. prof. (Osijek, Hrvatska)
6. Dr.vet.med. Azra Sinanović (Sarajevo, BiH)
7. Dr.sci. Bojana Vidović, van. prof. (Beograd, Srbija)
8. Dr.sci. Broza Šarić-Kundalić, van. prof. (Tuzla, BiH)
9. Dr.sci. Dalila Haličević, viši asistent (Tuzla, BiH)
10. Dr.sci. Dubravka Vitali Čepo, van. prof. (Zagreb, Hrvatska)
11. Dr.med. Dževad Šabić (Živinice, BiH)
12. Dr.sci. Ermina Cilović Kozarević, docent (Tuzla, BiH)
13. Dr.sci. Fuad Pašić, van. prof. (Tuzla, BiH)
14. Dr.sci. Haris Nikšić, van. prof. (Sarajevo, BiH)
15. Dr.sci. Indira Šestan, van. prof. (Tuzla, BiH)
16. Dr.sci. Ines Banjari, van. prof. (Osijek, Hrvatska)
17. Dr.sci. Ivana Flanjak, van. prof. (Osijek, Hrvatska)
18. Dr.sci. Lana Lekić, van. prof. (Sarajevo, BiH)
19. Dr.sci. Maida Šljivić-Husejnović, docent (Tuzla, BiH)
20. Dr.sci. Marizela Šabanović (Tuzla, BiH)
21. Dr.sci. Merima Ibišević, docent (Tuzla, BiH)
22. Dr.sci. Milka Popović, van. prof. (Novi Sad, Srbija)
23. Dr.sci. Nahida Srabović, van. prof. (Tuzla, BiH)
24. Dr.sci. Nataša Bubić Pajić, docent (Banja Luka, BiH)
25. Dr.sci. Saša Pilipović, van. prof. (Sarajevo, BiH)
26. Dr.sci. Žarko Gagić, van. prof. (Banja Luka, BiH)

ORGANIZACIONO-PROGRAMSKI ODBOR:

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

IZDAVAČ: 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 UREDNIKA	7
----------------------	---

SAŽECI / ABSTRACTS

<i>Sandra Osmanbegović, Selma Azapagić, Tatjana Krdžalić</i> STRUKTURA PROPISANIH LIJEKOVA KAO ODRAZ ZDRAVSTVENOG STANJA POPULACIJE	10-11
<i>Irma Gušić, Mahira Durić, Mustafa Mehić, Emina Korić, Haris Nikšić</i> USPOSTAVLJANJE <i>IN VITRO</i> MODELA ZA ISPITIVANJE ANTI-SARS-COV-2 AKTIVNOSTI PRIRODNIH PRODUKATA.....	12-15
<i>Haris Nikšić, Emina Korić</i> PRAVILNO FORMIRANJE ČAJNIH MJEŠAVINA.....	16-19
<i>Azabagić Selma, Mokayes Nadina</i> FIZIČKA AKTIVNOST I BMI KOD MLADIH – POLNE RAZLIKE	20-21

IZVORNI ZNANSTVENI RADOVI/ORIGINAL SCIENTIFIC PAPERS

<i>Amra Džambić, Demir Bjelošević, Maida Šljivić-Husejnović, Merima Ibišević, Aida Smajlagić, Merima, Salković</i> SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA DJELOVANJA TETRAKETONA.....	24-41
---	-------

<i>Demir Bjelošević, Emir Horozić, Zahida Ademović, Amra Džambić, Ermina Cilović Kozarević</i> UTJECAJ SMJESE RASTVARAČA NA ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST I SADRŽAJ POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA <i>CRATAEGI FOLIUM CUM FLORE</i>	42-50
--	-------

<i>Selma Azabagić, Nadina Mokayes, Sandra Osmanbegović</i> KVALITET ZRAKA U VRTIĆIMA U GRADU TUZLA, BOSNA I HERCEGOVINA.....	51-61
--	-------

PREGLEDNI RADOVI/REVIEW PAPERS

<i>Emina Ahmetović, Samir Ćurić, Laura Divković, Belkisa Djedović, Ajla Džafić, Amina Hasikić, Sumea Haušić, Hedija Starčević, Maida Šljivić Husejnović, Merima Ibišević</i> ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL EKSTRAKTA KORE PLODA NARA U TERAPIJI HIPERPIGMENTACIJE.....	64-73
---	-------

<i>Amina Hasikić</i> PRIMJENA CRISPR/CAS9 TEHNOLOGIJE U TERAPIJI RAKA DOJKE.....	74-83
--	-------

<i>Amra Demirović, Alija Uzunović, Anisa Veledar-Hamalukić, Maida Šljivić Husejnović</i> UPOTREBA EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA U RAZVOJU I OPTIMIZACIJI METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE POD VISOKIM PRITISKOM (HPLC).....	84-104
--	--------

STRUČNI RADOVI/PROFESSIONAL PAPERS

<i>Enisa Redžić, Merima Ibišević, Maida Šljivić Husejnović</i> PROFESIONALNA OBOLJENJA U FARMACIJI	106-115
---	---------

<i>Amna Hasić, Alisa Karić, Amina Husejbašić, Inela Avdić, Selma Sejmenović, Ermina Cilović Kozarević, Merima Ibišević</i> ULOGA FARMACEUTA U TRETMANU ATOPIJSKOG DERMATITISA	116-124
---	---------

RIJEČ UREDNIKA

Dvanaesti simpozij magistara farmacije Tuzlanskog kantona još jednom je potvrdio opravdanost postojanja ove stručne manifestacije, okupljajući magistre farmacije, ljekare, istraživače, univerzitetske profesore i studente oko zajedničkog cilja, razmjene znanja, iskustava i najnovijih saznanja iz oblasti farmacije i biomedicine. Ovogodišnji program, bogat sadržajem i aktuelnim temama, izazvao je veliko interesovanje i pobudio živu stručnu diskusiju, na što smo izuzetno ponosni.

Poseban akcenat dvanaestog Simpozija stavljen je na tematiku koja na direktan način oslikava savremene izazove i trendove u zdravstvu i farmaceutskoj struci. Radovi u Zborniku obuhvataju raznovrsna istraživanja, od analize strukture propisanih lijekova kao indikatora zdravstvenog stanja populacije, do primjene in vitro modela za ispitivanje anti-SARS-CoV-2 aktivnosti prirodnih produkata. Također, značajan doprinos daju radovi koji se bave antioksidativnim potencijalom biljnih ekstrakata, sintezom i biološkom evaluacijom novih jedinjenja, ali i temama iz oblasti javnog zdravstva, poput kvaliteta zraka u dječjim vrtićima.

Pregledni radovi doprinose boljem razumijevanju potencijala prirodnih supstanci u terapiji određenih stanja, poput primjene ekstrakta kore ploda nara u tretmanu hiperpigmentacije, čime dodatno proširuju spektar korisnih informacija za sve koji se bave savremenom farmaceutskom praksom.

Kao i prethodnih godina, cilj Simpozija ostaje jasan, omogućiti magistrima farmacije kontinuirano usavršavanje, praćenje savremenih dostignuća i podsticanje međusobne saradnje kroz povezivanje naučnih istraživanja i praktične primjene.

Zahvaljujem se svim autorima na kvalitetnim radovima, recenzentima na posvećenom i stručnom radu, članovima uredništva i tehničkoj podršci koji su omogućili objavljivanje ovog Zbornika. Nadamo se da će sadržaj biti od koristi ne samo učesnicima Simpozija, već i široj stručnoj javnosti, te poslužiti kao inspiracija za buduće projekte i istraživanja.

Tuzla, oktobar 2025.

Dr.sci. Nahida Srabović, van. prof.

SAŽECI / ABSTRACTS

STRUKTURA PROPISANIH LIJEKOVA KAO ODRAZ ZDRAVSTVENOG STANJA POPULACIJE

Sandra Osmanbegović¹, Selma Azapagić¹, Tatjana Krdžalić¹

*¹Zavod za javno zdravstvo Tuzanskog kantona, Tuzlanskog odreda 6, 75000 Tuzla,
Bosna i Hercegovina*

SAŽETAK

Uvod: Zdravstveno stanje populacije je složen koncept koji obuhvata različite aspekte zdravlja. Struktura potrošnje lijekova je značajan pokazatelj prisustva određenih zdravstvenih problema u populaciji.

Cilj: Utvrditi povezanost između strukture propisanih lijekova po anatomsko-terapijsko-hemijskoj klasifikaciji (ATC) i zdravstvenog stanja opće populacije u Tuzlanskom kantonu.

Materijal i metode: Retrospektivna analiza baza podataka zdravstvene evidencije iz primarne zdravstvene zaštite i baze podataka o potrošnji lijekova sa esencijalne liste za period 2021-2023. godine primjenom deskriptivne statistike i metodom dedukcije.

Rezultati: U analiziranom periodu lijekovi koji djeluju na kardiovaskularni sistem (grupa C) su najčešće propisani sa kontinuiranim udjelom od 50% u strukturi propisanih recepata. Trend obolijevanja od kardiovaskularnih oboljenja prati strukturu propisanih lijekova, s obzirom da se nalazi na prvom mjestu među pet vodećih oboljenja u ukupnom morbiditetu. Ostale grupe oboljenja djelimično odražavaju propisanu strukturu lijekova što sugerise postojanje diverziteta u morbiditetu.

Zaključak: Struktura propisanih lijekova odražava samo dio zdravstvenog stanja populacije. Potrebno je uspostaviti standardiziranu metodologiju praćenja potrošnje kroz dnevno definisane doze koja omogućava realno sagledavanje potrošnje lijekova. Potrebno je kontinuirano unaprijeđivati kvalitet zdravstvene evidencije.

Ključne riječi: *Potrošnja lijekova, ATC, zdravstveno stanje, morbiditet, struktura lijekova.*

Autor za korespondenciju: Sandra Osmanbegović
Email: sandra.osmanbegovic@zjztk.ba

THE STRUCTURE OF PRESCRIBED MEDICATIONS AS A REFLECTION OF THE POPULATION'S HEALTH STATUS

Sandra Osmanbegović¹, Selma Azapagić¹, Tatjana Krdžalić¹

¹Institute of Public Health of Tuzla Canton, Tuzlanskog Odreda 6, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

ABSTRACT

Introduction: The health status of a population is a complex concept that encompasses various aspects of health. The structure of medication consumption is a significant indicator of the presence of certain health issues within the population.

Objective: To determine the relationship between the structure of prescribed medications based on the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification and the general population's health status in Tuzla Canton.

Materials and Methods: Retrospective analysis of healthcare records databases from primary healthcare and medication consumption databases from the essential medicines list for the period 2021-2023.

Results: During the analyzed period, medications acting on the cardiovascular system (group C) were the most commonly prescribed, consistently representing 50% of the prescribed medications structure. The trend of cardiovascular diseases corresponds with the prescribed medications structure, as they rank first among the top five diseases in overall morbidity. Other disease groups partially reflect the prescribed medications structure, suggesting the presence of diversity in morbidity.

Conclusion: The structure of prescribed medications reflects only a part of the population's health status. It is necessary to establish a standardized methodology for monitoring medication consumption through defined daily doses, enabling a realistic assessment of medication consumption. Continuous improvement of healthcare records quality is essential.

Keywords: *medications consumption, ATC, health status, morbidity, medication structure.*

Corresponding author: Sandra Osmanbegović

Email: sandra.osmanbegovic@zjztk.ba

USPOSTAVLJANJE *IN VITRO* MODELA ZA ISPITIVANJE ANTI-SARS-COV-2 AKTIVNOSTI PRIRODNIH PRODUKATA

Irma Gušić¹, Mahira Durić², Mustafa Mehić³, Emina Korić¹, Haris Nikšić¹

¹*Univerzitet u Sarajevu – Farmaceutski fakultet, Zmaja od Bosne 8, Sarajevo*

²*JU Zavod za zaštitu žena i materinstva KS, Josipa Vancaša 1, Sarajevo*

³*JU Dom zdravlja Novi Grad, Bulevar Meše Selimovića 2, Sarajevo*

SAŽETAK

Razvoj *in vitro* modela za ispitivanje anti-SARS-CoV-2 aktivnosti predstavlja ključni korak u evaluaciji antivirusnog potencijala prirodnih produkata.

Eksperimentalni rad na uspostavljanju *in vitro* modela za ispitivanje antivirusne aktivnosti prirodnih produkata obuhvatio je sljedeće faze: i) Uspostavljanje proliferacije VERO E6 ćelija u kultivacijskom mediju, subkulture i tehnike subkultivacije ćelijske linije. ii) Genomska karakterizacija izolata virusa SARS-CoV-2; iii) Inokulacija i propagacija virusa SARS-CoV-2 u kulturi ćelija; iv) Evaluacija citopatogenog učinka (CPE) virusa na odabranoj ćelijskoj kulturi; v) Potvrda uspješnosti virusne kulture utvrđivanjem vrijednosti ampfikacije Ct metodom real-time RT-PCR/qPCR.

Uspostavljena je uspješna proliferacija VERO E6 ćelija. Ćelije su epiteloidne, pljosnate, izduženog poligonalnog oblika, sa izraženom adhezivnošću na podlogu. Na osnovu genomske analize, virusni izolat svrstan je u lozu B.1.1.7 (Pango v.4.3.1 konsenzualna oznaka), koja se klasifikuje kao varijanta Alpha (B.1.1.7-like). Propagacija izolata virusa hCoV-19/Bosnia and Herzegovina/VFS-UNSA-LMGFI031/2021 (GISAID pristupni ID: EPI_ISL_1016969) u 90% konfluentnoj VERO E6 ćelijskoj kulturi praćena je morfološkim analizama ćelija. Analiza kulture pod invertnim optičkim mikroskopom pokazala je CPE u inficiranim VERO E6 ćelijama 72h nakon infekcije (hpi). CPE se manifestirao kroz morfološke promjene, uključujući zaobljavanje i odvajanje ćelija, formiranje sincitijuma, pojavu ćelijske fuzije kao i prisustvo ćelijskih inkluzija. Prisustvo novih, infektivnih virusnih čestica koje mogu inficirati okolne ćelije potvrđeno je analizom virusnog titra, kvantifikacijom virusne RNK u supernatantu ćelijske kulture. qRT-PCR test pokazao je porast broja kopija virusne RNK u supernatantu ćelijske linije u zavisnosti od vremena ekspozicije virusu. Razblaženje virusa, određeno na osnovu odgovarajuće Ct vrijednosti, koji će se koristiti kao inokulum, odabrano je s ciljem sprječavanja citopatogenog efekta izazvanog virusom u ćelijskoj kulturi tokom trajanja eksperimenta. Predloženi raspon vrijednosti Ct 'radnog virusa' 18-26 korelira sa klinički manifestnim COVID19 u ljudi.

Dobijeni rezultati potvrđuju uspješno uspostavljanje *in vitro* modela za ispitivanje anti-SARS-CoV-2 aktivnosti prirodnih produkata, čime je obezbijeđena pouzdana eksperimentalna osnova za daljnja istraživanja antivirusnog potencijala biološki aktivnih jedinjenja.

Ključne riječi: *Alpha varijanta SARS-CoV-2; in vitro model; VERO E6 ćelijska linija; CPE virusa u kulturi ćelija; real-time RT-PCR*

Autor za korespondenciju: Emina Korić, mr.ph.

E-mail: emina.koric@ffsa.unsa.ba

ESTABLISHMENT OF AN *IN VITRO* MODEL TO EVALUATE THE ANTI-SARS-COV-2 ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS

Irma Gušić¹, Mahira Durić², Mustafa Mehić³, Emina Korić¹, Haris Nikšić¹

¹*Univerzitet u Sarajevu – Farmaceutski fakultet, Zmaja od Bosne 8, Sarajevo*

²*JU Zavod za zaštitu žena i materinstva KS, Josipa Vancaša 1, Sarajevo*

³*JU Dom zdravlja Novi Grad, Bulevar Meše Selimovića 2, Sarajevo*

ABSTRACT

The development of an *in vitro* model to evaluate the anti-SARS-CoV-2 activity of natural products is a crucial step in assessing their antiviral potential.

The experimental workflow to establish this *in vitro* model comprised the following main phases: (i) Establishment of VERO E6 cell proliferation in a suitable culture medium, including subculturing techniques to maintain cell line viability; (ii) Genomic characterization of SARS-CoV-2 virus isolates; (iii) Inoculation and propagation of the SARS-CoV-2 virus in cell culture; (iv) Evaluation of the cytopathogenic effect (CPE) induced by the virus in the selected cell culture; (v) Confirmation of successful virus propagation by determination of the cycle threshold (Ct) value in amplification real-time RT-PCR/qPCR assays.

The propagation of VERO E6 cells in the selected culture medium was successful, with the cells exhibiting an epithelioid, flattened and elongated polygonal morphology. Genome analysis with Nextclade and Pangolin Lineage Classification Tools identified the virus isolate as belonging to the B.1.1.7 lineage (Pango v.4.3.1 consensus tag), which is classified as an alpha variant (B.1.1.7-like). Replication of the virus isolate hCoV-19/Bosnia and Herzegovina/VFS-UNSA-LMGFI031/2021 (GISAID accession ID: EPI_ISL_1016969) in a 90% confluent VERO E6 cell culture was monitored by morphological analysis. Observations under an inverted optical microscope revealed a cytopathic effect (CPE) in infected VERO E6 cells 72 hours post-infection (hpi). The CPE manifested as distinct morphological changes, including cell rounding, detachment, syncytium formation, cell fusion, and the presence of intracellular inclusions. The determination of the virus titer and the quantitative analysis of the virus RNA in the culture supernatant using qRT-PCR showed a time-dependent increase in the virus RNA copy number in the culture supernatant. To ensure optimal experimental conditions, the virus dilution used for inoculation was determined based on the corresponding Ct value to prevent excessive CPE during the experiment. The proposed Ct range for the 'working virus' (18–26) correlates with clinically manifest COVID-19 cases in humans.

These results confirm the successful establishment of an *in vitro* model for testing the anti-SARS-CoV-2 activity of natural products and provide an experimental basis for further investigations of the antiviral potential of biologically active compounds.

Keywords: *Alpha variant of SARS-CoV-2; in vitro model; VERO E6 cell line; cytopathic effect; qRT-PCR*

Corresponding author: Emina Korić, mr.ph.

E-mail: emina.koric@ffsa.unsa.ba

PRAVILNO FORMIRANJE ČAJNIH MJEŠAVINA

Regulativa i praksa: Formulacija čajnih mješavina u skladu sa smjernicama Evropske medicinske agencije i Evropske regulative biljnih i tradicionalnih biljnih lijekova

Haris Nikšić¹, Emina Korić¹

¹Katedra za farmakognoziju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Znmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

RADIONICA

Fitoterapija je naučna disciplina koja proučava i primjenjuje ljekovite biljne sirovine u svrhu očuvanja zdravlja, prevencije i liječenja različitih bolesti. Kao dio savremene medicine, fitoterapija se oslanja na naučne i medicinske dokaze, pri čemu čajne mješavine zauzimaju istaknuto mjesto kao jedan od najčešće korištenih farmaceutskih oblika. Čajna mješavina kao farmaceutski pripravak mora zadovoljiti principe dobre farmaceutske prakse u pogledu odabira, kvaliteta i formulacije ljekovitih biljnih sirovina kako bi postigla željeni terapijski učinak.

Radionica pruža praktična znanja i vještine za pravilnu pripremu čajnih mješavina u skladu sa smjernicama i regulativama Evropske medicinske agencije i Evropske regulative biljnih i tradicionalnih biljnih lijekova. Sakupljanje biljnog materijala za potrebe pripreme čajnih mješavina izvršeno je u skladu sa Smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije o dobrim poljoprivrednim praksama i praksama sakupljanja za ljekovito bilje (*engl. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*). Detaljna mikroskopska i makroskopska analiza biljnog materijala izvršena je u laboratoriju Katedre za farmakognoziju, uz primjenu standardnih farmakognostičkih metoda. Determinacija proučavanih biljnih taksona potvrđena je od strane prof. dr Haris Nikšić (Univerzitet u Sarajevu, Farmaceutski fakultet, Bosna i Hercegovina). Program radionice je fokusiran na kreiranje najčešće korištenih čajnih mješavina (*Species sedative, Species digestive, Species diuretica i Species pectorales*). Polaznici će tokom interaktivne radionice imati priliku da se upoznaju sa smjernicama pravilnog kreiranja čajnih mješavina, načinom odabira i broja biljnih ljekovitih vrsta koje ulaze u sastav određene mješavine i sami pravilno u skladu sa preporukama kreiraju ljekovite čajne mješavine za određene indikacije.

Što uključuje radionica?

- Osnovni principi kreiranja čajnih mješavina
- Smjernice za odabir i kombinaciju ljekovitih biljnih vrsta
- Vodič kroz proces kreiranja čajnih mješavina
- Samostalno kreiranje čajnih mješavina
- Materijali i sve potrebno za izradu

Polaznici nakon završene edukacije usvojiti znanja i vještine kako pravilno kreirati ljekovitu čajnu mješavinu, uz sposobnost kritičke analize i procjene efikasnosti komercijalno dostupnih čajnih mješavina dostupnih na tržištu.

Ključne riječi: *Species; Smjernice Evropske medicinske agencije, fitoterapija, tradicionalni biljni lijek.*

Autor za korespondenciju: Haris Nikšić, PhD,
E-mail: haris.niksic@ffsa.unsa.ba

CORRECT FORMULATION OF HERBAL TEA BLENDS

Rules and practices: Formulation of herbal tea blends in accordance with the guidelines of the European Medicines Agency and the European regulations on herbal and traditional herbal medicinal products

Haris Nikšić¹, Emina Korić¹

¹ *Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*

WORKSHOP

Phytotherapy is a scientific discipline that deals with the research and application of medicinal plant materials for the maintenance of health, prevention and treatment of various diseases. As part of modern medicine, phytotherapy is based on scientific and medical knowledge, with herbal tea mixtures occupying a prominent position as one of the most commonly used pharmaceutical forms. As a pharmaceutical preparation, a herbal tea blend must adhere to the principles of Good Pharmaceutical Practice with regard to the selection, quality and formulation of medicinal plant materials in order to achieve the desired therapeutic effect. The collection of plant material for the preparation of herbal tea mixtures was carried out in accordance with the *World Health Organization* (WHO) guidelines on *Good agricultural and collection practices* (GACP) for medicinal plants. Detailed microscopic and macroscopic analysis of the plant material was conducted in the laboratory of the Department of Pharmacognosy, using standard pharmacognostic methods. The identification of the studied plant taxa was confirmed by Prof. Dr. Haris Nikšić (University of Sarajevo, Faculty of Pharmacy, Bosnia and Herzegovina).

This workshop provides practical knowledge and skills for the correct preparation of herbal tea blends in accordance with the guidelines and regulations of the European Medicines Agency and the European regulations for herbal and traditional herbal medicinal products. The workshop program focuses on the preparation of the most commonly used herbal tea blends (*Species sedative, Species digestive, Species diuretics and Species pectorals*). Participants will have the opportunity to familiarize themselves with the guidelines for the proper preparation of herbal tea blends, the process of selecting and determining the number of medicinal plant species to be included in a given blend, and will independently prepare therapeutic herbal tea blends for specific indications by following the recommendations.

The workshop includes:

- Basic principles of formulating herbal tea blends
- Guidelines for the selection and combination of medicinal plant species

- A guide for the production of herbal tea blends
- Practical preparation of herbal tea blends
- Materials and all necessary items for preparation

Upon completion of the workshop, participants will have the knowledge and skills to properly prepare medicinal herbal tea blends and to critically analyze and evaluate the efficacy of herbal tea blends available on the market.

Keywords: *Species; European Medicines Agency guidelines, phytotherapy, traditional herbal medicine.*

Corresponding author: Haris Nikšić, PhD, Associated Professor
E-mail: haris.niksic@ffsa.unsa.ba

FIZIČKA AKTIVNOST I BMI KOD MLADIH – POLNE RAZLIKE**Azabagić Selma¹, Mokayes Nadina¹**

*¹Institut za javno zdravstvo Tuzlanskog kantona, Tuzlanskih Odreda 6, 75000 Tuzla,
Bosna i Hercegovina*

SAŽETAK

UVOD Nedovoljna tjelesna aktivnost je globalni zdravstveni izazov. Ova studija ima za cilj da uporedi nutritivni status i fizičku aktivnost mladih u Bosni i Hercegovini.

MATERIJALI I METODE Ova prospektivna studija presjeka je urađena putem međunarodnog IPAQ-SV upitnik (skraćena verzija) od 7 pitanja koja se koriste za procjenu fizičke aktivnosti u posljednjih 7 dana. Studija je sprovedena među učenicima VI, VII, VIII i IX razreda (dobi 11-15 godina) osnovne škole u Tuzli u septembru 2024. godine. Izbor ispitanika je zasnovan na dobrovoljnom anketiranju uz poštovanje anonimnosti svakog ispitanika. Provedena su osnovna antropometrijska mjerenja djece. Za izračunavanje indeksa tjelesne mase korištena je vaga i visinomjer.

REZULTATI Rezultati pokazuju da 177 (75%) ima normalnu tjelesnu masu, 79 (33,47%) dječaka: 98 (41,53%) djevojčica, 33 ispitanika (13,98%) ima prekomjernu tjelesnu masu 22 (9,32%) dječaka: 11 (4,66%) djevojčica, a 14 ispitanika je pretiilo. Postotak tjelesne aktivnosti veći je kod dječaka u odnosu na djevojčice (21,19% : 12,71%). Dječaci imaju viši indeks tjelesne mase u odnosu na djevojčice ($p = 0,001$) što potvrđuje činjenicu o anatomskim razlikama i razlikama u sastavu tijela obzirom na pol. Indeks tjelesne mase

ZAKLJUČAK Rezultati ukazuju na to da je učenicima potrebna edukacija o važnostima tjelesne aktivnosti i zdrave prehrane za ljudsko zdravlje. S obzirom da Bosna i Hercegovina nema zvanične rezultate o fizičkoj aktivnosti kod mladih, ovi podaci mogu poslužiti kao početni za promociju i prevenciju zdravlja, koje je uvijek jeftinije od liječenja.

Ključne riječi: fizička aktivnosti, učenici osnovne škole, zdravlje, pol

Autor za korespondenciju: Doc.dr.med.sci. Selma Azabagić
E-mail: selma.azabagic@zjztk.ba

PHYSICAL ACTIVITY AND BMI IN YOUNG PEOPLE – GENDER DIFFERENCES

Azabagić Selma¹, Mokayes Nadina¹

*¹Institute of Public Health of Tuzla Canton, Tuzlanskih Odreda 6, 75000 Tuzla,
Bosnia and Herzegovina*

ABSTRACT

INTRODUCTION Insufficient physical activity represents a global public health challenge. The aim of this study was to compare the nutritional status and levels of physical activity among young people in Bosnia and Herzegovina, with a focus on gender differences.

MATERIALS AND METHODS This prospective cross-sectional study was conducted using the International Physical Activity Questionnaire - Short Version (IPAQ-SV) which consists of 7 questions assessing physical activity over the last 7 days. The study sample included students carried out among students from 6th, 7th, 8th, and 9th grades (aged 11 to 15 years) from an elementary school in Tuzla in September 2024. Participation was voluntary and anonymous. Basic anthropometric measurements were performed and body mass index was calculated using scales and stadiometers.

RESULTS A total of 177 (75%) had a normal body weight, 79 boys (33.47%) and 98 girls (41.53%). Overweight was observed in 33 students 33 respondents (13.98%) - 22 boys (9.32%) and 11 girls, (4.66%) while 14 students were classified as obese. Boys demonstrated higher level of physical activity compared to girls (21.19% vs 12.71%). Additionally, boys have a significantly higher BMI compared to girls ($p = 0.001$) reflecting gender-related anatomical and body composition differences.

CONCLUSION The findings suggest that students require targeted education on the importance of physical activity and healthy nutrition for overall well-being. Given the lack of official data on physical activity level among young people in Bosnia and Herzegovina, these results can serve as a valuable baseline for future health promotion and prevention initiatives - which remain more cost-effective than treatment.

Keywords: physical activity, elementary school students, health, gender differences

Corresponding author: Selma Azabagić
E-mail: selma.azabagic@zjztk.ba

**IZVORNI ZNANSTVENI RADOVI/
ORIGINAL SCIENTIFIC PAPERS**

SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA DJELOVANJA TETRAKETONA

**Amra Džambić¹, Demir Bjelošević¹, Maida Šljivić-Husejnović¹, Merima Ibišević¹,
Aida Smajlagić², Merima, Salković³**

¹*Farmceutski fakultet Tuzla, Univerzitet u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla BiH.*

²*Odsjek hemija, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Tuzli,
Urfeta Vejzagića 4, 75000 Tuzla BiH*

³*Bosnalijek D.O.O. Sarajevo, BiH*

Originalni naučni rad

SAŽETAK

Tetraketonu su ciklični spojevi sintetisani iz benzaldehida i 5,5-dimetilcikloheksan-1,3-diona (dimedona) putem reakcije Knoevenagel-ove kondenzacije i Michael-ove adicije, sa ili bez primjene katalizatora. Savremena hemijska istraživanja se u novije vrijeme sve više usmjeravaju prema ekološki prihvatljivim principima zelene hemije. Cilj ovog rada je da se primjenom ovog koncepta sintetišu četiri nova derivata tetraketona. S obzirom da je poznato da su tetraketonu spojevi širokog i raznolikog spektra biološke aktivnosti u okviru ovog rada provedena su istraživanja u cilju određivanja veze strukture sa biološkom aktivnošću novosintetisanih tetraketona. Primjenom savremenih instrumentalnih spektroskopskih metoda analize potvrđene su strukture novosintetisanih spojeva.

Tetraketonu pokazuju snažan antioksidativni potencijal. Dvije najčešće korištene metode ispitivanja antioksidativne aktivnosti, DPPH i FRAP metoda, primjenjene su u ovom radu. Svi sintetisani spojevi djeluju kao antioksidansi. Spoj **2**, vrijednosti IC₅₀ 0.87 mmol/L i FRAP 403 μmol/L, sa atomom fluora na fenilnom prstenu u položaju C2 je pokazao jaču antioksidativnu aktivnost u poređenju sa spojem **1** koji ima atom fluora u položaju C3. Spoj **3** koji ima acetamido grupu u para položaju je pokazao jaču sposobnost redukcije u odnosu na ostale sintetisane spojeve, FRAP vrijednost je iznosila 659,5 μmol/L. Rezultati *in vitro* ispitivanja aktivnosti prema enzimu tirozinazi su pokazali da je spoj **3** pokazao da ima slabo inhibitorno djelovanje. Na osnovu dobijenih rezultata možemo utvrditi da derivati tetraketona imaju veliki značaj jer djeluju kao antioksidansi i inhibitori enzima tirozinaze.

Ključne riječi: *Tetraketonu, cikloheksen-1-on, sinteza, antioksidansi, inhibitori tirozinaze*

Autor za korespondenciju: Amra Džambić, PhD, asistent profesor
Email: amra.dzambic@untz.ba

SYNTHESIS, STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF TETRAKETONES

Amra Džambić¹, Demir Bjelošević¹, Maida Šljivić-Husejnović¹, Merima Ibišević¹,
Aida Smajlagić², Merima, Salković³

¹*Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla BiH.*

²*Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Tuzla,
Urfeta Vejzagića 4, 75000 Tuzla BiH*

³*Bosnalijek D.O.O. Sarajevo, BiH*

Original scientific article

ABSTRACT

Tetraketones are cyclic compounds synthesised from benzaldehydes and 5,5-dimethyl-cyclohexane-1,3-dione (dimedone) by Knoevenagel condensation and Michael's addition reactions with or without catalyst. Modern chemical research are nowadays increasingly directed towards environmentally friendly principles of green chemistry. The aim of this study was to synthesise four new tetraketone derivatives using this concept. Tetraketones are known to be compounds of a wide and diverse spectrum of biological activity. This research was conducted in order to determine structure-activity relationship of newly synthesised tetraketones. The structures of newly synthesised compounds were confirmed by modern instrumental spectroscopic analytical methods.

Tetraketones show strong antioxidant potential and inhibition of enzyme tyrosinase. The most commonly used methods for antioxidant activity testing, the DPPH and FRAP methods, were used in this research. Compound 2 with IC₅₀ values of 0.87 mmol/L and FRAP 403 µmol/L bearing fluoro substituent on the phenyl ring at position C2, showed to be the strong antioxidant than compound 1 with fluoro substituent on the phenyl ring at position C3. Compound 3 with acetamido group in para position showed stronger reduction ability than others, FRAP value is 659,5 µmol/L. The results of *in vitro* testing inhibitory activity showed that compound 3 showed low activity of the enzyme inhibition. Obtained results implicate the importance of tetraketone derivatives as antioxidant and tyrosinase inhibitors.

Keywords: *Tetraketones, cyclohexen-1-one, synthesis, antioxidants, tyrosinase inhibitors*

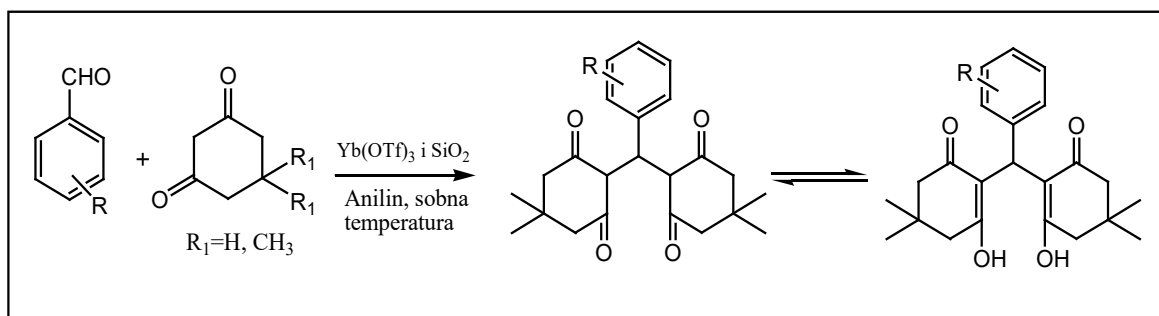
Corresponding author: Amra Džambić, PhD, assistant professor
Email: amra.dzambic@untz.ba

1. UVOD

Arilmetilen *bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivati su u literaturi opće poznati kao tetraketoni, a koriste se kao prekursori za sintezu velikog broja prirodnih proizvoda (Dewan i sar., 2016), kao i organskih heterocikličnih spojeva kao što su tioksanteni, benzopirani i akridindioni (Khurana i Vij, 2012). Ksantendioni se formiraju kao produkti ciklizacije enolnog oblika tetraketona i nastaju reakcijom nukleofilne adicije hidroksilne grupe na dvostrukoj vezi cikloheksena (Zukić i sar., 2018). Sintetisani spojevi imaju širok spektar primjene, mogu se koristiti u laserskoj tehnologiji, za izradu boja te kao fluorescentni materijali za vizuelizaciju biomolekula (Djandé i sar., 2011). U pionirskom radu Merlinga (Merling, 1894), koji je sintetisao cikloheksan-1,3-dion iz rezorcinola, 1894. godine prvi put su opisani tetraketoni sintetisani reakcijom aldehida sa cikloheksan-1,3-dionom ili dimedonom (5,5-dimetil-cikloheksan-1,3-dion). Tetraketoni se nalaze kao dienolni tautomeri što su 1969. godine pomoću nuklearne magnetne rezonance (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) utvrdili Forsen i saradnici (Forsen i sar. 1969).

Tetraketoni općenito se sintetišu iz (aromatskih i heterocikličkih) aldehida i 5,5-dimetilcikloheksan-1,3-diona (dimedona) reakcijom Knoevenagel-ove kondenzacije i Michael-ove adicije, sa ili bez primjene katalizatora. U literaturi je opisan veliki broj metoda za sintezu tetraketona u kojima su korišteni različiti katalizatori, rastvarači kao i uslovi reakcija (Ferreira i Figueroa-Villar 2014). U današnje vrijeme sve više se u sintezi biološki aktivnih molekula, pa tako i tetraketona, primjenjuju koncepti zelene hemije čime se izbjegava upotreba lako isparljivih organskih rastvarača koji mogu imati štetne efekte po ljudsko zdravlje i okoliš, a uz to su i toksični (Anastas i Warner 1998; Saleh i Koller 2018; Da Silva i sur., 2018).

U literaturi je opisana jednostavna sinteza tetraketona iz dimedona, aromatskih aldehida i anilina uz primjenu katalizatora Ytterbij-triflata $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ i silika gela na sobnoj temperaturi. Kao katalizatori se mogu koristiti različiti metalni triflati, ali je utvrđeno da Yterbij u kombinaciji sa silikagelom daje najveći prinos od oko 81%, a osim toga skraćeno je vrijeme trajanja reakcije na 2 minute (Slika 1). (Rao i sar., 2011)

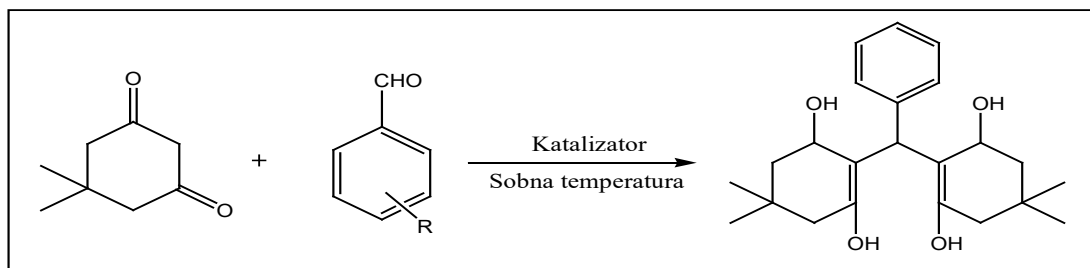


Slika 1. Sinteza arilmetilen *bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivata uz prisustvo anilina i silika gela, (Rao i sar., 2011)

U studiji koju su proveli Azizi i saradnici opisana je hemoselektivna sinteza tetraketona i ksantendiona iz smjese aromatskih aldehida i dimedona u omjeru 1:2, uz prisustvo različitih rastvarača. Kao rastvarač je korištena eutektička smjesa koja se sastoji uglavnom iz spojeva koji djeluju kao donori vodonika (urea, karboksilne kiseline i Luis-ove kiseline) i kvaternih amonijevih soli kao što je holin

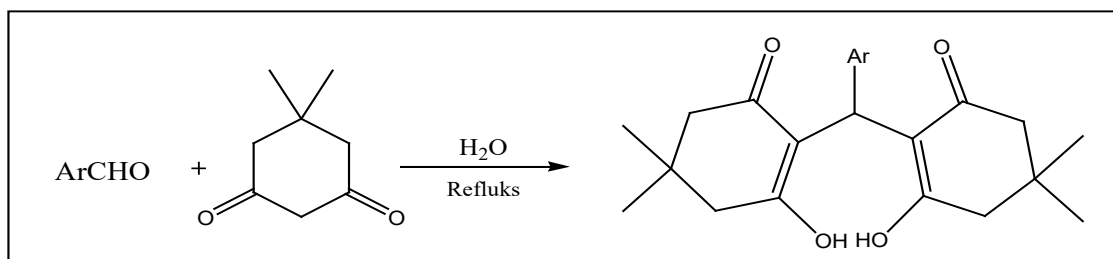
hlorid. Prednosti eutektičkih rastavarača u odnosu na standardne su stabilnost, biorazgradivost, te mogućnost prilagođavanja rastvarača širem području primjene. Reakcija se odvijala na temperaturi 80°C i trajanju minimalno 2 sata. Prilikom sinteze tetraketona najbolji prinos od 92% je dala eutektička smjesa holin hlorida i uree, dok je za sintezu ksantendiona najbolji prinos od 88% dala eutektička smjesa holin hlorida i ZnCl_2 (Azizi i sar., 2013).

U literaturi je opisana jednostavna metoda sinteze tetraketona (Slika 2), koja se temelji na principima zelene hemije vrlo često se koriste eutektički rastvarači, ne koristi se zagrijavanje već primjena mikrotalasnog zračenja. Sinteza tetraketona se odvija u vodenoj sredini, na sobnoj temperaturi uz primjenu odabrane kombinacije kazalizatora kao što su natrijum bikarbonat, magnezijum slufat, natrijum hlorid, natrijum lauril sulfat, polietilen glikol (PEG) i glinica (dehidratisani aluminij-oksidi). Kao najbolji katalizator se pokazala kombinacija natrijum sulfata sa PEG i glinicom, gdje su zabilježeni i najveći prinosi sinteze. Opisana je sinteza tetraketona pod istim uslovima uz korištenje katalizatora benzil trietilamonijum hlorid (TEBAC) sa prinosom reakcije oko 91% (Dewan i Bajwan, 2014).



Slika 2. Sinteza tetraketona na sobnoj temperaturi, uz prisustvo kombinacije katalizatora (Dewan i sar., 2016; Dewan i Bajwan, 2014)

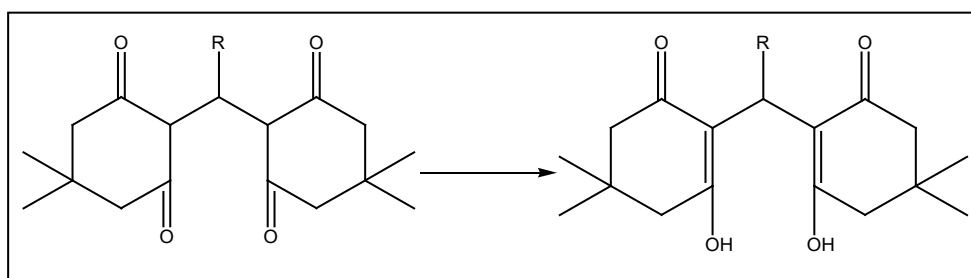
Opisana je jednostavna i ekološka metoda sinteze arilmetilen *bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivata, reakcijom Knoevenagelove kondenzacije i Michaleove adicije iz 5,5-dimetilcikloheksan-1,3-diona i aromatskih aldehida (Slika 3). Reakcija se odvijala na temperaturi ključanja, u vodenoj sredini bez prisustva katalizatora u trajanju od 13 minuta. Utvrđeno je da najbolji prinos sinteze od 92% zablježen pri navedenim uslovima reakcije (Sheikhhosseini i Faryabi, 2016).



Slika 3. Sinteza arilmetilen *bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivata u vodi bez prisustva katalizatora (Sheikhhosseini i Faryabi, 2016)

Prema literaturnim podacima derivati arilmetilen *bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) su u čvrstom agregatnom stanju, zastupljeni su kao kristali ili prah žute i bijele boje (Dewan i sar. 2016; Sheikhhosseini i Faryabi, 2016).

U literaturnim podacima je navedeno da se tačka topljenja derivata tetraketona kreće u rasponu 140-235°C, te da ovisi od vrste i položaja supstituenata na fenilnome prstenu (Kazemi-Rad i sar., 2015; Ashtarian i sar., 2019). Tetraketoni prema literaturnim podacima se nalaze u obliku keto-enolnih tautomera a koji su međusobno u ravnoteži, pri čemu je dominantan enolni oblik tautomera slika 4. (Thakur i Sohal 2020). Stabilnost određenog tautomera ovisi od prirode otapala kao i od supstituenata vezanih za fenilni prsten. Takođe uvođenje supstituenta u *orto* položaj na benzenovom prstenu uzrokuje konformacijsku izmjenu što dovodi do gubitka jedne intramolekularne vodonikove veze (Ferrera i Figueroa-Villar 2014).



Slika 4. Tautomerni oblici tetraketona (Thakur i Sohal 2020)

Obzirom da imaju širok spektar bioloških aktivnosti (Sheikhhosseini i Faryabi, 2016), tetraketoni se u posljednje vrijeme mnogo više sintetišu i ispituju, sa ciljem istraživanja i utvrđivanja mehanizama njihove biološke aktivnosti.

1.1. Biološka djelovanja tetraketona

Sintetski antioksidansi, butilovani hidroksianizol (BHA) i butilovani hidroksitoluen (BHT), koji se koriste u prehrambenoj industriji, su pokazali neželjene efekte, ispitivanjima na životinjama je utvrđeno da imaju toksične efekte na jetru, bubrege i žuč, takođe su pokazali kancerogeno djelovanje te se ubrajaju u endokrine disruptore. Stoga je od velikog interesa za farmaceutsku i prehrambenu industriju razvoj novih, sigurnih i djelotvornih antioksidanasa (Williams i sar., 1990). Literaturni podaci su pokazali da tetraketoni imaju značajnu antioksidativnu aktivnost (Džambić i sar., 2019; Maharvi i sar., 2008; Iqbal i sar., 2007) uz visok procenat inhibicije DPPH radikala kao i sposobnost redukcije (Thakur i Sohal 2013). Pretpostavljeni mehanizam njihovog djelovanja zasniva se na prekidu lančanih reakcija slobodnih radikala, te se mogu svrstati u sintetske neenzimske antioksidanse. Procenat inhibicije DPPH radikala (IC_{50}) kao i sposobnost redukcije za pojedine derivate je različita te direktno ovisi od vrste supstituenata koji su vezani na fenilnom prstenu. Na osnovu toga se može utvrditi da postoji veza odnosa strukture i djelovanja derivata tetraketona (Džambić i sar., 2020). U nekoliko računarskih studija je utvrđeno da na antioksidativnu aktivnost utiče vrsta supstituenata, ukoliko su u strukturi prisutne elektron donorske grupe, spojevi djeluju kao jači antioksidansi. Ukoliko su supstituenti elektron akceptorske grupe spojevi djeluju kao slabiji antioksidansi (Lee i sar., 2020; Wang i sar., 2019). Literaturni podaci govore da su tetraketoni i njihovi derivati pokazali aktivnost prema enzimima tirozinaza (Khan i sar., 2006), lipooksigenaza (Khan i sar., 2007) i protein kinaza (Alchab i sar., 2015). Utvrđeno je da prema enzinu tirozinaza imaju inhibitornu aktivnost (Shafiu i sar., 2017), a procenat inhibicije za pojedine tetraketone je različit i direktno ovisi od supstituenata vezanih na fenilni prsten (Khan i sar., 2006). Tetraketoni se u visokom prinosu na sobnoj temperaturi

mogu spontano ciklizirati u ksantendione, a na osnovu rezultata je utvrđeno da formirani ksantendioni djeluju kao aktivatori enzima tirozinaze (Ferreira i Figueroa-Villar 2015).

Zbog svojih aktivnosti tirozinaza ima široku primjenu u medicini, farmaciji i različitim granama industrije (Mayer 2006). U farmaceutskoj industriji učestvuje u biosintezi *o*-difenola, kao što je L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin), lijeka koji se koristi u liječenju Parkinsonove bolesti. Tirozinaza predstavlja i jedan od tumor markera koji se ispituju kod pacijenata s melanomom (Dos-Santos i sar., 2013). Brojni literaturni podaci govore da se tetraketoni kao i njihovi derivati ubrajaju u sintetske inhibitore enzima tirozinaze (Lee i sar., 2016). Eksperimentalno je utvrđeno da tetraketonski kostur zbog prisustva keto grupa ima inhibitornu aktivnost prema enzimu tirozinazi i stupa u interakciju sa atomom bakra u aktivnom centru enzima (Masum i sar., 2019).

Cilj rada je sinteza 4 nova tetraketona, njihova karakterizacija primjenom analitičkih metoda te da ispitivanje biološke aktivnosti novosintetisanih spojeva.

2. MATERIJAL I METODE

Hemikalije i reagensi

Sve hemikalije koje su korištene u sintezi arilmetilen *bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) spojeva su od proizvođača Merck-a (Darmstadt, Njemačka) i Sigma Aldrich (Missouri, SAD). U analizama su korištene hemikalije, reagensi i standardi visokog stepena čistoće. Za pripremu razblaženja smo koristili dvostruko destilovanu vodu.

Opšti postupak sinteze tetraketona

Sinteza tetraketona se odvijala po mehanizmu Knoevenlegove kondenzacije i Michaelove adicije iz 5,5-dimetilcikloheksan-1,3-diona i različitih aromatskih benzaldehida, kao katalizator je korišten diazabiciklo(2.2.2)oktan. Za sintezu tetraketona 2 mmol 5,5-dimetilcikloheksan-1,3-diona i 1 mmol aromatskog benzaldehida se otopi u 20 mL destilovane vode, smjesi se doda 10 mmol% diazabiciklo(2.2.2)oktana. Smjesa se refluksira na temperaturi ključanja vode 100 °C 30 minuta. Nakon završene sinteze smjesa u balonu se hladi na sobnoj temperaturi da se izluče kristali, nakon toga smjesa se filtrira. Nastali kristali se isperu s destilovanom vodom te se vrši prekrizalizacija iz 96% etanola (Paliwal i sar., 2013).

Analitičke metode potvrde sastava sintetisanih spojeva

Tačka topljenja za novosintetisane spojeve je određena na aparatu Kruss Melting point KSP I metodom kapilare prema Ph. Eur. 8.2.1.4. IC spektri sintetisanih spojeva su snimljeni primjenom uređaja: Nicolet iS10 FTIR Spektrofotometar, ATR metodom u području talasnih dužina od 4000 do 650 cm⁻¹. Elementarna analiza spojeva je provedena na uređaju: ELEMENTAR (C,H,N,S,O) VARIO EL III. Kao standard je korišten acetanilid. ¹H-NMR i ¹³C-NMR spektri za sintetisane spojeve su snimljeni na aparatu Bruker Avance III 500 (500 MHz za ¹H; 125 MHz za ¹³C), u deuteriziranom acetonu, koristeći TMS (tetrametilsilicijum) kao referentni standard.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti sintetisanih spojeva

DPPH metoda

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti sa 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikalom je izvedeno po metodi koju je opisao Benvenuti (Benvenuti i sar., 2004). Ispitivani spojevi su pripremljeni u različitim koncentracijama (2-5 mM) otapanjem u dimetilsulfoksidu (DMSO), zatim je za svaki uzorak pojedinačno napravljena serija razblaženja za pripremu kalibracione krive. Određenu zapreminu uzorka (10-100 µL) dopuniti metanolom do 2 mL zatim tom rastvoru dodati 0,5 mL 0,5 mM rastvora DPPH u etanolu. Smjesu snažno promućkati i inkubirati 30 minuta na tamnom mjestu na temperaturi od 25°C. Apsorbancu izmjeriti na 517 nm uz metanol kao slijepu probu. Kao kontrola korišten je 1 mL 0,5 mM rastvor DPPH razblažen sa 4 mL metanola.

Efekat uklanjanja ili procenat inhibicije DPPH radikala je izračunat prema jednačini:

$$\% \text{ inhibicije} = (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}) / A_{\text{kontrola}} \times 100$$

Pri čemu je: A_{uzorka} apsorbancu otopine koju ima uzorak na talasnoj dužini od 517 nm, dok je A_{kontrola} apsorbancu otopine DPPH.

Rezultati su prikazani kao IC_{50} vrijednost (mM) ili koncentracija uzorka koja je uzrokovala 50% neutralizaciju DPPH radikala.

FRAP metoda

Određivanje sposobnosti redukcije željeza (FRAP) je provedeno metodom koju je opisao Jiménez-Aspee (Jiménez-Aspee i sar. 2014). Standardni rastvor $FeSO_4 \times 7H_2O$ je pripremljen u rasponu koncentracija od 100 do 1000 µM ($y = 0.001x + 0.061$; $R^2 = 0.999$) i služi za pripremu kalibracione krive. U pet epruveta odmjeriti 3 mL FRAP reagensa i dodati 0,1 mL standardnih rastvora (200-1000 µM). Apsorbancu izmjeriti u odnosu na slijepu probu, a kao slijepa proba korištena je otopina 3 mL FRAP reagensa i 0,1 mL vode. Ispitivani spojevi su pripremljeni u različitim koncentracijama (2-5 mM) otapanjem u DMSO. Za svaki uzorak je pripremljena serija razblaženja, u epruvete otpipetirati 100 µL, 50 µL, 25 µL i 10 µL pripremljenog rastvora i dopuniti do 100 µL sa rastvaračem DMSO. U svaku epruvetu dodati po 0,1 mL pripremljenih ispitivanih rastvora i 3 mL FRAP reagensa, uzorke inkubirati u vodenom kupatilu 30 minuta na temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije izmjeriti apsorbancu na 593 nm. Kao slijepa proba je korištena otopina 3 mL FRAP reagensa i 0,1 mL rastvarača DMSO. Za sve rastvore ispitivanih spojeva izračunata je FRAP vrijednost na koncentraciju 3 mM.

Ispitivanje enzimske aktivnosti sintetisanih spojeva

In vitro ispitivanje aktivnosti enzima tirozinaze provedeno je metodama koju su opisali Ferreira (Ferreira i sar., 2015) i Wijaya (Wijaya i sar., 2018). Aktivnost enzima je ispitana u mikrotitar pločama, prilikom čega je praćeno stvaranje dopahroma na talasnoj dužini od 492 nm uz pomoć čitača mikrotitar ploča. Sintetisani spojevi su pripremljeni otapanjem u organskom otapalu, stock otopine su pripremljene otapanjem radnih otopina. Kao organsko otapalo je korišten je DMSO. Obzirom da koncentracija DMSO-a u uzorcima ne smije biti veća od 1,25 %, radne otopine uzoraka

su pripremljene mješanjem stock otopine i fosfatnog pufera. Ispitivanje je izvedeno u mikrotitar pločama sa 96 bunarića, gdje se u svaki bunarić doda 40 μL uzorka, 80 μL fosfatnog pufera (0,1 M pH=6.8), 40 μL enzima tirozinaze i 40 μL supstrata L-tirozina da bi se postigao ukupni konačni volumen u bunarićima od 200 μL . Konačne koncentracije u finalnom volumenu reakcione smjese iznosile su 512 μM ili manje za ispitivanu supstancu; 0,1 mM koncentracija supstrata i 35 U/mL enzima. Reakcijska smjesa se inkubira 10 minuta na temperaturi 25°C, nakon čega se doda L-tirozin i vrši se mjerenje na talasnoj dužini od 492 nm svakih 60 sekundi u periodu od 30 minuta. Svi ispitivani uzorci sintetisanih spojeva su rađeni u triplikatu. Za svaki uzorak je pripremljena i slijepa proba koja je sadržavala sve komponente, osim enzima tirozinaze. Kojična kiselina (90 μM) je korištena kao pozitivna proba.

Rezultati su upoređeni sa kontrolom koja je sadržavala 1,25% DMSO umjesto uzorka ispitivane supstance.

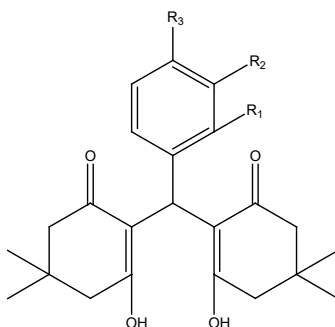
Procenat inhibicije enzima tirozinaze je izračunat prema jednačini:

$$\% \text{ inhibicije tirozinaze} = (A - B) - (C - D) / (A - B) \times 100$$

Pri čemu je: A - apsorbanca slijepe probe sa enzimom; B - apsorbanca slijepe probe bez enzima, C - apsorbanca uzorka sa enzimom, D - apsorbanca uzorka bez enzima.

3. REZULTATI

Rezultati sinteze, potvrde strukture i sastava sintetisanih spojeva



Slika 5. *Struktura sintetisanih tetraketona*

Tabela 1. *Prikaz supstituenata na fenilnom prstenu sintetisanih tetraketona*

Spoj	R1	R2	R3
1.	H	F	H
2.	F	H	H
3.	H	H	NHCOCH ₃
4.	H	H	Br

Spoj 1. 2,2'-(3''-fluorofenil)-metilen bis(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) – Iskorištenje 99,91%, $T_f=183-184,7$ °C. IR: 2961 (Ar-H), 2872 (CH alif.), 1690 (C=O), 1580 i 1483 (C=C), 1438 (C=O), 1371 (C-O), 1248 (–OH grupe), 1137 (C-F). ^1H NMR (δ/ppm): 1.14 (b 12H, CH_3); 2.04 (s, 4H, CH_2); 2.40 (b, 4H, CH_2); 5.50 (s, 1H, CH); 6.86 (d, 1H, Ar-H); 6.98 (d, 1H, Ar-H), 6.91 i 7.29 (m, 2H, Ar-H); 12.02 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (δ/ppm): 28.4 (CH_3 C_5 i C_5'); 32.3 (C_5 i C_5'), 33.5 (C_7); 47.2 (C_4 , C_4' i C_6 , C_6'); 115.8 (C_2 i C_2'); 113.1, 114.4, 123.7, 130.6 i 142.9 (Ar-CH); 163.8 (Ar-C); 190.6 (C_1 , C_1' i C_3 , C_3'). Rezultati elementalne analize: $\%C_{\text{rač}}$ 71.48; $\%H_{\text{rač}}$ 7.04; $\%C_{\text{nad}}$ 71.26; $\%H_{\text{nad}}$ 6.80;

Spoj 2. 2,2'-(2''-fluorofenil)-metilen bis(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) - Iskorištenje 39,73%, $T_f=168,1-169,5$ °C. IR: 3406 (C–OH), 2957 (Ar-H), 2873 (CH alif.), 1720 (C=O), 1608 i 1488 (C=C), 1454 (C=O), 1385 (C-O), 1228 (–OH), 1140 (C-F). ^1H NMR (δ/ppm): 1.12 (b, 12H, CH_3); 2.09 (s, 4H, CH_2); 2.38 (b, 4H, CH_2); 5.56 (s, 1H, CH); 6.86 (d, 1H, Ar-H); 7.00, 7.08, 7.09 i 7.21 (m, 4H, Ar-H); 12.02 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (δ/ppm): 28.3 (CH_3 grupe na C_5 i C_5'); 29.4 (C_7); 32.1 (C_5 i C_5'), 47.1 (C_4 , C_4' i C_6 , C_6'); 116.1 (C_2 i C_2'); 116.2, 124.5, 127.0, 127.7 i 128.8 (Ar-CH); 161.9 (Ar-C); 189.8 (C_1 , C_1' i C_3 , C_3'). Rezultati elementalne analize: $\%C_{\text{rač}}$ 71.48; $\%H_{\text{rač}}$ 7.04; $\%C_{\text{nad}}$ 71.01; $\%H_{\text{nad}}$ 7.00.

Spoj 3. 2,2'-(4''-acetamidofenil)-metilen bis(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) - Iskorištenje 98,13%, $T_f=155-159,5$ °C. IR: 3466 (Ar-NH), 3075 (Ar-H), 2966 i 2931 (CH alif.), 1665 (C=O), 1645 (HN-C=O), 1587 i 1543 (C=C), 1445 (C=O), 1403 (C-N) 1370 (C-O), 1157 (–OH). ^1H NMR (δ/ppm): 1.14 (s, 12H, CH_3); 2.04 (s, 3H, CH_3); 2.40 (s, 4H, CH_2), 5.46 (s, 1H, CH); 7.04 (d, 2H, Ar-H), 7.52 (d, 2H, Ar-H); 9.15 (s, 1H, NH); 11.92 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (δ/ppm): 24.7 (CH_3 amidska grupa); 28.9 (CH_3 grupe na C_5 i C_5'); 32.7 (C_5 i C_5'), 33.6 (C_7); 47.7 (C_4 , C_4' i C_6 i C_6'); 116.7 (C_2 i C_2'); 120.0 i 128.4 (Ar-CH); 134.5 i 138.7 (Ar-C); 169.2 (NHCOCH_3); 190.9 (C_1 , C_1' i C_3 , C_3'). Rezultati elementalne analize: $\%C_{\text{rač}}$ 70.56; $\%H_{\text{rač}}$ 7.34; $\%N_{\text{rač}}$ 3.29; $\%C_{\text{nad}}$ 70.07; $\%H_{\text{nad}}$ 7.01; $\%N_{\text{nad}}$ 3.03.

Spoj 4. 2,2'-(4''-bromfenil)-metilen bis(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) - Iskorištenje 44,53%, $T_f=159-163$ °C. IR: 3000 (Ar-H), 2925 i 2877 (CH alif.), 1733 (C=O), 1580 (C=C), 1466 (C=O), 1367 (C-O), 1158 (–OH), 751 (C-Br). ^1H NMR (δ/ppm): 1.14 (s, 12H, CH_3); 2.10 (s, 4H, CH_2); 2.42 (s, 4H, CH_2); 5.46 (s, 1H, CH); 7.09 i 7.42 (dd, 4H, Ar-H); 11.75 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (δ/ppm): 28.5 (CH_3 C_5 i C_5'); 32.3 (C_5 i C_5'); 33.4 (C_7); 47.2 (C_4 , C_4' i C_6 , C_6'); 115.8 (C_2 i C_2'); 119.8, 139.3 (Ar-C); 130.0, 132.0 (Ar-CH); 190.6 (C_1 , C_1' i C_3 , C_3'). Rezultati elementalne analize: $\%C_{\text{rač}}$ 61.75; $\%H_{\text{rač}}$ 6.08; $\%C_{\text{nad}}$ 61.43; $\%H_{\text{nad}}$ 5.89;

2.1. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metoda

U tabeli 2. su prikazani rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti sintetisanih spojeva primjenom DPPH metode i rezultati ispitivanja redukcijske sposobnosti sintetisanih spojeva analiziranih FRAP metodom.

Tabela 2. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti primjenom DPPH metode i redukcijske sposobnosti analizirani FRAP metodom

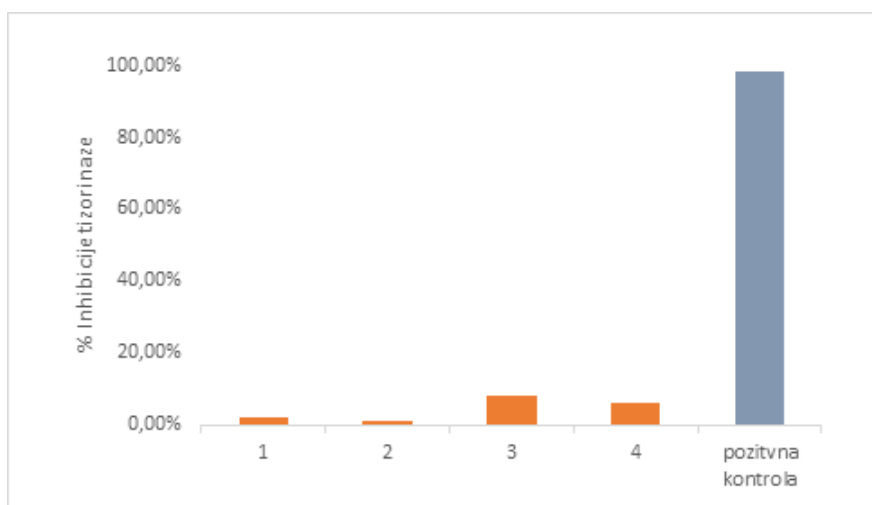
Broj spoja	DPPH vrijednost IC_{50} [mM]	FRAP vrijednost [$\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$]
S ₁	2,04	336,2
S ₂	0,87	403,6
S ₃	1,28	659,5
S ₄	1,86	462,3

Rezultati in vitro ispitivanja aktivnosti sintetisanih spojeva prema enzimu tirozinazi

In vitro ispitivanje aktivnosti prema enzimu tirozinazi za sintetisane spojeve je provedeno metodama koje su opisali Ferreira (Ferreira i sar., 2015) i Wijaya (Wijaya i sar., 2018), za ispitivanje je korištena tirozinaza izolovana iz gljive 25 KU (Sigma Aldrich). Rezultati *in vitro* ispitivanja spojeva su prikazani kao procenat inhibicije u ovisnosti od koncentracije ispitivanih spojeva (μM). Koncentracija ispitivanih tetraktona je iznosila $512 \mu\text{M}$ kao pozitivnu kontrolu smo koristili kojičnu kiselinu koja je inhibitor enzima. Rezultati ispitivanja inhibitorne aktivnosti prema enzimu tirozinaza dati su u tabeli 3 i na grafiku 1.

Tabela 3. Procenat inhibicije enzima tirozinaze sintetisanim tetraketonima.

Spoj	Procenat inhibicije enzima tirozinaze	Spoj	Procenat inhibicije enzima tirozinaze
1	2,03%	3	7,97%
2	1,16%	4	6,10%
		pozitivna kontrola	98,34%



Grafik 1. Procenat inhibicije enzima tirozinaze sa sintetisanim tetraketonim pri koncentraciji od $512 \mu\text{M}$.

3. DISKUSIJA

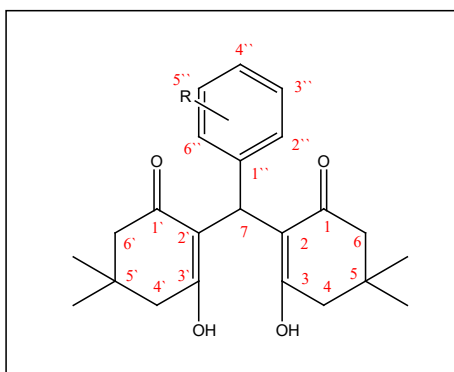
U reakciji 5,5-dimetilcikloheksan-1,3-diona i različitih aromatskih benzaldehida sintetisana su četiri aril metilen *bis* (3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivata. U literaturi je opisana sinteza ksantendiona po ovoj proceduri, gdje su korišteni heteroaril benzaldehidi, skraćivanjem vremena refluksa formiraju se željeni tetraktonske derivati (Paliwal i sar. 2013). Kao katalizator u reakciji je korišten diazabicyklo(2.2.2.) oktan (DABCO). U prvom koraku sinteze dešava se kondenzacija 5,5-dimetilcikloheksan-1,3-diona i odgovarajućeg benzaldenida. Zatim se nakon dehidratacije i

Michaelove adicije nastaju derivati tetraketona, koji keto-enolnom tautomerijom prelaze u aril metilen *bis* (3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivate.

Kao što se vidi iz rezultata elementarni sastav sintetisanih spojeva je potvrđen C, H, N analizom. Za sve spojeve je izračunat procentualni sadržaj karbona, hidrogena i nitrogena koji ulaze u strukturu spoja. Računski dobivene vrijednosti su upoređivane sa vrijednostima dobivenim eksperimentalno i utvrđeno je da se vrijednosti podudaraju, tj. da odstupaju od računskih u dozvoljenoj granici ($\pm 0,5$) čime je potvrđen molekularni sastav sintetisanih spojeva.

Na IR spektrima sintetisanih aril metilen *bis* (3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivata mogu se vidjeti vrpce koje su karakteristične za tetraketonske spojeve. Tako se na svim spektrima uočavaju apsorpcione vrpce između $3100\text{--}2960\text{ cm}^{-1}$ koje potiču od aromatskih hidrogena, na $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ se uočavaju vrpce koje potiču od alifatskih CH grupa, na $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ su prisutne apsorpcione vrpce koje potiču od keto grupe $\text{C}=\text{O}$. Takođe, na svim IR spektrima su uočljive vrpce na 1600 cm^{-1} i na 1450 cm^{-1} koje su karakteristične za $\text{C}=\text{C}$ vezu aromata, na 1300 cm^{-1} su prisutne vrpce karakteristične za C-O istezanje, te deformacione vibracije --OH grupe na 1200 cm^{-1} . IR spektri sintetisanih spojeva se razlikuju po apsorpcionim vrpcama koje potiču od odgovarajućeg supstituenta vezanog na fenilni prsten. Na spektrima spojeva **1** i **2** koji u strukturi imaju fluor vezan na fenilnom prstenu u položajima C_2 (spoj **1**) i C_3 (spoj **2**) javlja se vrpca u području $1140\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$. Na spektru spoja **3** koji u strukturi ima acetamido grupu vezanu na fenilnom prstenu u položaju C_4 javlja se karakteristična vrpca u području 3460 cm^{-1} koja potiče od amino --NH grupe, u području 1645 cm^{-1} javlja se vrpca koja potiče od amidne $\text{C}=\text{O}$ grupe i u području 1403 cm^{-1} javlja se vrpca koja je karakteristična za C-N istezanje. Na spektru spoja **4** koji u strukturi ima brom na položaju C_4 javlja se vrpca u području 751 cm^{-1} koja potiče od C-Br grupe.

Na ^{13}C NMR spektrima sintetisanih spojeva uočljivi su pomaci koji su karakteristični za pojedine vrste karbonovih atoma. Radi lakše analize NMR spektara na Slici 6. je prikazana numeracija arilmetilen-*bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivata.



Slika 6. Numeracija arilmetilen-*bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivata

Kod svih sintetisanih spojeva na spektrima uočavaju se pomaci između $26.9\text{--}29.7\text{ ppm}$ koji potiču od karbonovih atoma iz CH_3 grupa na C_5 i C_5' atomima. Na spektrima se također uočava pomak između $30.7\text{--}32.7\text{ ppm}$ koji potiče od karbonovih atoma u položaju C_5 i C_5' , te u području $27.5\text{--}33.6\text{ ppm}$ pomak koji potiče od karbonovog atoma koji spaja dva cikloheksenska prstena (C_7). Na spektrima se uočava pomak na 47.3 ppm koji potiče od karbonovih atoma u položaju C_4 i C_4' , te na

50.9 ppm koji potiče od karbonovih atoma u položaju C₆ i C_{6'}. U intervalu 111.9-118.8 ppm uočavaju se pomaci koji potiču od karbonovih atoma u položaju C₂ i C_{2'}. Na spektrima uočavaju se pomaci, u intervalu od 115.0-138.7 ppm koji potiču od aromatskih karbohidrogena (Ar-CH) i u intervalu 130.0-148.5 ppm pomake koji potiču od aromatskih karbona (Ar-C). Na spektrima se uočavaju pomaci u intervalu 190.9-200.5 ppm koji potiču od u karbonovih atoma u položajima C₁, C_{1'} i C₃, C_{3'}.

¹³C NMR spektri sintetisanih spojeva se razlikuju na osnovu pomaka karbonovih atoma karakterističnih za dati supstituent. Spojevi **1**, **2**, i **4** koji u strukturi imaju halogene supstituente Cl, Br i F, imaju karakterističnu tetraketonsku strukturu, obzirom da kao supstituente nemaju atome karbona ne uočavamo karakteristične pomake. Spoj **3** koji u strukturi u *para* položaju ima acetamido grupu ima pomake na 24.7 ppm i 169.2 ppm koji potiču od atoma karbona –NHCOCH₃.

Snimanje ¹H NMR spektara za sintetisane spojeve je izvršeno na temperaturi od od 25°C, pri čemu je kao otapalo korišten deuterirani aceton i deuterirani benzen. Na ¹H NMR spektrima uočavaju se singleti u području od 0.60-1.20 ppm koji potiču od hidrogena iz CH₃ grupa vezanih na C₅ i C_{5'} atome. Singleti i dubleti koji potiču od hidrogena iz CH₂ grupa (C₄, C_{4'} i C₆, C_{6'}) uočavaju se u području 2.01-2.42 ppm. Značajan signal za potvrdu strukture je singlet u području 4.85-5.46 ppm koji potiče od hidrogena vezanog za C atom koji povezuje dva cikloheksanska prstena (C₇). Na ¹H NMR spektrima uočavaju se dubleti u području od 6.40-7.52 ppm a koji potiču od hidrogena na fenilnom prstenu. Na spektrima uočljiv je singlet u području 10.97-12.01 ppm koji potiče od hidrogena iz hidroksilne -OH grupe.

Na osnovu literaturnih podataka o NMR spektrima do sada sintetisanih tetraketona i njihovih derivata možemo zaključiti da postoje sličnosti u položajima pikova za tetraketonski skelet koji je karakterističan za ovu grupu spojeva. Takođe postoji sličnost u položaju i intenzitetu pikova za pojedine supstituente prisutne na fenilnome prstenu i to hidroksilne, metoksi, dimetilamino, nitro grupe (Maleki i sar., 2018).

Iz literature je poznato da tetraketonu imaju značajnu antioksidativnu aktivnost (Zukić i sar., 2018; Thakur i Sohal 2020), te bi se mogli razviti u lijekove koji će se u budućnosti koristiti u liječenju oboljenja koji nastaju kao posljedica oksidativnog stresa (Maharvi i sar., 2008) Arilmetilen-*bis*(3-hidroksi-5,5-dimetil-2-cikloheksen-1-on) derivati imaju različit procenat inhibicije DPPH radikala i FRAP vrijednost, što direktno ovisi od koncentracije spoja i supstituenata koji su vezani za fenilni prsten. Mehanizam antioksidativne aktivnosti je povezan sa sposobnošću oslobađanja atoma hidrogena, protona ili elektrona sa supstituenata na fenilnom prstenu (Khan i sar., 2007). U strukturama sintetisanih spojeva su prisutne elektron donorske grupe koje povećavaju gustoću elektrona u aromatskoj strukturi čime se povećava nukleofilnost spoja (Kotora i sar., 2016). Osim toga prisutne su i deaktivirajuće grupe poput halogena (–F, –Cl i –Br) koje privlače elektrone i smanjuju nukleofilnost spoja (Bendary i sar., 2013).

Spoj **3**, sa acetamido grupom na fenilnom prstenu u položaju C₄, ima vrijednosti IC₅₀ 1,28 mM i FRAP 659,5 μmol/L, slabiju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa Vitaminom C. Spojevi koji kao supstituente imaju halogene (F, Cl, Br i CF₃) imaju aktivnost, ali u poređenju sa vitaminom C ponašaju se kao slabi antioksidansi. Tu se ubrajaju spojevi **1**, **2**, i **4**. Spojevi **1** i **2**, koji imaju fluor u položaju C₂ (spoj **1**) i u položaju C₃ (spoj **2**) imaju vrijednosti IC₅₀ 2,04 mM i FRAP 336,2 μmol/L, odnosno IC₅₀ 0,87 mM i FRAP 403,66 μmol/L. Spoj **4** koji ima brom na fenilnom prstenu u položaju C₄, ima

vrijednosti IC_{50} 1,86 mM i FRAP 462,3 μ mol/L. Spoj **2** se pokazao kao jači antioksidans u odnosu na ostale spojeve. Rezultati pokazuju da svi ispitivani tetraketoni imaju antioksidativnu aktivnost te da inhibicija DPPH radikala i redukciona sposobnost ovise od koncentracije spojeva, položaja (*o*-, *m*-, *p*-) i vrste supstituenta na fenilnom prstenu. Spojevi koji u strukturama imaju elektron donorske grupe pokazali su jaču antioksidativnu aktivnost kao i veću sposobnost redukcije u odnosu na spojeve koji imaju elektron akceptorske grupe.

Predkliničnim ispitivanjima dokazano je da tetraketoni kao i njihovi derivati imaju snažnu inhibitornu aktivnost prema enzimu tirozinaza te da se mogu smatrati potencijalno snažnim terapijskim agensima s djelovanjem na maligni melanom (Rad i Behbahani, 2017). Na osnovu rezultata možemo utvrditi da je spoj **3** i **4** pokazali jaču inhibiciju prema enzimu tirozinazi procenat inhibicije sa spoj **3** je iznosio 7.97%, a za spoj **4** je iznosio 6.10%, u poređenju sa pozitivnom kontrolom možemo reći da se ubraja u grupu slabijih inhibitora. Spojevi **1** i **2** su pokazali značajno manji procenat inhibicije prema enzimu tirozinazi te se ubrajaju u izuzetno slabe inhibitore. Spoj **3** u para položaju ima amidsku grupu te je pokazao najveći procenat inhibicije prema enzimu, ostali spojevi u svojim strukturama imaju halogene supstituente te su pokazali manji procenat inhibicije.

4. ZAKLJUČAK

U ovom naučnom radu smo sintetisali četiti različita derivata tetraketona koji su u svojim strukturama sadržavali različite supstituente na fenilnome prstenu, potvrdili smo njihov sastav i strukturu te smo ispitali njihovu biološku aktivnost. Jaču antioksidativnu aktivnost je pokazao spoj **2** sa vrijednostima IC_{50} 0,87 mM i FRAP 403,66 μ mol/L. Jaču inhibitornu aktivnost prema enzimu tirozinazi u odnosu na ostale spojeve, pokazao je spoj **3** pri koncentraciji 512 μ M procenat inhibicije je iznosio 7,97% u odnosu na pozitivnu kontrolu je pokazao slabo inhibitorno djelovanje. Na osnovu rezultata možemo zaključiti da su spojevi pokazali slabu antioksidativnu aktivnost te da djeluju kao slabi inhibitori enzima tirozinaze.

5. LITERATURA

1. Alchab F, Ettouati L, Bouaziz Z, Bollacke A, Delcros JG, Gerdzen CGW et al. (2015) Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of substituted indeno (1,2-*b*) indoles as inhibitors of human protein kinase CK2, Pharm, 2015;8:279-302
2. Anastas PT, Warner JC (1998) Green Chemistry Theory and Practice, Oxford University Press: New York
3. Ashtarian J, Heydari R, Maghsoodlou MT, Yazdani-Elah-Abadi A (2019) An efficient synthesis of 2,2'-arylmethylene bis(3-hydroxy-5,5-dimethyl-2-cyclohexene-1-one) derivatives using baker's yeast. Re Roum Chim; 64(3):259-264 DOI:[10.33224/rch/2019.64.3.07](https://doi.org/10.33224/rch/2019.64.3.07)
4. Azizi N, Dezfooli S, Hashemi MM (2013) Chemoselective synthesis of xanthenes and tetraketones in a choline chloride-based deep eutectic solvent. C R Chim;16(11):997-1001 DOI:[10.1016/j.crci.2013.05.002](https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.05.002)
5. Bandyopadhyay P, Jha S (2013) Effect of Substitution on the Inhibition of Mushroom Tyrosinase by Pyridine Carboxaldehydes. Progress in Reaction Kinetics and Mechanism, Sage J ; 38(1):75-85 DOI:[10.3184/146867813X13590434110159](https://doi.org/10.3184/146867813X13590434110159)

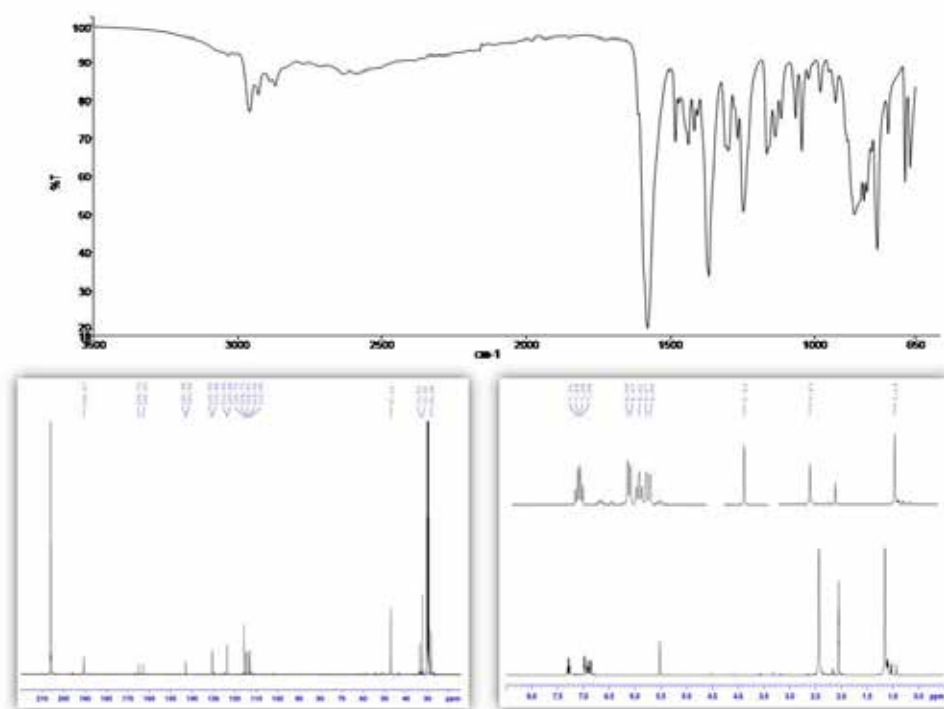
6. Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D, Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia (2004) *J Food Sci*;69(3):164-169 DOI:[10.1111/J.1365-2621.2004.TB13352.X](https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2004.TB13352.X)
7. Cutson T, Laub KC, Schenkman M (1995) Pharmacological and nonpharmacological interventions in the treatment of Parkinson's disease. *Phys Ther*;75(5): 363-73 DOI:[10.1093/ptj/75.5.363](https://doi.org/10.1093/ptj/75.5.363)
8. Da Siva ML, Teixeira RR, Santos LA, Martins FT, Ramalho TC (2018) Structural analysis of two tetraketones and theoretical investigation of the reactions involved in their preparation. *J Mol Struct*;1156(15):700 DOI:[10.1016/j.molstruc.2017.11.105](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.11.105)
9. Dewan SK, Anju B, Malik RK (2016) Synthesis of tetraketones from 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione and arylaldehydes in water in presence of sodium bicarbonate, sodium sulfate, magnesium sulfate, sodium chloride, sodium lauryl sulfate, barium chloride, polyethyleneglycol and alumina in excellent yields with and without the assistance. *Arch AppSci Res*.8:1-6
10. Dewan SK, Bajwan A (2014) Green synthesis of arylmethylen[bis(5,5-dimethyl-3-hydroxy-2-cyclohexene-1-ones)] from 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione and arylaldehydes in aqueous medium in presence of benzyltriethylammoniumchloride (Tebac). *JAppl Chem*. 3(3):990-996
11. Djandé A, Kiendrébéogo M, Compaoré M, Kaboré L, Nacoulma GO, Aycard JP, Saba A (2011) Antioxidant potential of 4-acyl isochroman-1, 3-diones. *Res J ChemSci*.1(5): 88-90
12. Dos Santos VPS, Silva LMC, Salagado AM, Pereira KS (2013) Application of Agaricu bisporus extract for benzoate sodium detection based on tyrosinase inhibition for biosensor development. *Chem EngTrans*.32:66-70
13. Džambić A, Muratović S, Veljović E, Softić A, Dautović E, Šljivić Husejnović M et al. (2020) Evaluation of Antioxidative, Antimicrobial and Cytotoxic Activity of the Synthesized Arylmethylenbis (3-Hydroxy-5,5-Dimethyl-2-Cyclohexen-1-One) Derivatives. *Eur Chem Bull*.9(9):285-290 DOI:[10.17628/ecb.2020.9.285-290](https://doi.org/10.17628/ecb.2020.9.285-290)
14. Džambić A, Muratović S Veljović E, Smajić M, Cilović Kozarević E, Horozić E et al. (2019) Antioxidative activity of six new arylmethylen bis (3-hydroxy-5,5-dimethyl-2-cyclohexen-1-on) derivates. *4th Congress of PharBiH Int Part*. 1:316-317
15. Ferreira MS, Figueroa-Villar JD (2014) Conformational analysis of 2,2'-arylmethylene-bis(3-hydroxy-5,5-dimethyl-2-cyclohex-en-1-one) by NMR and molecular modeling, *JBraz Chem Soc*.25(5):935-946 DOI:[10.5935/0103-5053.20140065](https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140065)
16. Ferreira MS, Pires DAT, Figueroa Villar JD (2015) Evaluation of tetraketones and xanthenediones as tyrosinase inhibitors or activators. *World JPhar Sci*.4(4):1705-1718
17. Forsen S, Frankle W, Laszlo P, Lubochinsky J(1969) Hindered rotation through intramolecular hydrogen-bonding: Opening statements on dimedone-aldehyde adducts. *JMag Res*.1(3) 327-338
18. Iqbal L, Lateef M, Ali S, Riaz N, Maharvi GM, Asraf M, et al. (2007) Antioxidant Activities of Tetraketones Derived from 5,5-Dimethylcyclohexane-1,3-dione. *JChem Soc Pak*.29(1):51-54
19. Jiménez-Aspee F, Quispe C, Soriano CMP, Fuentes Gonzalez J, Hüneke E, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G (2014) Antioxidant activity and characterization of constituents in copao fruits (*Eulychnia acida* Phil., Cactaceae) by HPLC–DAD–MS/MSⁿ. *Food Res Int*.62:286-298 DOI: [10.1016/J.FOODRES.2014.03.013](https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.03.013)
20. Kazemi-Rad R, Azizian J, Kefayati H (2015) Improved Synthesis of 2,2-Arylmethylene Bis(3-hydroxy-5,5-dimethyl-2-cyclohexene-1-one) and 1,8-Dioxo-octahydroxanthene

- Derivatives Catalyzed by Electrogenated Base and Sulfuric Acid. J Chin Chem Soc.62(4): 311-315 DOI:[10.1002/jccs.201400307](https://doi.org/10.1002/jccs.201400307)
21. Khan KM, Maharvi GM, Khan MTH, Shaikh AJ, Perveen S, Mild SB et al. (2006) Tetraketones: a new class of tyrosinase inhibitors. Bioorg Med Chem.14:344-351
 22. Khan KM, Maharvi GM, Nawaz SA, Perveen S, Choudhary MI (2007) An alternative method for the syntheyis of tetraketones and their lipooxygeanse inhibition and antioxydant properties. Lett drug des discov.4(4):272-278 DOI:[10.2174/157018007784620004](https://doi.org/10.2174/157018007784620004)
 23. Khurana JM, Vij K (2012) A highly efficient catalyst for one-pot synthesis of tetraketones and biscoumarines, JChemSci.;124(4):907-912 DOI:[10.1007/s12039-012-0275-8](https://doi.org/10.1007/s12039-012-0275-8)
 24. Lee CY, Sharma A, Semenya J, Anamoah C, Chapman KN, Barone V (2020) Computational Study of *Ortho*-Substituent Effects on Antioxidant Activities of Phenolic Dendritic Antioxidants. Antiox.9(3):189 DOI:[10.3390/antiox9030189](https://doi.org/10.3390/antiox9030189)
 25. Lee SY, Baek N, Nam TG (2016) Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. J Enzyme Inhib Med Chem. 31(1): 1-13 DOI:[10.3109/14756366.2015.1004058](https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1004058)
 26. Maharvi GM, Ali S, Riaz N, Afza N, Malik A, Ashraf M et al.(2008) Mild and efficient synthesis of new tetraketones as lipooxygenase inhibitors and antioxidants. J Enzyme Inhib Med Chem.;23:62-66 DOI:[10.1080/14756360701408754](https://doi.org/10.1080/14756360701408754)
 27. Maleki B, Raei M, Heshmatollah H, Tayeb R, Sedrpoushan A (2018) Chemoselective Synthesis of Tetraketones in Water Catalyzed by Nanostructured Diphosphate Na₂CaP₂O₇, Org PrepProced Int.50(3):288-300
 28. Masum MN, Yamauchi K, Mitsunaga T (2019) Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources as Skin-lightening Agents. Rev AgricSci.7: 41-58 DOI:[10.7831/ras.7.4](https://doi.org/10.7831/ras.7.4)
 29. Mayer AM (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A rev Phytochem.;67(21):2319-2331
 30. Merling G. (1894) Ueber Dihydroresorcin. Ann.278 (28):20-57
 31. Nikoofar K, Yielzoleh FM (2018) A concise study on dimedone: A versatile molecule in multi-component reactions, an outlook to the green reaction media. J Saudi ChemSoc.;22(6): 715-74 DOI:[10.1016/j.jscs.2017.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jscs.2017.12.005)
 32. Paliwal P, Jetti SR, Bhatewara A, Kadre T, Jain S (2013) DABCO catalyzed synthesis of xanthene derivatives in aqueous media. IntSch ResNotices.:1-6 DOI:[10.1155/2013/526173](https://doi.org/10.1155/2013/526173)
 33. Rad FK, Behbahani FK (2017) Tetraketones, Synthesis and their Applications. Curr Org Synth.14(1):22-39 DOI:[10.2174/1570179413666160624112201](https://doi.org/10.2174/1570179413666160624112201)
 34. Rao VK, Kumar MM, Kumar AM (2011) An efficient and simple synthesis of tetraketones catalyzed by Yb(OTf)₃-SiO₂ under solvent free conditions. Indian J Chem Sect B.50:1128-1135 DOI:[10.1002/chin.201151082](https://doi.org/10.1002/chin.201151082)
 35. Safaei-Ghomi J, Asadian S, Nazemzadeh SH, Shahbazi-Alavi H (2017) Synthesis of Tetraketones Using ZnS Nanoparticles as an Efficient Catalyst. J Chin Chem Soc.;65(4): 430-434 DOI:[10.1002/jccs.201700250](https://doi.org/10.1002/jccs.201700250)
 36. Saleh, HEDM, Koller M (2018) Introductory Chapter: Principles of Green Chemistry. Green Chem.. DOI:[10.5772/intechopen.71191](https://doi.org/10.5772/intechopen.71191).
 37. Shafiu S, Edache E, Sani U, Abatyough M (2017) Docking and Virtual Screening Studies of Tetraketone Derivatives as Tyrosine Kinase (EGFR) Inhibitors: A Rational Approach to Anti-Fungi Drug Design. JAdv Pharm.3(1):78-80
 38. Sheikhhosseini E, Faryabi M (2016)Uncatalyzed synthesis of arylmethylene[bis(5,5-dimethyl-3-hydroxy-2-cyclohexene-1-ones)] in hot water by domino Knoevenagel/Michael reactions. JApp Chem Res.10(3): 91-98

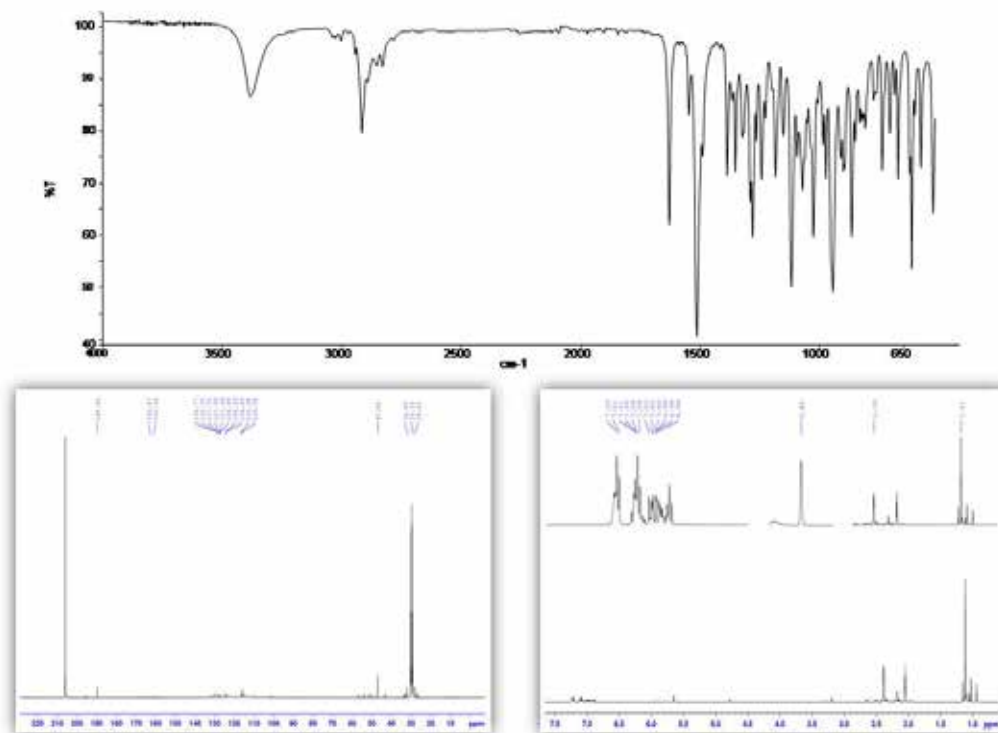
39. Vaya J, Aviram M (2001) Nutritional antioxidants: Mechanism of action, analyses of activities and medical applications. *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*.1(1): 99-117 DOI:[10.2174/1568013013359168](https://doi.org/10.2174/1568013013359168)
40. Wang L, Yang F, Zhao X, Li Y (2019) Effects of Nitro- and Amino-Group on the Antioxidant Activity of Genistein: A Theoretical Study. *Food Chem*.275:339–345 DOI:[10.1016/j.foodchem.2018.09.108](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.108)
41. Wijaya C, Elyab B, Yanuar A (2018) Study of tyrosinase inhibitory activity and phytochemical screening of *Cassia fistula* L. Leaves. *Int J App Pharm*.10(1):384-387
42. Williams GM, Wang CX, Iatropoulos MJ (1990) Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies, *Food Chem Toxicol*.28(12); 799-806 DOI:[10.1016/0278-6915\(90\)90052-O](https://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90052-O)
43. Zukić S, Veljović E, Špirtović-Halilović S, Muratović S, Osmanović A, Trifunović S et al.(2018) Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of synthesized 2,2,5,5-tetramethyl-9-aryl-3,4,5,6,7,9-hexahydro-1-*H*-xanthene-1,8(2*H*)-dione derivatives. *Croat Chem Acta*.91(1):1-9 DOI:[10.5562/CCA3225](https://doi.org/10.5562/CCA3225)

6. PRILOZI

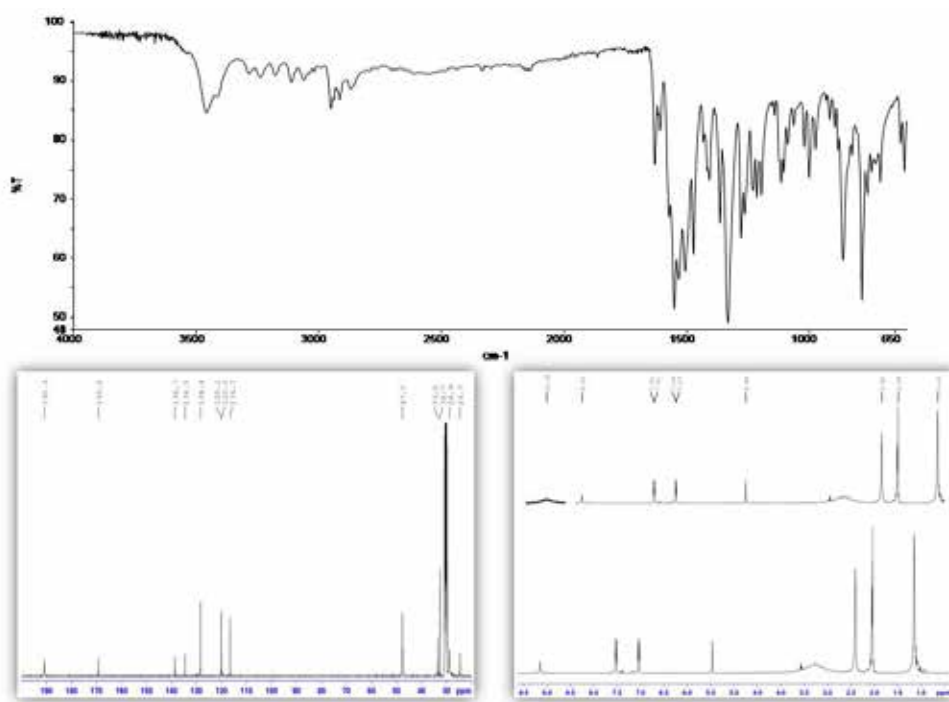
Slike IR i NMR spektara sintetisanih tetraketona.



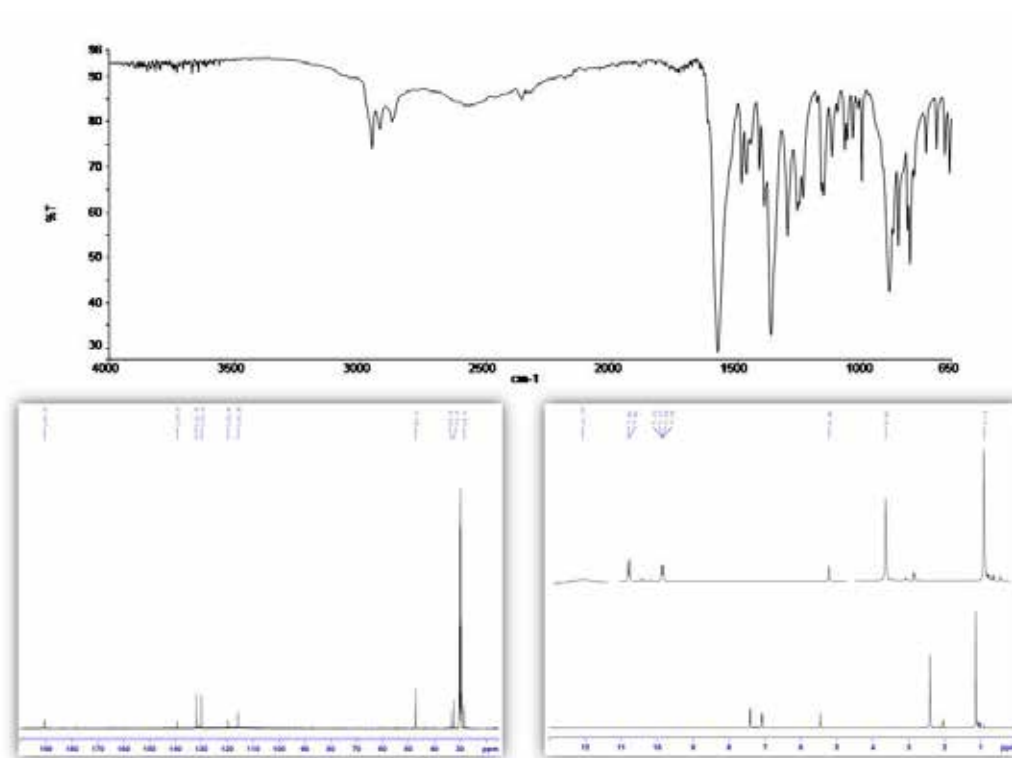
Slika 7. IR, ¹³C NMR i ¹H NMR spektri Spoja 1



Slika 8. IR, ¹³C NMR i ¹H NMR spektri spoja 2



Slika 9. IR, ¹³C NMR i ¹H NMR spektri Spoja 3



Slika 10. IR, ¹³C NMR i ¹H NMR spektri Spoja 4

UTJECAJ SMJESE RASTVARAČA NA ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST I SADRŽAJ POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA *CRATAEGI FOLIUM CUM FLORE*

Demir Bjelošević¹, Emir Horozić², Zahida Ademović³,
Amra Džambić¹, Ermina Cilović Kozarević¹

¹Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75 000 Tuzla, BiH

²Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75 000 Tuzla, BiH

³Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Zagrebačka 20, 71 000 Sarajevo, BiH

Izvorni znanstveni rad

SAŽETAK

List gloga sa cvijetom oficinalna je droga biljnih vrsta *Crataegus monogyna* Jacquin (bijeli glog) i *Crataegus levigata* (Poirt) DC (crveni glog). Koristi se kao tradicionalni biljni proizvod za ublažavanje nervnog srčanog stresa (npr. lupanja srca) nakon što su isključena ozbiljna stanja. Osim toga, tradicionalno se koristi za ublažavanje simptoma stresa i za spavanje.

U ovom radu ispitan je utjecaj organskih rastvarača na ekstrakciju biološki značajnih komponenti iz lista gloga sa cvijetom određivanjem sadržaja ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu metode. Antioksidativna aktivnost ispitana je DPPH i FRAP metodom. Za pripremu ekstrakata korišteni rastvarači su voda, metanol, etanol i aceton, te njihove 50%-tne vodene smjese. Rezultati su pokazali da vodene smjese organskih rastvarača ekstrahuju najviše fenolnih spojeva i imaju najjaču antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uslovima. Najslabiju antioksidativnu aktivnost pokazao je acetonski, a najveću vodeno-acetonski ekstrakt.

Ključne riječi: glog, polifenoli, antioksidativna aktivnost, DPPH, FRAP

Autor za korespondenciju: mr.ph. Demir Bjelošević, asistent
E-mail adresa: demir.bjelosevic@untz.ba

EFFECT OF SOLVENT MIXTURE ON ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND POLYPHENOL CONTENT IN CRATAEGI FOLIUM CUM FLORE EXTRACTS

Demir Bjelošević¹, Emir Horozić², Zahida Ademović³,
Amra Džambić¹, Ermina Cilović Kozarević¹

¹*Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, B&H*

²*Faculty of Technology, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, B&H*

³*Faculty of Forestry, University of Sarajevo, Zagrebačka 20, 71 000 Sarajevo, B&H*

Original scientific paper

ABSTRACT

Hawthorn leaf with flower is an officinal drug of the plant species *Crataegus monogyna* Jacquin (white hawthorn) and *Crataegus levigata* (Poier) DC (red hawthorn). The chemical composition depends on the part of the plant. It is used as a traditional herbal product to relieve nervous cardiac stress (e.g. palpitations) after serious conditions have been ruled out. In addition, it is traditionally used to relieve symptoms of stress and for sleep.

The aim of this work is to examine the influence of organic solvents on the extraction of biologically significant components from hawthorn leaves with flowers using the DPPH and FRAP methods and determining the content of total phenols using the Folin-Ciocalteu method. The solvents used in this work are water, methanol, ethanol and acetone, and their 50% aqueous mixtures. The results showed that aqueous mixtures of organic solvents extract the most phenolic compounds and that these extracts show the strongest antioxidant activity. The weakest antioxidant activity was shown by the acetone extract, and the highest by the water-acetone extract.

Keywords: hawthorn, organic solvents, DPPH, FRAP

Corresponding author: mr ph Demir Bjelošević, Teaching Assistant
E-mail address: demir.bjelosevic@untz.ba

1. UVOD

Crataegus oxyacantha L. – crveni glog, razgranat je i trnovit grm ili stablo visoko do 5 m. *Crataegus monogyna* Jacquin – bijeli glog je jako razgranati trnoviti grm ili malo stablo sa zaobljeno jajastom krošnjom. Izgled obje biljne vrste prikazan je na slici 1.



Slika 1. Izgled crvenog i bijelog gloga

Crataegi folium cum flore dokazano sadrži rutin, viteksin, hiperozid i kvercetin (Sagaradze i sar., 2019). Listovi, plodovi, kao i cvjetovi gloga sadrže šećere, fenolne kiseline, eterična ulja, terpene, fenilpropanoide, lignane i flavonoide (Martinelli i sar., 2021). U *Crataegus* vrstama otkrivene su jabučna, jantarna, limunska, askorbinska, salicilna i siringična kiselina, a osim njih još i niz masnih kiselina (Edwards i sar., 2012). U cvjetovima se dominantno nalaze viteksin i hiperozid, dok se procijanidini nalaze u većim količinama u nezrelim plodovima (Nabavi i sar., 2015). Ispitani antioksidativnih kapacitet ekstrakata lista, cvijeta i ploda gloga u literaturi se dovodi u vezu sa bioaktivnim molekulama, poput polifenola, flavanola i hidroksicimetnih kiselina (Martinelli i sar., 2021).

Crataegus vrste se tradicionalno koriste kao kardiotonici. U Europi se uglavnom koriste *Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.) i *Crataegus laevigata* (Poir.) DC (sinonim *Crataegus oxyacantha* L.). Za bijeli glog je prijavljeno da ispoljava i antihipertenzivno, antihiperlipemijsko, antihiperglikemijsko, anksiolitičko i imunomodulirajuće dejstvo, a mehanizmi dejstva su pozitivno i negativno inotropno djelovanje, inhibicija angiotenzinkonvertirajućeg enzima i fosfodiesteraze, poboljšanje statusa antioksidativnih enzima i brojni drugi (Orhan 2016). Nuspojave proizvoda koji sadrže *Crataegus* vrste su blage gastrointestinalne i kožne reakcije, te palpitacije i vrtoglavica, što može imati kardiovaskularnu pozadinu (Woerdenbag i sar., 2024).

Najčešće tehnike u ekstrakciji polifenolnih spojeva podrazumijevaju upotrebu organskih ili neorganskih rastvarača. Parametri koji utječu na proces ekstrakcije su: temperatura, vrijeme ekstrakcije, vrsta rastvarača i omjer rastvarača i uzorka (Che Sulaiman i sar., 2017). Polifenoli koji se mogu ekstrahirati imaju manju molekularnu masu, dok su polifenoli veće molekularne mase vezani za proteine pa se prije ekstrakcije moraju hidrolizirati (Dai i Mumper, 2010). Za ekstrakciju antioksidativnih spojeva iz biljaka najčešće se koriste voda, vodena smjesa metanola, etanola i acetona (Xu i Chang, 2007). Cilj ovog rada je ispitati utjecaj organskih rastvarača i njihovih vodenih smjesa na ekstrakciju polifenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Priprema ekstrakata

List gloga s cvijetom samljeven je u prah uz pomoć električnog mlina. Ekstrakti su pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom sa različitim rastvaračima (voda, metanol, etanol, aceton, voda-metanol 50/50, voda-etanol 50/50, voda-aceton 50/50 v/v). Na 2 grama biljnog materijala dodano je 20 mL rastvarača. Ekstrakcija je vršena u ultrazvučnom kupatilu (Elmasonic S, Njemačka) pri frekvenci od 37 kHz, u trajanju od 30 minuta. Ekstrakti su filtrirani preko filter papira plava traka i čuvani na hladnom i tamnom mjestu do početka provođenja analiza. Izgled ekstrakata nakon ekstrakcije prikazan je na slici 2.



Slika 2. Izgled ekstrakata nakon ekstrakcije

2.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Ukupni polifenolni spojevi kvantificirani su spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu testom prema protokolu (Singleton, Orthofer i Lamuela-Raventós, 1999), uz određene modifikacije. 100 μ L ekstrakta je pomiješano sa 1270 μ L 10% Folin - Ciocalteu reagensa. Nakon 5 minuta dodano je 210 μ L 10% natrijum karbonata. Nakon provedene inkubacije u trajanju od sat vremena rastvorima je dodano 455 μ L destilovane vode. Apsorbancija je izmjerena na spektrofotometru (Perkin Elmer Lambda 25, SAD) pri talasnoj dužini 765 nm. Kvantitativna analiza je izvršena na osnovu standardne kalibracione krive galne kiseline ($y = 0,0042x + 0,0076$, $R^2 = 0,9998$). Ukupni polifenolni sadržaj izražen je kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u miligramima po gramu uzorka.

2.3. DPPH metoda

2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) metoda provedena je prema ranije opisanoj metodi (Horozić i sar., 2019). 0,1 mL ekstrakta dodano je u epruvetu i dopunjeno do 2 mL metanolom. Potom je dodano 0,5 mL 0,5 mM rastvora DPPH i uzorci se ostavljani da se inkubiraju 30 minuta u zamračenom prostoru na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je izmjerena na 517 nm uz metanol kao slijepu probu. Efikasnost uklanjanja radikala (%) ili procenat inhibicije radikala DPPH izračunat je prema jednačini:

$$[(Ac - As) / Ac] \times 100$$

pri čemu je As apsorbanca rastvora koja sadrži uzorak na 517 nm, a Ac je apsorbanca kontrole. Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrijednost (mg/mL).

2.4. FRAP metoda

FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power) metoda temelji se na sposobnosti ekstrakta da redukuje Fe(III) u Fe(II) jone. Ispitivanje je provedeno prema publiciranom protokolu (Benzie i Strain, 1999). 3 mL pripremljenog FRAP reagensa pomiješano je sa 100 μ L razblaženih ekstrakata. Nakon inkubacije od 30 minuta na 37 °C u vodenom kupatilu, mjerena je apsorbanca na talasnoj dužini 593 nm. FRAP vrijednost izračunata je iz kalibracijske krive željezo (II) sulfata heptahidrata ($y = 0,001x + 0,0698$; $R^2 = 0,9997$).

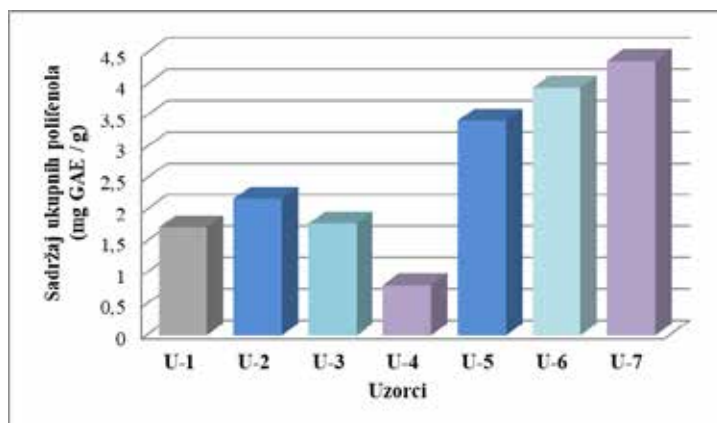
3. REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati sadržaja ukupnih polifenola pripremljenih ekstrakata prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati sadržaja ukupnih polifenola

Ekstrakt	Vodeni	Metanolni	Etanolni	Acetonski	Vodeno-metanolni	Vodeno-etanolni	Vodeno-acetonski
Sadržaj polifenola [mg GAE/g]	1,725	2,180	1,785	0,800	3,425	3,955	4,380

Najveći sadržaj ukupnih polifenolnih spojeva potvrđen je u vodeno-acetonskom ekstraktu gloga. Smjesa etanola i vode pokazala je visoku efikasnost u ekstrakciji polifenolnih spojeva u odnosu na koncentrovaniju otopinu etanola ili apsolutni etanol (Bekbolatova i sar., 2018). 50%-tni etanol bolji je rastvarač za ekstrakciju polifenolnih spojeva gloga od 96%-tnog etanola (Bekbolatova i sar., 2018). Vodeno-acetonska smjesa efikasnija je u ekstrakciji polifenola od vodeno-etanolne (Lisica, 2016). Generalno, vodeno-alkoholne smjese ekstrahuju veći količinu polifenolnih spojeva od čistih organskih rastvarača, a to se objašnjava činjenicom da voda uzrokuje bubrenje biljnog materijala i olakšava prodor drugom rastvaraču u čvrsti matriks (Bhebe i sar., 2015). Ukoliko se porede ekstrakti koji su dobiveni uz pomoć samo jednog rastvarača, vidljivo je da metanolni ekstrakt ima



Slika 3. Grafički prikaz sadržaja ukupnih polifenola

U-1 predstavlja vodeni, U-2 metanolni, U-3 etanolni, U-4 acetonski, U-5 vodeno-metanolni, U-6 vodeno-etanolni i U-7 vodeno-acetonski ekstrakt.

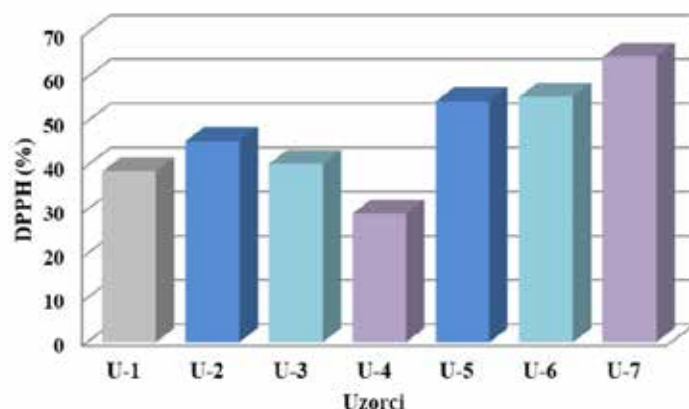
najveći sadržaj polifenolnih spojeva. Razlike u sadržaju polifenolnih spojeva u ekstraktima mogu biti posljedica različitih svojstava polifenolnih spojeva (Galić, 2020). Potrebno je uzeti u obzir i strukturu polifenolnih spojeva jer ti spojevi mogu imati više hidroksilnih grupa koje se mogu konjugirati sa šećerima, kiselinama ili alkilnim grupama (Garcia-Salas i sar., 2010). Aceton je ekstrahirao najmanje fenolnih spojeva, a takav rezultat mogao bi biti posljedica njegove slabe polarnosti. Na slici 3 dat je grafički prikaz rezultata sadržaja ukupnih polifenola.

Rezultati antioksidativnog kapaciteta dobivenih DPPH metodom za koncentraciju ekstrakata gloga od 5 g/L prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Rezultati antioksidativnog kapaciteta dobivenih DPPH metodom

Ekstrakt	Vodeni	Metanolni	Etanolni	Acetonski	Vodeno-metanolni	Vodeno-etanolni	Vodeno-acetonski
Procenat gašenja (%)	38,67	45,53	40,37	29,06	54,54	55,55	64,61

Na osnovu rezultata dobivenih DPPH metodom vidljivo je da ekstrakti sa vodenim smjesama organskih rastvarača pokazuju najveću antioksidativnu aktivnost, što je u skladu i sa rezultatima sadržaja ukupnih polifenolnih spojeva. Na slici 4 dat je grafički prikaz rezultata dobivenih DPPH metodom.



Slika 4. Grafički prikaz rezultata DPPH metode dobivenih ekstrakata

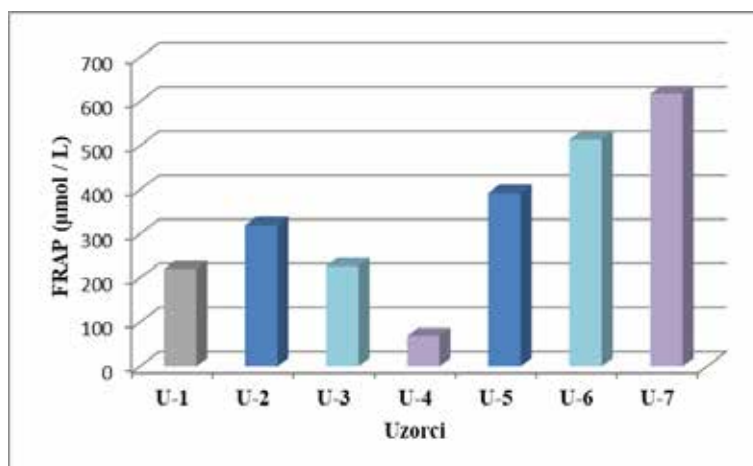
Rezultati antioksidativne aktivnosti dobiveni FRAP metodom potvrđuju rezultate dobivene DPPH metodom. Ovime se pokazalo da je za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz smjese cvijeta gloga sa listom najbolje kombinovati vodu i slabo polaran organski rastvarač.

Tabela 3. Rezultati dobiveni FRAP metodom

Ekstrakt	Vodeni	Metanolni	Etanolni	Acetonski	Vodeno-metanolni	Vodeno-etanolni	Vodeno-acetonski
FRAP (μmol/L)	220,8	320,05	227,4	69	393,05	513,7	617,45

Ranije publicirani rezultati ukazuju da antioksidativna aktivnost nije direktno proporcionalna sadržaju ukupnih polifenolnih spojeva gloga (Alirezalu i sar., 2018; Çaliskan i sar. 2012). Bahri-Sahloul i

sar. (2009) navode da se hlorogenska kiselina, hiperozid, rutin, spireozid, kvercetin 3-glukozid (izokvercetin), kvercetin, (-)-epikatehin i procijanidin B2 smatraju spojevima sa jakim antioksidativnim aktivnostima u ekstraktima cvijetnih pupova gloga. Razlika u antioksidativnoj sposobnosti može biti i posljedica starosti biljnog materijala, kvaliteta sušenja i skladištenja, ekstrakcije balastnih materija, rastvarača i slično. Dokazano je da stariji dijelovi biljke, bilo cvijeta ili ploda da imaju manju efikasnost u inhibiciji slobodnih radikala, a to se objašnjava gubitkom polifenolnih spojeva u procesu starenja biljke (Barreira i sar., 2013). Na slici 5 dat je grafički prikaz rezultata dobivenih FRAP metodom.



Slika 5. Grafički prikaz rezultata FRAP metode dobivenih ekstrakata

4. ZAKLJUČAK

Veći prinos ukupnih polifenolnih spojeva gloga, a time i antioksidativne aktivnosti postiže se primjenom smjese vode i organskih rastvarača. Od pojedinačnih organskih rastvarača, polarniji rastvarači ekstrahuju veću količinu ukupnih polifenolnih spojeva. Antioksidativna aktivnost najveća je kod ekstrakata koji sadrže najveći sadržaj polifenolnih spojeva. Rezultati antioksidativne aktivnosti ukazuju na veliki značaj ove biljne droge u tretmanu kardiovaskularnih oboljenja.

5. LITERATURA

1. Alirezalu A, Hosseinpour-Feizi M, Fatahi R, Mohammadi M, Nejad ASM (2018) Flavonoids profile and antioxidant activity in flowers and leaves of hawthorn species (*Crataegus spp.*) from different regions of Iran. Int J Food Prop 21:325-337 <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1446146>.
2. Bahri-Sahloul R, Mars M, Tlili N, Gargouri M, Feki H, Lachaâl M (2009) Chemical characterisation of *Crataegus azarolus* L. fruit from 14 genotypes found in Tunisia. J Horticult Sci Biotechnol 84(1):36-41 <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512474>.
3. Barreira JCM, Rodrigues S, Carvalho AM, Ferreira ICFR (2013) Development of hydrosoluble gels with *Crataegus monogyna* extracts for topical application: Evaluation of antioxidant activity of the final formulations. Ind Crop Prod 42:175-180 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.034>.

4. Bekbolatova E, Yermekbayev Z, Zhumadilov Z, Nurkesh A, Ibrayeva G (2018) Phenolic composition and antioxidant potential of different organs of Kazakh *Crataegus almaatensis* Pojark: A comparison with the European *Crataegus oxyacantha* L. flowers. Open Chem 16:1140-1149 <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0048>.
5. Benzie IFF, Strain JJ (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 299:15-27 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5).
6. Bhebhe M, Mudavanhu P, Materechera SA (2016) Effect of solvent type on total phenolic content and free radical scavenging activity of black tea and herbal infusions. Food Anal Methods 9(4):967-975 <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0270-z>.
7. Çaliskan O, Ulusoy S, Toker G, Öksüz S (2012) Phytochemical characterization of several hawthorn (*Crataegus spp.*) species sampled from the Eastern Mediterranean region of Turkey. Phcog Mag 8(29):280-285 <https://doi.org/10.4103/0973-1296.93305>.
8. Che Sulaiman IS, Ibrahim MH, Suhaili Zulkifli RA, Mustapha NM, Muhamad M (2017) Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of Clinacanthus nutans Lindau leaves by response surface methodology. Chem Cent J 11:74 <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0285-1>.
9. Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15(10):7313-7352 <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
10. Edwards JE, Larkin P, Perry NSL (2012) A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. Phytochemistry 77:5-26 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.006>.
11. Galić, L., (2020). Fenolni spojevi u biljkama. Diplomski rad. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
12. Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2010) Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. Molecules 15(12):8813-8826 <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>.
13. Horozić E, Zukić A, Kolarević L, Bjelošević D, Ademović Z, Kundalić B, Husejnagić D, Kudumović A (2019) Evaluation of antibacterial and antioxidant activity of methanol needle extracts of *Larix decidua* Mill., *Picea abies* (L.) H. Karst. and *Pinus nigra* J.F. Arnold. Technics Technol Educ Manag 14:22-27.
14. Lisica, P. (2016). Utjecaj uvjeta ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otapala u proizvodnji vina. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
15. Martinelli F, Tasca A, Paris R, Ballini R, Pagiotti R, Gamberini MC (2021) Botanical, phytochemical, anti-microbial and pharmaceutical characteristics of hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), *Rosaceae*. Molecules 26(23):7266 <https://doi.org/10.3390/molecules26237266>.
16. Nabavi SF, Habtemariam S, Daglia M, Nabavi SM, Braidly N, Sureda A (2015) Polyphenolic composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From chemistry to medical applications. Nutrients 7(9):5361-5388 <https://doi.org/10.3390/nu7095361>.
17. Orhan IE (2016) Phytochemical and pharmacological activity profile of *Crataegus oxyacantha* L. (Hawthorn) - a cardiotonic herb. Curr Med Chem 25(37):4381-4393 <https://doi.org/10.2174/0929867323666160919095519>.

18. Sagaradze VA, Drobyazina TB, Bobrov AA, Chikina MN (2019) Study of the variability of rutin, vitexin, hyperoside, quercetin in '*Crataegi folium cum flore*' of hawthorn (*Crataegus L.*) species from Russian flora. J Appl Res Med Aromat Plants 15:100217 <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2019.100217>.
19. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol 299:152-178 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
20. Woerdenbag HJ, Koek SM, van Ufford HCQ, Pras N (2024) Analysis of adverse reactions associated with the use of Crataegus-containing herbal products. Pharmaceuticals 17(11):1490 <https://doi.org/10.3390/ph17111490>.
21. Xu BJ, Chang SKC (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. J Food Sci 72(2):S159-S166 <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>.

KVALITET ZRAKA U VRTIĆIMA U GRADU TUZLA, BOSNA I HERCEGOVINA

Selma Azabagić¹, Nadina Mokayes¹, Sandra Osmanbegović¹

¹*Zavod za javno zdravstvo Tuzanskog kantona, Tuzlanskog odreda 6, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina*

Izvorni znanstveni rad

SAŽETAK

Kvalitet zraka unutrašnjeg prostora predstavlja jednu od glavnih prijetnji okoliša po zdravlje ljudi. Cilj ovog rada je bio utvrditi kvalitet zraka unutrašnjeg prostora u javnim vrtićima na području grada Tuzla, Tuzlanski kanton, Bosna i Hercegovina. Ovo istraživanje je uključilo mjerenje kvaliteta zraka pomoću mobilnog mjernog uređaja Trotec BQ 30 i uređaja Trotec BQ 16 u 13 vrtića u Tuzlanskom kantonu, BiH u januaru 2025.godine. Mjereni su polutanti u prostorijama vrtića: koncentracije formaldehida (HCHO), ukupnih isparljivih organskih spojeva – benzen, trihloretan, toluen, etilbenzen i ksilen (TVOCs – Total Volatile Organic Compounds), lebdećih čestica PM₁₀ i PM_{2,5}, ugljen-dioksida (CO₂) te temperatura i vlažnost. Izvršeno je mjerenje u dvije prostorije, tokom perioda od tri sata, pri čemu je svakog sata obavljeno jedno mjerenje svih zagađivača. Za interpretaciju rezultata korišteni su standardi za kvalitet zraka Svjetske zdravstvene organizacije *Vodič za kvalitet zraka, 2005* i *Vodič za unutrašnji kvalitet zraka selektiranih polutanata, 2010*, te Uredbe o hemikalijama Evropske unije (propisi EU-a o hemikalijama, prehrambenim aditivima, označavanju i razvrstavanju tvari i Njemačkog saveznog ureda za okoliš).

Rezultati mjerenja su pokazali da su u osam vrtića izmjerene prosječne koncentracije PM₁₀ bile iznad standarda SZO, s izmjerenim vrijednostima od 18 µg/m³ (najniža) do 374 µg/m³ (najviša). Izmjerene prosječne koncentracije PM_{2,5} bile su u okviru referentnih vrijednosti samo u dva vrtića, s izmjerenim vrijednostima od 12 µg/m³ (najniža) do 197 µg/m³ (najviša). Izmjerene prosječne koncentracije CO₂ bile su iznad referentnih vrijednosti u svim vrtićima. Izmjerene prosječne koncentracije HCHO bile su iznad referentnih vrijednosti u četiri vrtića, s izmjerenim vrijednostima od 0,02 mg/m³ (najniža) do 0,27 mg/m³ (najviša). Izmjerene prosječne koncentracije TVOC bile su u svim vrtićima u nivou referentnih vrijednosti. Rezultati istraživanja podstiču sticanje uvida i ocjenu kvaliteta zraka zatvorenog prostora kao osnovu za donošenje i provođenje relevantnih preventivnih mjera. Poželjno bi bilo obaviti mjerenja u svim privatnim i javnim vrtićima Tuzlanskog kantona, Bosna i Hercegovina.

Ključne riječi: vrtić, kvalitet unutrašnjeg zraka, zdravlje, predškolarci

Autor za korespondenciju: Selma Azabagić

Email: selma.azabagic@zjztk.ba

AIR QUALITY IN KINDERGARTENS IN TUZLA CANTON, BOSNIA AND HERZEGOVINA

Selma Azabagić¹, Nadina Mokayes¹, Sandra Osmanbegović¹

¹Institute of Public Health of Tuzla Canton, Tuzlanskog Odreda 6, 75000 Tuzla,
Bosnia and Herzegovina

Original scientific paper

ABSTRACT

Indoor air quality represents one of the major environmental threats to human health. The aim of this study was to assess indoor air quality in public kindergartens in the city of Tuzla, Tuzla Canton, Bosnia and Herzegovina. This study included air quality measurements using mobile devices Trotec BQ 30 and Trotec BQ 16 in thirteen kindergartens in Tuzla Canton, Bosnia and Herzegovina, in January 2025. The measured indoor pollutants included formaldehyde (HCHO), total volatile organic compounds – benzene, trichloroethane, toluene, ethylbenzene, and xylene (TVOCs – Total Volatile Organic Compounds), particulate matter PM₁₀ and PM_{2.5}, carbon dioxide (CO₂), as well as temperature and humidity. Measurements were performed in two rooms during a three-hour period, with one set of measurements conducted each hour for all pollutants. For the interpretation of results, the air quality standards of the World Health Organization (*Air Quality Guidelines, 2005* and *WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants, 2010*) were used, along with the European Union regulations on chemicals (EU legislation on chemicals, food additives, classification and labeling of substances), and the guidelines of the German Federal Environment Agency.

The results showed that in eight kindergartens the average concentrations of PM₁₀ exceeded WHO standards, with measured values ranging from 18 µg/m³ (lowest) to 374 µg/m³ (highest). Average concentrations of PM_{2.5} were within the reference values in only two kindergartens, ranging from 12 µg/m³ (lowest) to 197 µg/m³ (highest). Average concentrations of CO₂ exceeded reference values in all kindergartens. Average concentrations of HCHO were above reference values in four kindergartens, with measured values ranging from 0.02 mg/m³ (lowest) to 0.27 mg/m³ (highest). In contrast, average concentrations of TVOCs were within the reference values in all kindergartens. The results of this study provide assessment and insight into indoor air quality, serving as a foundation for the development and implementation of relevant preventive measures. It would be advisable to conduct air quality measurements in all private and public kindergartens across Tuzla Canton, Bosnia and Herzegovina.

Keywords: *kindergarten, indoor air quality, health, preschool children.*

Corresponding author: Selma Azabagić, MD, PhD
Email: selma.azabagic@zjztk.ba

UVOD

Životna sredina je važan izvor izloženosti ljudi zagađenom zraku, buci i opasnim hemikalijama koje negativno utiču na zdravlje. Zagađeni zrak predstavlja najveći pojedinačni rizik za zdravlje iz okoliša koji je povezan sa srčanim bolestima, moždanim udarom i karcinomom pluća. U Bosni i Hercegovini zagađeni zrak uzrokuje više od 3.000 prijevremenih smrti prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (World Bank, 2019). Zagađenje životne sredine u 2019. godini bilo je odgovorno za otprilike 9 miliona smrtnih slučajeva godišnje, što odgovara jednom od 6 smrtnih slučajeva širom svijeta (Fuller i sar. 2022). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) procjenjuje da svaki dan oko 93% djece u svijetu mlađe od 15 godina udiše zrak koji je toliko zagađen da ozbiljno ugrožava njihovo zdravlje i razvoj. Nedavna studija koju je proveo Harvard Gazette utvrdila je jasnu vezu između manjih čestica $PM_{2,5}$, koje se mogu apsorbirati u krvotok i demencije. To stvara potencijal za kratkoročno kognitivno opadanje i zdravstvene implikacije na razini populacije s više od 57 miliona ljudi širom svijeta koji trenutno žive s tim stanjem. Na području Tuzlanskog kantona rađeno je istraživanje u dva grada, Tuzla i Lukavac, koje je pokazalo da je ambijentalno zagađenje $PM_{2,5}$ česticama odgovorno za 16,20% smrtnosti u Tuzli i 22,77% u Lukavcu od svih uzroka među odraslima. Ova studija je pokazala da, ako bi se zagađenje $PM_{2,5}$ smanjilo na smjernice SZO od $10 \mu g/m^3$, povećao bi se životni vijek za 2,1 godinu u Tuzli i 2,4 godine u Lukavcu (Matković i sar. 2020). Posebnu opasnost predstavlja zagađenje zraka unutrašnjeg prostora u kojem provodimo većinu svog životnog vijeka. Izazov javnog zdravlja posljednjih godina je kvalitet zraka zatvorenog prostora u predškolskim ustanovama. Glavni zračni polutanti su lebdeće čestice ($PM_{2,5}$ i PM_{10}), ozon, dušik dioksid, sumpor dioksid i ugljen monoksid. Kvalitet zraka u vrtiću je bitna odrednica zdravog života i dobrobiti predškolske djece. Predškolska djeca su osjetljiva skupina zbog nezrelosti njihovog disajnog, imunološkog, reproduktivnog, nervnog i probavnog sistema. Oko 80% svog vremena djeca predškolskog uzrasta provode u unutrašnjem prostoru (vrtići, kuće, stambeni objekti). Sve ustanove u kojima borave djeca trebaju biti prostori koji obezbjeđuju kvalitet zraka koji je siguran za zdravlje. Kvalitet zraka zatvorenog prostora ovisi o kvalitetu vanjskog zraka ali i od koncentracija polutanata iz unutrašnjosti samog objekta. Koncentracije polutanata vanjskog zraka u unutrašnjosti objekta direktno zavise od njihovih koncentracija u samom vanjskom zraku. Čestice $PM_{2,5}$ su glavni izvor zagađenja vanjskog zraka u Bosni i Hercegovini a izvor su im kućna ložišta, termoelektrane, industrija, saobraćaj, poljoprivreda i otpad. Ljudi provode veći dio vremena u zatvorenom nego na otvorenom prostoru što znači da su izloženiji zagađenju zbog PM čestica zatvorenog više od istog polutanta otvorenog prostora. PM čestice zatvorenog prostora imaju dokazano izuzetno loš efekat na pluća (Isiugo i sar. 2019). PM čestice imaju štetne efekte na akutne i hronične bolesti kod djece (Mainka i Žak. 2022). Dugotrajnim izlaganjem PM_{10} i $PM_{2,5}$ česticama povećava se rizik za kardiovaskularne i respiratorne bolesti. Čestice $PM_{2,5}$ predstavljaju posebnu opasnost jer zbog svog malog promjera mogu dospjeti u plućne alveole. Djeca koja udišu dim imaju veću šansu da razviju astmu i da osjete češće i teže napade astme. Egzacerbaciju astme kod djece kao posljedicu neadekvatnog kvaliteta zraka unutrašnjeg prostora potvrdila su mnoga istraživanja. Povišene koncentracije ugljen dioksida (CO_2) utiču na poremećaje ventilacije pluća (Buculei i sar. 2022). Policiklički aromatski ugljovodonici (PAH) su klasa složenih organskih supstanci, koje se sastoje od atoma ugljika i vodika koji sadrže najmanje dva benzenska prstena. PAH se nalaze svuda u životnoj sredini, odnosno u vazduhu, vodi i tlu (uključujući sedimente), jer koriste atmosferu kao sredstvo za dispenzaciju. Kao takvi mogu se naći u sedimentima katrana i uglja, ali mogu nastati i nepotpunim sagorijevanjem organske tvari, na primjer, šumski požari, spaljivanje i motori. Poznato je da PAH spojevi kao što su fluoranten, benzopiren, antracen i acenaftilen mogu proizvesti toksične, mutagene i kancerogene efekte, što je

važan faktor rizika za respiratorna oboljenja, kao što je rak pluća. Uloga zagađenog zraka je i u povećanju slučajeva neurodegenerativnih poremećaja kod djece kao što su anksioznost i depresija (Yang i sar. 2022). Posljedice po zdravlje od zagađenog unutrašnjeg zraka uzrokuju različite nelagode od glavobolje, vrtoglavice, mučnine, iritacija grla, očiju, nosa do lupanja srca, pogoršanja astme i drugih respiratornih bolesti. Zrak koji je previše vlažan dovodi do kondenzacije, neugodnog mirisa i plijesni. Zagađeni zrak u zatvorenom prostoru ima veći negativni uticaj na djecu, starije osobe i bolesnike sa hroničnim bolestima krvnožilnog sistema. Pored lošeg uticaja na respiratorni sistem rađene su studije koje su pokazale vezu između gojaznosti i lošeg zraka u unutrašnjem prostoru (Zhu i sar. 2023). Izloženost zagađenom zraku u domaćinstvu gotovo udvostručuje rizik od infekcija donjih respiratornih puteva u djetinjstvu i odgovorna je za povećan rizik od nezaraznih bolesti, uključujući moždani udar, ishemijsku bolest srca, hroničnu opstruktivnu bolest pluća i rak pluća (Yu i sar. 2023). Zrak u zatvorenom prostoru može da sadrži u prašini i endokrine ometače koji imaju negativni uticaj na zdravlje djece (Zheng i sar. 2023). Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) ukazuje da je opterećenje tijela PBDE (polibromirani difenil eteri) povezano sa štetnim reproduktivnim i neurobihejvioralnim efektima, posebno za organizam u razvoju kakav je dječiji. U Kini je rađeno istraživanje koje povezuje dugoročnu izloženost PM česticama i pojavu ranog puberteta kod djevojčica (Zhou i sar. 2025).

CILJ RADA

Ova studija je postavljena sa ciljem da se utvrdi kvalitet zraka zatvorenog prostora u javnim vrtićima na području grada Tuzla, Tuzlanski kanton, Bosna i Hercegovina.

METODE

Istraživanje je uključilo mjerenje kvaliteta zraka pomoću mobilnog mjernog uređaja njemačkog proizvođača Trotec BQ 30 - uređaj za mjerenje lebdećih čestica (PM_{10} i $PM_{2,5}$), ugljen dioksida (CO_2), temperature (T) i relativne vlažnosti (R) u zraku u zatvorenom prostoru, te uređaja njemačkog proizvođača Trotec BQ 16 - uređaj za mjerenje koncentracije formaldehida (HCHO), ukupnih isparljivih organskih spojeva - benzen, trihlorethan, toluen, etil-benzen i ksilen (TVOC- Total Volatile Organic Compounds) u zraku u zatvorenom prostoru, u 13 vrtića u Tuzlanskom kantonu, BiH u januaru 2025 godine. Mjerač Trotec BQ 30 je prenosivi uređaj za praćenje kvaliteta zraka koji radi tako što mjeri fine čestice i ugljen dioksid pomoću infracrvenog senzora (NDIR - non disperzive infrared), a temperaturu i vlažnost pomoću digitalnog senzora. Rezultati su jasno prikazani na ekranu i to lebdeće čestice PM_{10} u $\mu g/m^3$, lebdeće čestice $PM_{2,5}$ u $\mu g/m^3$, ugljen dioksid u ppm, temperatura u $^{\circ}C$ te relativna vlažnosti u %. Mjerač Trotec BQ 16 je prenosivi uređaj za mjerenje koncentracije formaldehida (HCHO), ukupnih isparljivih organskih spojeva - benzen, trihlorethan, toluen, etil-benzen i ksilen (TVOC- Total Volatile Organic Compounds) u zraku u zatvorenom prostoru koji detektuje koncentracije od 0,01 ppm (ili mg/m^3). Prikazuje rezultate u realnom vremenu i to istovremeno i za formaldehid i za isparljive organske spojeve. Korištenje je jednostavno što podrazumjeva da nakon uključivanja automatski počinje mjerenje i rezultati se očitavaju na LCD ekranu dvostrukog prikaza, jedan za formaldehid, a drugi za isparljive organske spojeve. Uređaji su postavljeni na odabranom prostoru odnosno mjerenje je obavljeno u dvije prostorije (prostorija za dnevni boravak i trpezarija) u trajanju od tri sata i to u svakom satu po jedno mjerenje svakog zračnog polutanta, nakon čega

je izračunata prosječna vrijednost za svaki polutant. Uređaj Trotec BQ 30 je postavljen u nivou dječije glave, a uređaj Trotec BQ 16 na najvišu poziciju u prostoriji po uputstvu proizvođača. Za interpretaciju rezultata korišteni su standardi za kvalitet zraka Svjetske zdravstvene organizacije „Vodič za kvalitet zraka, 2005“ i „Vodič za unutrašnji kvalitet zraka selektiranih polutanata, 2010“, te Uredbe o hemikalijama Evropske Unije (Propisi EU-a o hemikalijama, prehrambenim aditivima, označavanju i razvrstavanju tvari i Njemačkog saveznog ureda za okoliš (WHO, 2005).

Koncentracije PM čestica u zraku zatvorenog prostora sa prosječnim vrijednostima do $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ za PM_{10} i do $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ za $\text{PM}_{2.5}$ su korištene kao referentne vrijednosti za dobar kvalitet zraka zatvorenog prostora (prosječne godišnje koncentracije) (WHO, 2021).

Međutim, pošto nije moguće odrediti koncentracijski prag ispod kojeg koncentracija čestica u okolišu nema uticaja na zdravlje ljudi, preporuka SZO je da koncentracije svih čestica, a posebno $\text{PM}_{2.5}$ čestica u prostorijama trebaju biti što je moguće niže.

Podatke za PM_{10} čestice smo prikazali pomoću EPA (Environment Protection Authority Victoria) AirWatch kategorija kvaliteta zraka (EPA Air Watch, 2025). Uporedili smo podatke o PM_{10} sa nacionalnim standardima kvaliteta zraka. Oni su ugrađeni u državnu politiku zaštite okoliša (kvalitet ambijentalnog zraka) s izuzetkom godišnjeg standarda za PM_{10} , koji je strožiji te iznosi za PM_{10} $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Tabela 1. Kategorije kvaliteta zraka PM_{10} čestica u zraku zatvorenog prostora
(EPA Air Watch, 2025)

Kvalitet zraka	Prosječna satna koncentracija $\text{PM}_{10} \mu\text{g}/\text{m}^3$
Umjeren	< 40
Dobar	40-80
Loš	80-120
Veoma loš	120-300
Izuzetno loš	> 300

* Zbog nepostojanja nacionalnih standarda za satne vrijednosti za polutant PM_{10} , korištene su referentne vrijednosti prema sistemu EPA AirWatch (Environment Protection Authority Victoria, Australija), koji koristi satne prosjeke koncentracija za procjenu kvaliteta zraka (za satne vrijednosti smo koristili vrijednost preko $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ kao pokazatelj lošeg kvaliteta zraka).

Podatke za $\text{PM}_{2.5}$ čestice smo prikazali pomoću EPA (Environment Protection Authority Victoria) AirWatch kategorija kvaliteta zraka (EPA Air Watch, 2025). Uporedili smo podatke o $\text{PM}_{2.5}$ sa nacionalnim standardima kvaliteta zraka. Oni su ugrađeni u državnu politiku zaštite okoliša (kvalitet ambijentalnog zraka). Trenutno ne postoji nacionalni standard za jednosatni prosjek $\text{PM}_{2.5}$.

Tabela 2. Kategorije kvaliteta zraka PM_{2,5} čestica u zraku zatvorenog prostora (EPA Air Watch, 2025)

Kvalitet zraka	Prosječna satna koncentracija PM _{2,5} µg/m ³
Dobar	< 25
Umjeren	25-50
Loš	50-100
Veoma loš	100-300
Izuzetno loš	> 300

* Zbog nepostojanja nacionalnih standarda za satne vrijednosti za polutant PM_{2,5}, korištene su referentne vrijednosti prema sistemu EPA AirWatch (Environment Protection Authority Victoria, Australija), koji koristi satne prosjeke koncentracija za procjenu kvaliteta zraka (vrijednost iznad 50 µg/m³ je korišten triger za 'lošu' kategoriju kvaliteta zraka).

Koncentracije ugljen dioksida u rasponu od 0-800 ppm u zraku zatvorenog prostora korištene su kao referentne vrijednosti za dobar kvalitet zraka zatvorenog prostora, koncentracije CO₂ od 800 do 1500 ppm su pokazatelj slabijeg kvaliteta zraka, dok su koncentracije CO₂ veće od 1500 ppm u zraku zatvorenog prostora pokazatelj lošeg kvaliteta zraka (German Federal Environmental Agency, 2024). Podaci prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Koncentracije ugljen dioksida (CO₂) u zraku zatvorenog prostora (German Federal Environmental Agency, 2024)

Kategorija kvaliteta zraka	Koncentracija CO ₂ ppm
Dobar	< 800
Loš	800-1500
Veoma loš	> 1500

Za intepretaciju rezultata mjerenja vlažnosti zraka korištena je referentna vrijednost za optimalnu relativnu vlažnost zraka od 40-60% (u zimskom period do 70%), a za donju graničnu vrijednost ispod koje postotak vlage u zraku ne smije pasti 30% (Sl.list FBiH, 2021).

Temperatura zraka od 21-24°C (zavisno od namjene prostorije) korištena je kao referentna vrijednost za optimalnu temperaturu zraka u prostorijama u kojima borave djeca predškolskog uzrasta (Sl.list FBiH, 2021).

Koncentracija formaldehida manja od 0,1 mg/m³ u zraku zatvorenog prostora korištena je kao referentna vrijednost za dobar kvalitet zraka zatvorenog prostora za formaldehid (World Health Organization (2010). Prema istraživanjima koje je provela Svjetska zdravstvena organizacija, koncentracija formaldehida u zraku zatvorenog prostora do 0,125 mg/m³ ne izaziva štetan uticaj na zdravlje, čak i kod najosjetljivije populacije.

Koncentracija ukupnih hlapljivih organskih spojeva manja od 0,2 mg/m³ u zraku je korištena kao referentna vrijednost za odličan kvalitet zraka (German Federal Environmental Agency, 2024). Podaci prikazani u tabeli 4.

***Tabela 4. Koncentracije ukupnih isparljivih spojeva u zraku zatvorenog prostora
(German Federal Environmental Agency, 2024)***

Kategorija kvaliteta zraka	Koncentracija TVOC mg/m ³
Odličan	< 0,2
Dobar	0,2-0,5
Dobar, kod osjetljivih može dovesti do iritacije sluznice oka, ždrijela i nosa	0,5-1
Slabiji kvalitet zraka, moguća iritacija sluznice oka, ždrijela i nosa	1-3
Loš	3-10
Izuzetno loš	>10

REZULTATI

Istraživanje je provedeno u 13 vrtića na području grada Tuzla u kojima su izmjerene vrijednosti zračnih polutanata pomoću mobilnog mjerača Trotec BQ 30 za čestice PM₁₀ i PM_{2,5}, CO₂, temperaturu i vlažnost te mobilnog mjerača Trotec BQ 16 za koncentracije formaldehida (HCHO), ukupnih isparljivih organskih spojeva - benzen, trihloretnan, toluen, etil-benzen i ksilen (TVOC- Total Volatile Organic Compounds). Mjerenje je obavljeno u dvije prostorije svakog vrtića (soba za boravak djece i trpezarija). Podaci su prikazani grupno za pojedine zračne polutante u tabeli 5.

Tabela 5. Prosječne vrijednosti parametara mikroklimatskih mjerenja

Datum mjerenja	Naziv vrtića	Naziv prostorije	Prosječne vrijednosti parametara mikroklimatskih mjerenja						
			PM10 (µg/m ³)	PM2,5 (µg/m ³)	CO ₂ (ppm)	Temperatura (°C)	Vlažnost (%)	HCHO (mg/m ³)	TVOC (mg/m ³)
20.01.2025	Vrtić Bambi	Soba za boravak	73	44	1356	23,5	40,9	0,08	0,84
		Trpezarija	140	74	1268	22,06	37,6	0,15	0,86
21.01.2025	Vrtić Ciciban	Soba za boravak	102	59	1526	24,03	37,1	0,1	0,76
		Trpezarija	118	93	1554	27	38	0,16	0,84
22.01.2025	Vrtić Jelenko	Soba za boravak	326	191	1294	24,2	35,9	0,14	0,34
		Trpezarija	374	197	923	22,8	36,3	0,11	0,85
23.01.2025	Vrtić Kolibri	Soba za boravak	105	66	1951	24,4	42,8	0,26	0,53
		Trpezarija	141	83	1324	22,8	49,5	0,27	0,71
24.01.2025	Vrtić Lastavica	Soba za boravak	40	20	1165	26,93	50,2	0,04	0,71
		Trpezarija	17	13	763	24	40,6	0,03	0,29

27.01.2025	Vrtić Pčelica	Soba za boravak	76	48	793	22,6	41,4	0,08	0,86
		Trpezarija	76	50	813	23	37,5	0,06	0,84
28.01.2025	Vrtić Poletarac	Soba za boravak	18	14	1485	25,4	49	0,11	0,82
		Trpezarija	21	12	1401	24,3	48,5	0,096	0,76
29.01.2025	Vrtić Snjeguljica	Soba za boravak	49	39	978	22,9	41,5	0,2	0,63
		Trpezarija	70	44	1034	23,4	39,8	0,11	0,73
30.01.2025	Vrtić Sunčica	Soba za boravak	65	42	1253	24,8	44,7	0,1	0,86
		Trpezarija	85	55	987	26,1	37,3	0,1	0,81
31.01.2025	Vrtić Zeko	Soba za boravak	114	65	1013	22,9	39,3	0,03	0,51
		Trpezarija	132	68	796	23,3	38,6	0,07	0,87
03.02.2025	Vrtić Zvezdica	Soba za boravak	141	82	1176	23,5	44,5	0,2	0,87
		Trpezarija	162	90	1126	23,9	45,8	0,23	0,71
04.02.2025	Vrtić Zvončica	Soba za boravak	59	41	1088	21,2	34,6	0,05	0,77
		Trpezarija	151	101	822	21,13	32	0,02	0,76
05.02.2025	Vrtić Bubamara	Soba za boravak	112	62	1394	23,6	37,2	0,08	0,83
		Trpezarija	78	53	1169	24,9	33,5	0,12	0,82

Prosječna koncentracija čestica $PM_{2,5}$ se kretala od $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (najniža) vrtić Poletarac do $197 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (najviša) vrtić Jelenko. Prema standardima SZO u vrtiću „Poletarac“ koncentracije $PM_{2,5}$ čestica su bile u okviru referentnih vrijednosti za dobar kvalitet zraka, dok su u vrtiću „Jelenko“ koncentracije bile iznad referentnih vrijednosti ovog polutanta za dobar kvalitet zraka. Izmjerena prosječna koncentracija čestica CO_2 je u svim pregledanim vrtićima bila u rangi slabijeg kvaliteta zraka od 800 do 1500 ppm, s tim da je u jednom prekoračila rang dozvoljenih 1500 ppm odnosno kretala u rasponu od 793 ppm (najniža - vrtić Pčelica) do 1951 ppm (najviša - vrtić Kolibri).

U prostorijama vrtića prosječna koncentracija formaldehida se kretala od $0,02 \text{ mg}/\text{m}^3$ u vrtiću „Zvončica“ (najniža) što je u okviru referentnih vrijednosti za odličan kvalitet zraka, dok je koncentracija od $0,27 \text{ mg}/\text{m}^3$ (najviša) izmjerena u vrtiću „Kolibri“, što nije u okviru referentnih vrijednosti za dobar kvalitet zraka, odnosno u devet vrtića je bila u okviru referentnih vrijednosti za dobar kvalitet zraka dok su u 4 vrtića vrijednosti bile u koncentracijama za koje postoji mogućnost da kod osjetljive populacije izazovu iritacije sluznica oka, nosa i ždrijela.

Prosječne koncentracije ukupnih hlapljivih organskih spojeva su iznosile od $0,29 \text{ mg}/\text{m}^3$ (najniža) u vrtiću „Lastavica“ do $0,87 \text{ mg}/\text{m}^3$ (najviša) u vrtiću „Zvezdica“, što predstavlja koncentracije u okviru referentnih vrijednosti za dobar kvalitet zraka, ali kod osjetljivih bi mogla izazvati iritacije.

U prostorijama vrtića temperatura se kretala u okviru optimalnih vrijednosti odnosno od 21°C (najniža) u vrtiću „Zvončica“, dok je jedino u vrtiću „Ciciban“ (najviša) izmjerena temperatura od 27°C , bila iznad referentnih vrijednosti za povoljnu klimu unutar zatvorenog prostora.

Što se tiče vlažnosti u vrtiću „Zvončica“ je izmjerena najniža vrijednosti od 32%, što nije u okviru referentnih vrijednosti, dok je u ostalih 12 vrtića bila u okviru referentnih vrijednosti za povoljnu mikroklimu.

DISKUSIJA

Ljudsko zdravlje i dobrobit ljudi usko su povezani sa stanjem okoliša. Pravo na zdrav zrak u radnom i životnom okruženju je jedno od osnovnih ljudskih prava. Vrtići su radne sredine za djecu koja u njima borave stoga je važno osigurati kvalitetan zrak u smislu očuvanja zdravlja. Nedostatak kontrole kvaliteta zraka u vrtićima može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema tako da je monitoring kvaliteta zraka u vrtićima najbolji način prevencije bolesti. Postoji mnoštvo studija koje su se bavile ispitivanjem kvaliteta unutrašnjeg zraka na zdravlje djece ali ne i školskom i predškolskom okruženju posebno u našem regionu sem Slovenije i Srbije (Bozzola i sar. 2024). U dva vrtića prosječna koncentracija čestica $PM_{2,5}$ je bila u okviru referentnih vrijednosti što se može povezati sa činjenicom da je nije bilo epizoda aerozagađenja.

Prosječna koncentracija čestica PM je u istraživanju u Varšavi je bila povišena iznad standardnih preporuka ali je istraživanje uključilo i korištenje ventilacije koje je bilo poređeno sa datim vrijednostima lebdećih čestica. U Srbiji su rezultati slični našim odnosno prosječne koncentracije PM_{10} čestica u zatvorenom prostoru su bile $70.63 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sa najnižim vrijednostima od $32 \mu\text{g}/\text{m}^3$ do najviših koje su iznosile $103.14 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Prosječne koncentracije $PM_{2,5}$ čestica u zatvorenom prostoru su bile maksimalne od $58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ do minimalnih od $26,88 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Jovanović i sar. 2014).

Kvalitet zraka u vrtićima u Portugalu je pokazao povišene koncentracije sljedećih polutanata: TVOC, CO , O_3 i CO_2 (Oliviera i sar. 2017). Slična istraživanja su rađena u osnovnim, srednjim školama i vrtićima u Koreji sa fokusom na predškolski uzrast djece koja i provode najveći broj sati u zatvorenom prostoru pri čemu su vrijednosti mjerenih parametara bile povišene (Yoon i sar. 2011). Naša istraživanja su pokazala da su prosječne vrijednosti isparljivih organskih polutanata bile u rangu onih koji kod osjetljive populacije mogu uzrokovati nadražujuće simptome gornjeg respiratornog trakta. Loša ventilacija može da poveća broj PM čestica za 100 puta iznad preporučenih vrijednosti i time da pogorša respiratorne bolesti kao što su astma, alergija, sindrom bolesne zgrade (Qiu i sar. 2022). Štetni zdravstveni efekti $PM_{2,5}$ u zatvorenom prostoru značajno su pod uticajem njegovog elementarnog sastava (posebno teških metala). U studiji u Kini procijenjen je kancerogeni i nekancerogene rizik kod 507 petogodišnjaka mjerenjem nivoa frakcionog izdahnutog željeznog azotnog oksida (FeNO), neinvazivnog biomarkera respiratornih simptoma. Procjene zdravstvenog rizika otkrile su da Cr i Mn imaju koeficijent opasnosti > 1 , što ukazuje da predstavljaju nekancerogeni rizik u području istraživanja, što naglašava važnost vršenja monitoringa lebdećih čestica u vrtićima sa fokusom na praćenje i sastava samih čestica u sljedećim studijama (Cheng i sar. 2024). Koncentracije CO_2 su bile povišene u svim vrtićima iznad $800 \text{ mg}/\text{m}^3$ što smo normirali kao slabiji kvalitet zraka, a rezultat je sličan sa istraživanjem rađenim u Slovačkoj gdje u jutarnjim satima u zimskom mjesecu CO_2 bio povećan (Stiborova i sar. 2023). CO_2 kao indikator kvaliteta zraka u zatvorenom prostoru može da bude povišen kao rezultat i fizičke aktivnosti djece a najjednostavnije je reguliše običnom prirodnom ventilacijom. Temperatura prostorije i vlažnost zraka su fundamentalni parametri mikroklimе koji mogu uticati na kvalitet unutrašnjeg zraka u smislu stvaranja povoljne sredine za razvoj bakterija i gljivica u zraku (Vardoulakis i sar. 2020). Osoba se najbolje osjeća u rangu temperature između 20°C do 22°C i relativne vlažnosti $40^\circ - 60^\circ$ (Stiborova i sar. 2023). U našem istraživanju temperatura je bila u rasponu od $21,2^\circ\text{C} - 26,9^\circ\text{C}$ dok je vlažnost bila u jednom vrtiću niža i iznosila je 32%.

ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja podstiču sticanje uvida i monitoring kvaliteta zraka zatvorenog prostora kao osnovu za donošenje i provođenje relevantnih preventivnih mjera. Mjerenjem koncentracija zračnih polutanata zatvorenog prostora možemo pravovremeno zaštititi svoje zdravlje. Poželjno bi bilo obaviti mjerenja u svim privatnim i javnim vrtićima Tuzlanskog kantona.

LITERATURA

1. World Bank (2019). Air Quality Management in Bosnia and Herzegovina. Dostupno na: <http://documents1.worldbank.org/curated/en/117281576515111584/pdf/> Pristupljeno: 20.02.2025.
2. Fuller R, Landrigan PJ, Balakrishnan K et al (2022) Pollution and health: a progress update. *Lancet Planet Health* 6(6):553-547
3. Matkovic V, Mulić M, Azabagić S et al (2020) Premature Adult Mortality and Years of Life Lost Attributed to Long-Term Exposure to Ambient Particulate Matter Pollution and Potential for Mitigating Adverse Health Effects in Tuzla and Lukavac, Bosnia and Herzegovina. *Atmosphere* 11(10):1107
4. Isiugo K, Jandarov R, Cox, J et al (2019) Indoor particulate matter and lung function in children. *Science of The Total Environment*, 663: 408-417
5. Mainka A, Žak M (2022) Synergistic or Antagonistic Health Effects of Longand Short-Term Exposure to Ambient NO₂ and PM_{2.5}: A Review. *Int J Environ Res Public Health* 28(21):14079
6. Buculei I, Dobrin ME, Matei D, Onu I, Vicol C, Cioroiu IB at al (2022) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induced by Smoking and Air Pollution: Correlation with Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Toxics* 10(11):681
7. Yang JH, Strodl E, Wu CA, Yin XN, Wen GM, Sun DL et al (2022) Association between prenatal exposure to indoor air pollution and autistic-like behaviors among preschool children. *Indoor Air*. 32(1):12953
8. Zhu L, Hajeb P, Fauser P et al (2023) Endocrine disrupting chemicals in indoor dust: a review of temporal and spatial trends and human exposure. *Sci Total Environ*. 874:162374
9. Yu Z, Merid SK, Bellander T at al (2023) Associations of improved air quality with lung function growth from childhood to adulthood: the BAMSE study. *Eur Respir J*. 61(5):2201783
10. Zheng K, Zeng Z, Lin Y et al (2023) Current status of indoor dust PBDE pollution and its physical burden and health effects on children. *Environ Sci Pollut Res Int*. 30(8):19642–61
11. Zhou X, Zhang X, Bai G at al (2025) Long-Term Exposure to Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) Components and Precocious Puberty Among School-Aged Children: Cross-Sectional Study. *JMIR Public Health Surveill*. 11:62861
12. World Health Organization (2005) „Guidelines for air quality global update 2005“, Copenhagen, Regional Office for Europe. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-SDE-PHE-OEH-06.02> Pristupljeno:19.02.2025.
13. World Health Organization (2021) „Global air quality guidelines: particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide“. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240034228> Pristupljeno:19.02.2025.
14. EPA (Enviroment Protection Authority Victoria) AirWatch (2025) Dostupno na: <https://www.epa.vic.gov.au/check-air-and-water-quality> Pristupljeno:11.01.2025.

15. Bundesgesundheitsbelehrung, Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz des Umweltbundesamtes (2008) Dostupno na: <http://www.komfortlüftung.at/>
Pristupljeno:11.01.2025.
16. Pravilnik o načinu, postupku i rokovima vršenja periodičnih pregleda i ispitivanja iz oblasti zaštite na radu. Sl.list F BiH br: 23/21
17. World Health Organization (2010) “WHO Guidelines for Indoor Air Quality – Selected Pollutants”, The WHO European Centre for Environment and Health, Bonn Office Dostupno na: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/260127/9789289002134-eng.pdf?sequence=1>
Pristupljeno:06.01.2025.
18. Indoor Air Quality Levels by German Federal Environmental Agency (2024) Weiterentwicklung und Validierung eines leistungsfähigen Verfahrens zur Bestimmung von leicht flüchtigen organischen Verbindungen (VVOC) bei Emissionsmessungen aus Bauprodukten und in der Innenraumluft Dr. Morgane Even, Eleutheria Juritsch, Dr. Matthias Richter Dostupno na: <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/weiterentwicklung-validierung-eines>
Pristupljeno:06.01.2025.
19. Bozzola E, Agostiniani R, Pacifici Noja L, Park J, Lauriola P, Nicoletti T et al (2024) The impact of indoor air pollution on children’s health and well-being: the experts’ consensus. Ital J Pediatr. 50(1):69
20. Jovanović M, Vučićević B, Turanjanin V et al (2014) Investigation of indoor and outdoor air quality of the classrooms at a school in Serbia. Energy.77: 42-48
21. Oliveira M, Slezakova K, Delerue-Matos C, Pereira M et al (2017) Indoor air quality in preschools (3 to 5 year old children) in the Northeast of Portugal during spring-summer season: pollutants and comfort parameters. J Toxicol Environ Health A. 80:740-755
22. Yoon C, Lee K, Park D (2011) Indoor air quality differences between urban and rural preschools in Korea. Environ Sci Pollut Res Int. 18(3):333-45
23. Qiu Y, Zhou Y, Chang Y, Liang X, Zhang H, Lin X et al (2022) The effects of ventilation, humidity and temperature on bacterial growth and bacterial general distribution. Int J Environ Res Public Health.19(22):15345
24. Cheng H et al (2024) Elemental composition and health risks of indoor PM_{2.5} in Taiyuan, China: Associations with fractional exhaled nitric oxide (FeNO) in preschoolers. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal.31(1–2): 69–88
25. Stiborova P et al (2023) Analysis of Indoor Air Quality in a Kindergarten. Slovak Journal of Civil Engineering. 31(2):1-8
26. Vardoulakis S et al (2020) Indoor exposure to selected air pollutants in the Home Environment: a systematic review. Int J Environ Res Public Health.17(23):8972

**PREGLEDNI RADOVI/
REVIEW PAPERS**

ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL EKSTRAKTA KORE PLODA NARA U TERAPIJI HIPERPIGMENTACIJE

Emina Ahmetović¹, Samir Ćurić¹, Laura Divković¹, Belkisa Djedović¹, Ajla Džafić¹, Amina Hasikić¹, Sumea Haušić¹, Hedija Starčević¹, Maida Šljivić Husejnović¹, Merima Ibišević¹

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

Pregledni rad

SAŽETAK

Poremećaji pigmentacije kože sve su češći estetski problem. Trenutno su biljni ekstrakti i njihovi sekundarni metaboliti predmet intenzivnog istraživanja u cilju pronalaženja što efikasnijeg načina liječenja. Kora ploda nara (*Pericarpium Granati*) se nerijetko svrstava u biološki otpad, međutim bogata je mnogobrojnim bioaktivnim komponentama koje potencijalno mogu biti značajne u farmakoterapiji hiperpigmentacija ali i mnogih drugih patoloških stanja. Shodno dosadašnjim istraživanjima poznato je da je kora ploda nara izuzetan rezervoar antioksidanasa, polifenola, dijetalnih vlakana i vitamina. Zahvaljujući velikoj zastupljenosti inhibitora karboanhidraze dokazano je da kora ploda nara ima antikancerogeno, antimikrobno, antiinflamatorno, regenerativno i antimutageno dejstvo. Elaginska kiselina, galna kiselina, elagitanin, punikalin i punikalagin predstavljaju fenolna jedinjenja prisutna u kori ploda nara te pokazuju značajne antioksidativne efekte. Primjena ekstrakta kore ploda nara u formulacijama za tretman hiperpigmentacije opravdava se prisustvom elaginske kiseline koja predstavlja najpotentnije polifenolno jedinjenje. Mehanizmi putem kojih elaginska kiselina ostvaruje svoje djelovanje obuhvataju inhibiciju melanogeneze, indukciju autofagije i smanjenje produkcije melanina. Također, smanjuje proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta u UVA ozračenim keratinocitima aktivirajući različite antioksidativne puteve. Ovaj rad temelji se na istraživanju antioksidativnih potencijala sastojaka ekstrakta kore ploda nara kao mogućeg sastojka polučvrstih formulacija za farmakoterapiju hiperpigmentacija.

Ključne riječi: ekstrakt kore ploda nara, hiperpigmentacija, antioksidativni efekat, polifenolne komponente, elaginska kiselina

Autor za korespondenciju: Hedija Starčević
E-mail: hedija.starcevic@untz.ba

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF POMEGRANATE PEEL EXTRACT IN HYPERPIGMENTATION THERAPY

Emina Ahmetović¹, Samir Ćurić¹, Laura Divković¹, Belkisa Djedović¹, Ajla Džafić¹, Amina Hasikić¹, Sumea Haušić¹, Hedija Starčević¹, Maida Šljivić Husjenović¹, Merima Ibišević¹

*¹Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića8, 75000 Tuzla,
Bosnia and Herzegovina*

Review paper

ABSTRACT

Skin pigmentation disorders are an increasingly common aesthetic problem. Currently, plant extracts and their secondary metabolites are the subject of intensive research to find the most effective way of treatment. Pomegranate peel (*Pericarpium Granati*) is often classified as biological waste, but it is rich in numerous bioactive components that can potentially be significant in the pharmacotherapy of hyperpigmentation and many other pathological conditions. Based on previous research, it is known that pomegranate peel is an exceptional reservoir of antioxidants, polyphenols, dietary fiber and vitamins. Thanks to the large presence of carbonic anhydrase inhibitors, it has been proven that pomegranate peel has anticancer, antimicrobial, antiinflammatory, regenerative and antimutagenic effects. Ellagic acid, gallic acid, ellagitanin, punicalin and punicalagin are phenolic compounds present in the peel of pomegranate and show significant antioxidant effects. The use of pomegranate peel extract in formulations to treat hyperpigmentation is justified by the presence of ellagic acid, which represents the most potent polyphenolic compound. The mechanisms by which ellagic acid exerts its action include the inhibition of melanogenesis, the induction of autophagy and the reduction of melanin production. Also, it reduces the production of reactive oxygen species in UVA-irradiated keratinocytes by activating various antioxidant pathways. This work is based on the research of the antioxidant potential of the ingredients of pomegranate peel extract as a possible ingredient of semi-solid formulations for the pharmacotherapy of hyperpigmentation.

Key words: *pomegranate peel extract, hyperpigmentation, antioxidant effect, polyphenolic components, ellagic acid*

Corresponding author: Hedija Starčević
E-mail: hedija.starcevic@untz.ba

UVOD

Koža je najveći organ u tijelu i ima temeljnu ulogu u ravnoteži vode, regulaciji tjelesne temperature i zaštiti od stranih agenasa i ultraljubičastog zračenja. Pigmentni sistem je bitan dio ovih funkcija i odgovoran je za varijacije u osobinama boje kože unutar i između populacija. Dvije glavne vrste stanica čine epidermis kože: melanociti su ćelije izvedene iz nervnog grebena koje proizlaze iz dermalne melanoblastne linije koje migriraju u epidermu tokom embrionalnog razvoja, keratinociti kontinuirano proliferiraju, migriraju i diferenciraju se prema gornjim slojevima epiderme, formirajući pet slojeva ili slojeva: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* i *stratum corneum*. Ovih pet slojeva ima samo u debeloj koži, dok se u tankoj koži, koja pokriva veći dio ljudskog tijela, *stratum lucidum* ne opaža (Moreiras i sar., 2021). Melanociti su raspršeni po bazalnom sloju i mogu proširiti dendrite u kontakt sa do 40 keratinocita, formirajući "epidermalno-melaninske jedinice". Funkcija melanocita je da sintetiziraju pigment melanin, a zatim ga prenose do keratinocita (Bento-Lopes i sar., 2023). Unutar keratinocita, melanin se akumulira u supranuklearnoj regiji, štiteći nuklearni genetski materijal od oštećenja izazvanih ultraljubičastog zračenja (Moreiras i sar., 2021). Postoje dvije vrste melanina: crni/smeđi eumelanin i žuto/crveni feomelanin. Oni se sintetiziraju u melanocitima unutar melanosoma, koji su organele povezane s lizozomima (LRO), budući da potiču iz endosoma, sadrže lizozomske markere i kisele su u ranim fazama svoje biogeneze (Bento-Lopes i sar., 2023). Pigmentacija kože je rezultat tri različita procesa:

- a) biogeneza melanina i transport unutar melanocita,
- b) transfer melanina iz melanocita u keratinocite;
- c) internalizacija i procesiranje melanina od strane keratinocita (Moreiras i sar., 2021).

Poremećaji pigmentacije

Poremećaji pigmentacije mogu biti široko rasprostranjeni i zahvatiti mnoge dijelove kože, ili mogu biti lokalizirani i zahvatiti samo određene dijelove kože. Promjene pigmentacije koje uzrokuju nazivaju se:

1. Depigmentacija je potpuni gubitak pigmenta. Koža je bijela. Široko rasprostranjena depigmentacija javlja se kod vitiliga.
2. Hipopigmentacija je abnormalno niska količina melanina. Koža je svjetlije boje od normalne (na primjer, svjetlija nego na područjima kože koja nisu zahvaćena). Široko rasprostranjena hipopigmentacija kože javlja se kod albinizma. Hipopigmentacija također može biti uzrokovana: prethodne povrede kože, kao što su plikovi, čirevi, opekotine, izlaganje hemikalijama ili infekcija kože, upalna stanja kože koja su zarasla (kao što je atopijski dermatitis ili psorijaza) i rijetka nasljedna stanja.
3. Hiperpigmentacija je obično uzrokovana abnormalno visokom količinom melanina, ali ponekad je uzrokovana taloženjem drugih pigmentiranih supstanci koje inače nisu prisutne u koži. Koža je tamnije boje i ponekad je drugačije boje od kože na nezahvaćenim područjima. Hiperpigmentacija može biti uzrokovana: poremećaji koji uzrokuju upalu, lijekovi ili supstance, izloženost sunčevoj svjetlosti i rak (Shinjite Das, 2024).

Hiperpigmentacija

Najčešći uzrok hiperpigmentacije je izlaganje suncu koje snažno stimulira proizvodnju melanina. Nedavna studija je pokazala kako rano izlaganje suncu može pogoršati tamne mrlje, čineći ih sličnim melazmi, postinflamatornim i staračkim pjegama. Dva primjera hiperpigmentacije uzrokovane

hormonskim faktorima su kloazma i melazma. Utvrđeno je da su za ovu bolest, koja preovlađuje kod žena, krivi ženski polni hormoni estrogen i progesteron, koji pospješuju stvaranje melanina kada je tijelo izloženo suncu. Hormonska nadomjesna terapija ima neželjeni učinak hiperpigmentacije (Thawabteh i sar., 2023).

Žarišna hiperpigmentacija je najčešće postinflamatorna, a može nastati nakon ozljede (npr. posjekotine i opekline) ili drugih uzroka upale (npr. akne, lupus). Žarišna linearna hiperpigmentacija se obično pojavljuje zbog fitofotodermatitisa, fototoksične reakcije do koje dolazi zbog interakcije ultraljubičastog zračenja i psoralena (posebice furokumarina) u biljkama (npr. u limeti, peršinu, celeru). Žarišna hiperpigmentacija također može nastati zbog pojave tumorskih procesa (npr. lentigines, melanom), melazme, pjega ili caffè-au-lait makula. Acanthosis nigricans dovodi do pojave žarišne hiperpigmentacije i plakova baršunastog izgleda najčešće smještenih na koži pazuha i stražnje strane vrata (Shinjite Das, 2024).

Difuzna hiperpigmentacija može nastati uslijed uzimanja različitih lijekova, a također i zbog različitih sistemskih i neoplastičnih bolesti (posebno karcinoma pluća i melanoma koji zahvaćaju i ostale organske sisteme). Nakon isključenja lijekova kao uzroka pojave difuzne hiperpigmentacije, potrebno je provesti ciljanu dijagnostičku obradu bolesnika radi pronalaženja najčešćih sistemskih uzroka. Ti uzroci su Addisonova bolest, hemohromatoza i primarni bilijarni kolangitis. Promjene na koži nemaju dijagnostički značaj pa stoga nije nužno učiniti biopsiju kože. Ciljana obrada različitih organskih sistema je poželjna kako bi se pronašao eventualni neoplastični uzrok pojave promjena na koži (Shinjite Das, 2024).

Hiperpigmentacija uzrokovana lijekovima i teškim metalima

Određeni lijekovi i teški metali mogu uzrokovati hiperpigmentaciju kože, pri čemu boja promjena varira ovisno o tvari koja se akumulira u tkivima. Hiperpigmentacije uzrokovane lijekovima obično su difuzne. Mehanizmi pojave uključuju:

- Povećana količina melanina u epidermisu (izgled je više smeđe boje)
- Melanin u epidermis i gornjem dermisu (uglavnom smeđa uz naznake sive ili plave)
- Povećanje melanina u dermisu (više sivkasta ili plava)
- Dermalno taloženje lijeka, metabolita, ili kombinacije lijeka s melaninom (obično plavkasto siva) (Shinjite Das, 2024)

Među najčešćim uzročnicima su:

- **Lijekovi:** amiodaron, hidrokinon, antimalarici, tetraciklinski antibiotici, fenotiazini, neki lijekovi za hemoterapiju i triciklički antidepresivi.
- **Teški metali:** srebro, zlato, živa, arsen.

Boja hiperpigmentacije može varirati – od ljubičaste, plavkasto-crne i žućkastosmeđe do različitih nijansi plave, srebrne i sive. Osim kože, pigmentacija može zahvatiti zube, nokte, bjeloočnice i sluznice. Liječenje hiperpigmentacije izazvane lijekovima prvenstveno podrazumijeva prekid uzimanja odgovornog lijeka. Nakon toga, hiperpigmentacija može vrlo sporo blijediti, a u nekim slučajevima može i trajati duže vrijeme. Budući da mnogi lijekovi koji uzrokuju pigmentaciju kože također izazivaju fotosenzitivne reakcije, pacijentima se preporučuje izbjegavanje izlaganja suncu kako bi se spriječilo pogoršanje stanja (Shinjite Das, 2024).

HEMIJSKE OSOBINE I FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA EKSTRAKTA KORE PLODA *PUNICA GRANATUM*

Kore ploda nara prepoznaju se po tvrdom štitu perikarpa koji zadržava narandžastu i zelenkastu boju kada sazri. Kora prekriva ariluse koji su podijeljeni laganom membranom unutar kore (Ko K i sar., 2021). *Punica granatum* je član porodice Punicaceae koja dijeli svoju botaničku porodicu samo sa *Punicom protopunicom*. Kora ploda nara je bogat rezervoar antioksidansa, polifenola, dijetalnih vlakana i vitamina, koji doprinose njegovoj izuzetnoj bioaktivnosti (Viuda-Martos i sar., 2010). Prema različitim istraživanjima dokazano je da perikarp *Punica granatum* sadrži sedam visoko aktivnih inhibitora karboanhidraze (CA), a to su punicalin, punikalagin, granatin B, galagildilakton, punikalagin, pedunculagin i tellimagrandin. Zahvaljući njima kora ploda nara ima antikancerogeno, antimikrobno, antiinflamatorno, regenerativno i antimutageno dejstvo. Nadalje, kore ploda nara sadrže i složene polisaharide i minerale, kao što su natrij, kalij, kalcij, fosfor, dušik i magnezij. Alkaloidi poput peletierina spominjani su kao integrativni dio kore ploda nara, ali je njihovo prisustvo još uvijek kontroverzno (Arun N, 2012).

Farmakološka svojstva ekstrakta kore ploda *Punica granatum*

Antimikrobna svojstva

Prema fitohemijskim istraživanjima, kora ploda nara sadrži moćne inhibitore, kao što su flavonoidi i fenolna jedinjenja (Rosas-Burgos i sar., 2017). Dobro je poznato da različita polifenolna jedinjenja mogu djelovati sinergistički kako bi inhibirali rast mikroorganizama. Ova jedinjenja funkcionišu kao antiinfektivni formiranjem kompleksa sa ekstracelularnim i rastvorljivim proteinima koji se nalaze u ćelijskim zidovima mikroba, koji precipitiraju membranske proteine i inhibiraju enzime kao što su glikozil transferaze, čime se razgrađuju mikroorganizmi (Skenderidis i sar., 2019). Na osnovu istraživanja pokazalo se da *Salmonelu* i gram-pozitivnu *S. aureus* jako inhibira ekstrakt kore ploda nara, koji ima snažan antimikrobni učinak na sve bakterije.

Antiinflamatorna svojstva

Dobro je poznato da upala služi kao odbrambeni mehanizam domaćina od infekcije i oštećenja tkiva, pomažući ili da se zaustavi širenje infekcije ili ubrza proces ozdravljenja. Upalni proces uključuje različite vrste ćelija i medijatore koji imaju visoko programirane sposobnosti da kontrolišu ćelijske hemotakse, migraciju i proliferaciju. Mehanizam antiinflamatornog dejstva se zasniva na smanjenju proinflamatornih citokina, modificiranju MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) signalizacije i inhibiranju proizvodnje ciklooksigenaze-2 i inducibilne sintaze azot oksida, što sve pruža dokaze o njihovom potencijalu kao moćnih protuupalnih spojeva (Singh Y i sar., 2023).

Antioksidativna svojstva

Smatra se da su brojne hronične bolesti uzrokovane reaktivnim kisikovim vrstama (ROS), a vjeruje se da nastaju kao rezultat izlaganja jonizujućem ili ksenobiotskom zračenju ili kao rezultat normalnih ćelijskih aktivnosti. Različita istraživanja antioksidativnih karakteristika punikalina, punikalagina i elaginske kiseline dobijene iz kore ploda nara pokazuju da je ekstrakt kore ploda nara efikasan u ublažavanju oksidativnog stresa, potencijalne metaboličke regulacije i pružanju antioksidativne zaštite

(Asadi MS i sar., 2018). Mehanizam koji obezbjeđuje antioksidativna svojstva ogleda se u tome da jedinjenja povećavaju aktivnost superoksid dismutaze i glutation peroksidaze i smanjuju nivoe malondialdediha zajedno sa ekspresijom mRNA proinflamatornih faktora u jetri, plazmi i crijevima (Singh Y i sar., 2023).

Kardio-protektivna svojstva

Kardiovaskularne bolesti (KVB) su grupa bolesti koje utiču na srca i krvnih arterija i vodeći je uzrok smrti u svijetu. Različita istraživanja pokazuju da elaginska kiselina i punikalagin ispoljavaju kardio-protektivno dejstvo. Polifenoli kore ploda nara, odnosno elaginska kiselina i punikalagin povećavaju ukupni sadržaj žučne kiseline i smanjuju sadržaj ukupnog holesterola, što rezultira efektima snižavanjem lipida (Razani Z i sar., 2017). Uočeno je smanjenje inflamatornog citokina TNF i povećanje protuupalnog interleukina 6. Uočeno je povećanje lezije kolagena i eferocitoze (Singh Y i sar., 2023).

Antikancerogena svojstva

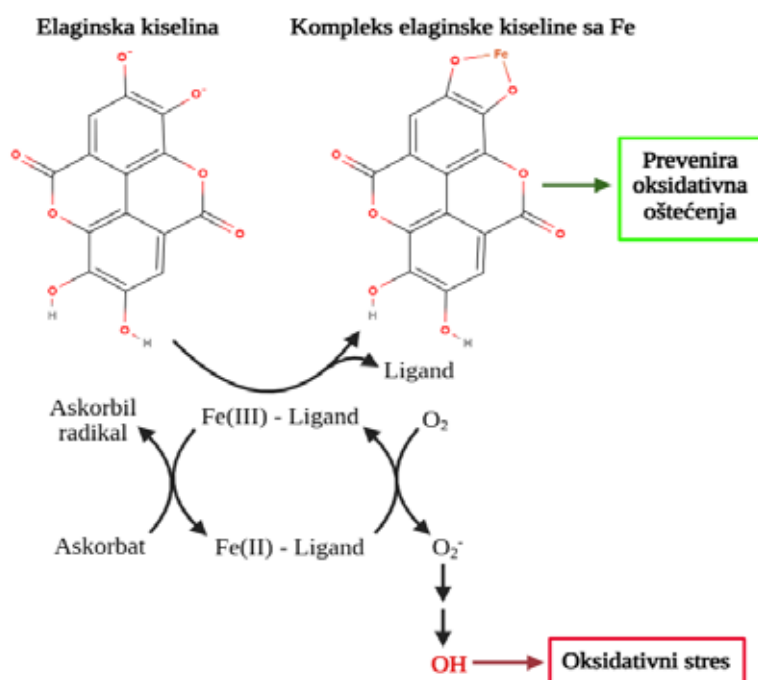
Prema naučnim istraživanjima, kora ploda nara može biti korisna u prevenciji i liječenju raka dojke, prostate, pluća i raka kože. Ekstrakt kore ploda nara smanjuje dotok krvi u tumore, izgladnjujući ih i smanjujući se njih. Također smanjuje reprodukciju ćelija raka i može ubrzavati proces apoptoze (Li Y i sar., 2016). Različite istraživanja su dovela do saznanja da je uočena inhibicija proliferacije stanica, promicanje apoptoze zajedno s fragmentacijom jezgre i smanjenjem stanica. Uočena su smanjena invazija i pokretljivost zbog smanjene ekspresije matriksnog metaloproteina 9 (Singh Y i sar., 2023).

ANTIOKSIDATIVNI EFEKAT FENOLNIH JEDINJENJA PRISUTNIH U KORI NARA (LAT. *PUNICA GRANATUM*)

Fenolna jedinjenja prisutna u kori nara (lat. *Punica granatum*), poput elaginske kiseline, galne kiseline, elagitanina, punikalina, punikalagina 1 i 2, te flavonoida, pokazuju značajne antioksidativne efekte (Mandić-Kovačević i sar., 2023) (Dalvi i sar., 2017). Antioksidativni efekti ovih jedinjenja ogledaju se u njihovoj sposobnosti formiranja kompleksa sa metalnim jonima te uklanjanju slobodnih radikala koji vode oksidativnom stresu. Studije su pokazale da elaginska kiselina koja je nosilac antioksidativne aktivnosti ekstrakta kore ploda nara može formirati komplekse sa nekoliciom metalnih jona poput Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} i Cu^{2+} (Dalvi, 2017) [Slika 1.]. Elaginska kiselina također djeluje kao helator bakra iz aktivnog centra enzima tirozinaze, te inhibira melanogenezu u melanocitima (Yang i sar., 2021).

Elaginska kiselina kao najpotentnije polifenolno jedinjenje kore ploda nara pokazuje dva osnovna principa djelovanja koji opravdavaju primjenu ekstrakta kore ploda nara u kozmetičkim formulacijama za tretman hiperpigmentacije. Djelovanjem na melanocyte potiskuje aktivnost enzima tirozinaze i melanogenezu suzbijanjem cAMP- posredovanih CREB (eng. cAMP response element binding protein; CREB vezujući protein) i MITF (eng. microphthalmia-associated transcription factor; mikrofthalmija povezani transkripcijski faktor) signalnih mehanizama u α -MSH stimuliranim B16F10 ćelijama melanoma (Yang, 2021). Enzim tirozinaza katalizira reakciju hidroksilacije tirozina do 3,4-dihidroksifenilalanina (DOPA), a zatim i pretvorbu DOPA – e do dopahinona kao

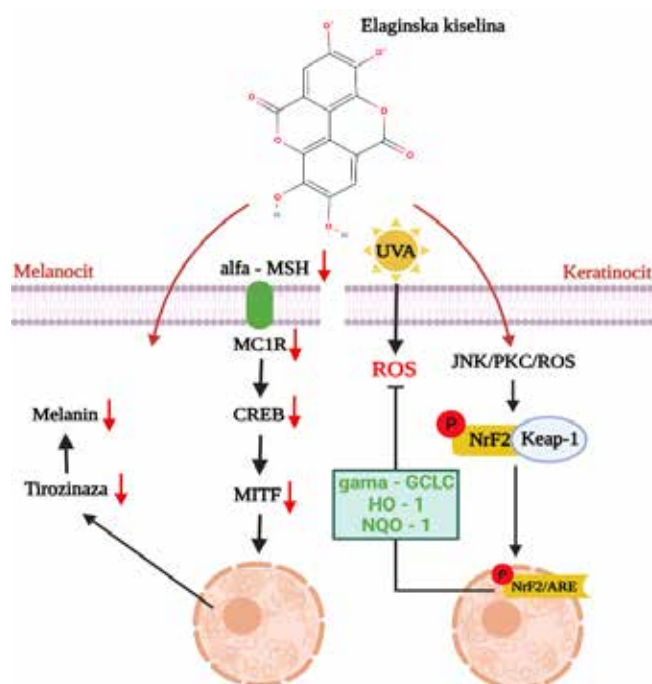
Slika 1. Formiranje kompleksa elaginske kiseline sa Fe (II) jonima čime se preveniraju oksidativna oštećenja nastala stvaranjem hidroksil radikala (Dalvi, 2017)



ključnog intermedijera u sintezi melanina. Varijacije u aktivnosti tirozinaze općenito se pripisuju različitim stepenima i mehanizmima melanogeneze u različitim etničkim grupama (Maeda, 1997) [Slika 2.]. Elaginska kiselina svoje antimelanogene efekte pokazuje i kroz indukciju autofagije u ćelijama melanoma, pri čemu djeluje na ključne korake u biogenezi melanina. Smatra se da upravo dermatofarmaceutici sa bioaktivnim komponentama poput elaginske kiseline ili transeksamične kiseline koje djeluju putem indukcije autofagije i smanjenja produkcije melanina, predstavljaju budućnost u farmakoterapiji hiperpigmentacije (Cho i sar., 2017) (Yang i sar., 2021).

Elaginska kiselina djeluje i na UVA (320–400 nm) ozračene keratinocyte u kojima potiskuje proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta i efekte nastale djelovanjem α -MSH (povećana produkcija pod djelovanjem UVA). Prvenstveno vodi aktivaciji JNK (eng. c-Jun N-terminal Kinase; c-Jun N terminalna kinaza), PKC (eng. Protein kinase C; protein kinaza C) i ROS puteva a zatim jedarnoj translokaciji Nrf2 transkripcijskog faktora. Nrf2 povećava ekspresiju antioksidativnih proteina γ -GCLC (eng. Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit; glutamat cistein ligaza katalitička podjedinica), HO-1 (eng. haemoxygenase1; hem oksigenaza 1) i NQO-1 (eng. NAD(P)H quinone acceptor oxidoreductase1; NAD(P)H hinon akceptor oksidoreduktaza 1) koji preveniraju oksidativni stres indukovani ROS, te inhibiraju aktivaciju melanokortin-1 receptora (MC1R) potaknutu sa α -MSH. [Slika 2.] Smatra se i da elaginska kiselina sprečava UVB-induciranu upalnu kaskadu smanjenjem sinteze proupalnih medijatora kao što su IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF, te povećanjem sinteze IL-10, koji ima antiinflamatornu ulogu u keratinocitima (Yang i sar., 2021).

Osim elaginske kiseline, galna kiselina i punikalagin 1 i 2 pokazuju značajne antiinflamatorne efekte kroz inhibiciju produkcije lipopolisaharid (LPS) induciranog azot oksida (NO), prostaglandina E2 (PGE-2) i interleukina 6 (IL-6), u čemu se ogleda značaj ovih jedinjenja u tretmanu hiperpigmentacije potaknute faktorima zapaljenja (Dimitrijević i sar., 2024).



Slika 2. Efekti elaginske kiseline na melanocite i keratinocite. Alfa-MSH – alfa melanocit stimulirajući hormon (eng. alpha-melanocyte stimulating hormone); MC1R – melanokortin-1 receptor (eng. melanocortin-1 receptor); CREB – CREB vezujući protein (eng. cAMP response element binding protein); MITF – mikroftalmija povezani transkripcijski faktor (eng. microphthalmia-associated transcription factor); JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (eng. c-Jun N-terminal Kinase); PKC – protein kinaza C (eng. proteinkinase C); ROS – reaktivne kiseonične vrste (put reaktivnih kiseoničnih vrsta); Nrf2 – nuklearni faktor E2– srodni faktor 2 (transkripcijski faktor, eng. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2); Keap-1 – protein 1 povezan sa ECH – om sličan Kelchu (eng. Kelch-like ECH-associated protein 1); ARE – element koji odgovara na antioksidanse (eng. antioxidant responsive element); gama-GCLC – glutamat cistein ligaza katalitička podjedinica (eng. Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit); HO-1 – hemoksigenaza 1 (eng. Haemoxygenase 1); NQO-1 – NAD(P)H hinon akceptor oksidoreduktaza 1 (eng. NAD(P)H quinone acceptor oxidoreductase 1) (Yang i sar., 2021)

ZAKLJUČAK

Ekstrakt kore ploda nara (lat. *Punica granatum*) predstavlja značajan prirodni izvor fenolnih jedinjenja sa potencijalnom primjenom u tretmanu hiperpigmentacija različite etiologije. Ključne aktivne supstance poput elaginske kiseline, galne kiseline, punikalina i punikalagina, pokazuju snažna antioksidativna, antiinflamatorna i depigmentirajuća svojstva. Njihovo djelovanje temelji se na neutralizaciji slobodnih radikala, inhibiciji tirozinaze i regulaciji signalnih puteva uključenih u melanogenezu. Posebno se ističe elaginska kiselina, koja putem kompleksiranja sa metalnim jonima i heliranja bakra inhibira ključne enzime u sintezi melanina. Osim što smanjuje oksidativni stres u keratinocitima, ona djeluje i na inflamatorne procese. Takođe, inducira autofagiju u melanocitima, čime dodatno doprinosi regulaciji pigmentacije kože. Pored direktnog uticaja na melanogenezu, ekstrakt kore ploda nara pruža zaštitu od UV zračenja, smanjujući fotoindukovanu melanogenezu putem regulacije JNK, PKC i ROS puteva.

Jasno je naglašen potencijal ekstrakta kore ploda nara kao efikasnog prirodnog sastojka u formulacijama za tretman hiperpigmentacije. Njegova multifunkcionalna svojstva pružaju osnovu za buduća istraživanja i razvoj dermatoloških preparata sa ciljem smanjenja pigmentnih nepravilnosti i poboljšanja zdravlja kože.

LITERATURA

1. Arun N, Singh D.P. (2012) Punica granatum: A review on pharmacological and therapeutic properties, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(5): 1240-1245 [26.02.2025]
2. Asadi MS, Mirghazanfari SM, Dadpay M, Nassireslami E. (2018) Evaluation of wound healing activities of pomegranate (*Punica granatum*-Lythraceae) peel and pulp, *Journal of Research in Medical and Dental Science*. 6(3):230-236. DOI: 10.24896/jrmds.20186336 [26.02.2025]
3. Bento-Lopes, L., Cabaço, L. C., Charneca, J., Neto, M. V., Seabra, M. C., & Barral, D. C. (2023). Melanin's journey from melanocytes to keratinocytes: Uncovering the molecular mechanisms of melanin transfer and processing. *International journal of molecular sciences*, 24(14), 11289. [05.03.2025.]
4. Cho YH, Park JF, Lim DS, Lee JS (2017). Tranexamic acid inhibits melanogenesis by activating the autophagy system in cultured melanoma cells. *J. Dermatol. Sci.* 88(1):96-102. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.05.019>. [19.2.2025.]
5. Dalvi LT, Moreira DC, Andrade R, Ginani J, Alonso A, Hermes-Lima M (2017). Ellagic acid inhibits iron-mediated free radical formation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 137: 910-917. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.10.034>. [19.2.2025.]
6. Dimitrijević J, Tomović M, Bradić J, Petrović A, Jakovljević V, Andjić M, Živković J, Milošević SD, Simanić I, Dragicević N (2024). Punicagranatum L. (Pomegranate) Extracts and Their Effects on Healthy and Diseased Skin. *Pharmaceutics*. 16:458. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16040458>. [22.2.2025.]
7. Ko K, Dadmohammadi Y, Abbaspourrad Y (2021) Nutritional and bioactive components of pomegranate waste used in food and cosmetic applications: A review
8. Li Y, Ye T, Yang F, Hu M, Liang L, He H, Li Z, Zeng A, Li Y, Yao Y, Xie Y.(2016) Punica granatum (pomegranate) peel extract exerts potent antitumor and anti-metastasis activity in thyroid cancer. *RSC Adv.* 6(87):84523-84535. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c6ra13167k> (26.2.2025)
9. Maeda K, Yokokawa Y, Hatao M, Naganuma M, Tomita Y (1997). Comparison of the melanogenesis in human black and light brown melanocytes. *J. Dermatol. Sci.* 14(3):199-206. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(96\)00575-0](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(96)00575-0). [19.2.2025.]
10. Mandić-Kovačević N, Kukrić Z, Latinović S, Cvjetković T, Šobot T, Bajić Z, Maličević U, Marinković S, Đukanović Đ, Uletilović S, Suruć R (2023). Antioxidative Potential of Pomegranate Peel Extract: In Vitro and In Vivo Studies. *Scr Med.* 54(1):9-18. DOI: 10.5937/scriptamed54-43453. [21.2.2025.]
11. Moreiras, H., Seabra, M. C., & Barral, D. C. (2021). Melanin transfer in the epidermis: The pursuit of skin pigmentation control mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4466. [05.03.2025.]

12. Razani Z, Dastani M, Kazerani HR.(2017) Cardioprotective effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice in patients with ischemic heart disease. *Phytother. Res.* 31(11):1731-1738. DOI: [10.1002/ptr.5901](https://doi.org/10.1002/ptr.5901) [27.2.2025.]
13. Rosas-Burgos E.C, Burgos-Hernández A, Noguera-Artiaga L, Kačaniová M, Hernández-García F, Cárdenas-López J.L, Carbonell-Barrachina Á.A (2017). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. *J.Sci.Food Agric.* 97,802–810 [27.2.2025]
14. Shinjite Das, MD., (2024). Hiperpigmentacije. HeMED. Dostupno na: <https://www.hemed.hr/Default.aspx?sid=12448#toc-lentigines> [05.03.2025.]
15. Shinjite Das, MD., (2024). Overview of Skin Pigment. Merck Manuals. Dostupno na: <https://www.merckmanuals.com/home/skin-disorders/pigment-disorders/overview-of-skin-pigment> [05.03.2025.]
16. Singh, J., Prasad, R., Kaur, H. P., Jajoria, K., Chahal, A. S., Verma, A., Kara, M., Assouguem, A., & Bahhou, J. (2023). Bioactive Compounds, Pharmacological Properties, and Utilization of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Comprehensive Review: <http://www.doi.org/10.26538/tjnpr/v7i9.2>. *Tropical Journal of Natural Product Research (TJNPR)*, 7(9), 3856-3873. <https://tjnpr.org/index.php/home/article/view/2586> [5.3.2025]
17. Skenderidis P, Mitsagga C, Giavasis I, Petrotos K, Lampakis D, Leontopoulos S, Hadjichristodoulou C, Tsakalof A (2019) The in-vitro antimicrobial activity assessment of ultrasound assisted *Lycium barbarum* fruit extracts and pomegranate fruit peels. *J. Food Meas. Charact.* 13, 2017– 2031, DOI: 10.1007/s11694-019-00123-6 <https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-019-00123-6> (26.2.2025)
18. Thawabteh, A. M., Jibreen, A., Karaman, D., Thawabteh, A., & Karaman, R. (2023). Skin pigmentation types, causes and treatment—a review. *Molecules*, 28(12), 4839. [05.03.2025.]
19. Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez J.A, (2010) Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 635–654 DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x> [26.02.2025]
20. Yang HL, Lin CP, Gowrisankar YV, Huang PJ, Chang WL, Shrestha S, Hseu YC (2021). The anti-melanogenic effects of ellagic acid through induction of autophagy in melanocytes and suppression of UVA-activated α -MSH pathways via Nrf2 activation in keratinocytes. *Biochemical Pharmacology*. 185:114454. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114454>. [19.2.2025.]

PRIMJENA CRISPR/CAS9 TEHNOLOGIJE U TERAPIJI RAKA DOJKE

Amina Hasikić*

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

Pregledni rad

SAŽETAK

Rak dojke je maligno oboljenje sa najvećom incidencom i najvećom stopom mortaliteta od svih malignih oboljenja među ženama. Različite terapijske strategije su korištene u svrhu efikasnog tretmana malignih neoplazija, poput hirurških zahvata, radioterapije, imunoterapije, hormonalne terapije, hemoterapije i biološke terapije. Budućnost u liječenju raka dojke predstavlja individualni pristup pacijentima, gensko mapiranje i genska terapija koja se zasniva na alatima koji omogućavaju efikasno i jednostavno uređivanje gena. Jedna od najpotentnijih metoda za uređivanje gene jeste CRISPR/Cas9 tehnologija. CRISPR/Cas9 tehnologija u terapiji raka dojke omogućava selektivno i specifično uređivanje gena koji su opisani kao onkogeni ili tumor supresorni geni, a koji omogućavaju malignu proliferaciju i diferencijaciju.

Ključne riječi: rak dojke, uređivanje gena, CRISPR/Cas9

Autor za korespondenciju: Amina Hasikić

E-mail: amina.hasikic@untz.ba

APPLICATIONS OF CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY IN BREAST CANCER THERAPY

Amina Hasikić*

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

Review paper

SUMMARY

Breast cancer is a malignant disease with the highest incidence and the highest mortality rate of all malignancies among women. Various therapeutic strategies have been used to effectively treat malignant neoplasms, such as surgical interventions, radiotherapy, immunotherapy, hormonal therapy, chemotherapy, and biological therapy. The future of breast cancer treatment lies in an individualized approach to patients, genetic mapping, and gene therapy, which is based on tools that enable efficient and simple gene editing. One of the most potent methods for gene editing is the CRISPR/Cas9 technology. CRISPR/Cas9 technology in breast cancer therapy allows selective and specific editing of genes described as oncogenes or tumor suppressor genes, which drive malignant proliferation and differentiation.

Key words: *breast cancer, gene editing, CRISPR/Cas9*

Corresponding author: Amina Hasikić
E-mail: amina.hasikic@untz.ba

UVOD

Rak dojke je najčešći uzrok smrti povezane s rakom među ženama. Osim što je češći kod žena, sa približno 28% novih slučajeva raka, izvještavani su i relativno rijetki slučajevi kod muškaraca. (Siegel, 2022) U 2018. godini, 2.1 miliona žena dijagnosticirano je s rakom dojke u 185 zemalja, što čini 25% novih slučajeva, a procjenjuje se da će taj broj porasti na otprilike 3.2 miliona do 2050. godine. Osim toga, gotovo 630 000 smrti pripisuje se raku dojke, što čini otprilike 6.6% svih smrtnih slučajeva povezanih s rakom širom svijeta. (Bray, 2018; Ahmed, 2021) Nekolicina faktora se povezuje sa povećanim rizikom od razvoja raka dojke, uključujući način i stil života (kao što su prekomjerna težina, nedostatak fizičke aktivnosti, smanjen unos nutritivno značajnih namirnica i konzumacija alkohola), genetski faktori koji uključuju gene poput BRCA1/2, PALB2, ATM, CHEK2, RAD51C, BARD1, TP53, hormonalni faktori (kao što su rana menstruacija, kasna menopauza, odloženo prvo rađanje, manji broj djece, kraće trajanje dojenja, hormonalna terapija nakon uklanjanja materice i korištenje kontraceptivnih pilula). Također, ekološki faktori poput izloženosti jonizirajućem zračenju, rendgenskim zrakama, elektromagnetnim poljima i pesticidima mogu uticati na gene i povećati rizik od razvoja raka dojke. (Eskandari, 2024)

U osnovi raka dojke se nalazi nekontrolisana proliferacija ćelija i to najčešće epitelnih ćelija mliječnih kanalića koje invadiraju okolna tkiva i prijanjaju za fasciju prsnog zida. Sa histološkog aspekta se klasificira na in situ i invazivni karcinom dojke. Invazivni karcinom dojke ukazuje na malignu proliferaciju ćelija koje potiču iz kanalića ili lobula dojke i izvadiraju u okolna tkiva, (Makki, 2015) dok in situ karcinom dojke ukazuje na maligni proces u kojem su maligne ćelije koncentrisane na mjestu porijekla i pokazuju malu prevalencu širenja u okolna tkiva. (Ahmed, 2021)

Ekspresija određenih biomarkera poput hormonalnih receptora kao što su estrogenski receptori (ER), progesteronski receptori (PR) i humani epidermalni faktor rasta 2 receptori (HER2) omogućava dalju klasifikaciju na molekularne subtipove. Oni uključuju luminalni A tip (ER+ i/ili PR+, HER2-, nizak Ki-67), luminalni B tip (ER+ i/ili PR+, HER2+/-, visok Ki-67), HER2 obogaćen tip (ER-, PR-, HER2+) i bazalni tip ili trostruko negativni rak dojke (eng. Triple Negative Breast Cancer, TNBC) (ER-, PR-, HER2-). (Makki, 2015; Ahmed, 2021)

Zavisno od subtipa raka dojke, razvijene su strategije liječenja koje obično uključuju: hormonalnu terapiju (za pacijentice sa ER-pozitivnim rakom dojke), poli (ADP-riboza) polimeraza terapiju (za pacijentice koje su nosioci BRCA mutacija), terapiju anti-HER2 (za pacijentice sa HER2 pozitivnim rakom dojke), hemoterapiju (za trostruko negativni rak dojke, TNBC) i imunoterapiju. Iako danas imamo sukcesivni razvoj novih tehnologija i novih klasa lijekova, trenutni kliničko-patološki, imunohistohemijski i molekularni markeri, ostavljaju značajan broj pacijenata izloženim riziku od nuspojava, neadekvatnom liječenju usljed neadekvatnog doziranja ili eventualnom razvoju rezistencije na postojeće antikancerske lijekove. (Rangel, 2024) Luminalni B tip raka dojke dobro odgovara na lijekove poput tamoksifena i inhibitora aromataze, trastuzumaba i inhibitora tirozin kinaze. (Ma, 2014) Međutim kod pacijenata sa trostruko negativnim rakom dojke (TNBC) ovi lijekovi ne pokazuju optimalne rezultate, što znači da je potrebno primijeniti druge terapijske strategije, uključujući hirurški zahvat, zračenje i/ili hemoterapiju. (Hille, 2018) Zbog svoje heterogenosti, liječenje raka dojke zahtijeva individualizirani terapijski pristup. Bolest otkrivena u ranim fazama ima povoljniju prognozu, jer napredovanje bolesti i metastaze u druge organe poput mozga, kostiju i jetre čine rak neizlječivim, iako tretabilnim. Ishodi preživljavanja u ovoj fazi prvenstveno se određuju prema mjestu

metastaza, (Mojica, 2005) pri čemu su pacijenti s metastazama u kostima pokazali najbolju stopu preživljavanja, dok metastaze u mozgu se povezuju sa najmanjom stopom preživljavanja pacijenata. (Ahmed, 2021)

Napredak u oblasti genetike doveo je do dubljeg razumijevanja patogeneze bolesti tokom godina, pri čemu identifikacija genetskih mutacija i karakterizacija mehanizama uključenih na genomskom nivou mogu dovesti do boljih terapijskih rezultata bez smrtonosnih nuspojava. (Ahmed, 2021)

Prethodni pokušaji u uređivanju gena, uključujući tehnologije nukleaza ili endonukleaza, sada su evoluirali u molekularne tehnike poput korištenja transkripcijskih aktivatorskih efektorskih nukleaza (eng. transcription activator-like effector nucleases, TALENs) i cink-prsten nukleaza (eng. cink-finger nucleases, ZFNs). (Khan, 2019) Međutim, otkriće CRISPR/Cas9 pokazalo je značajne prednosti kroz svoju efikasnost, praktičnost i svestranost u odnosu na druge metode. (Ahmed, 2021)

S obzirom na sve izraženiju primjenu metoda uređivanja gena u terapiji malignih oboljenja, cilj ovog rada je razmotriti dostupnu literaturu kako bi se odgovorilo na ključno pitanje: na koji način CRISPR/Cas9 tehnologija može doprinijeti savremenim terapijskim pristupima liječenja raka dojke? U ovom radu je prikazan kratak osvrt na osnovne principe i klasifikaciju CRISPR/Cas9 sistema, kao i na specifične strategije primjene CRISPR/Cas9 tehnologije u terapiji raka dojke sa posebnim osvrtom na gene od interesa.

CRISPR/Cas9 sistem

Veliki napredak u području genomike imao je razvoj CRISPR/Cas9 tehnologije koja je revolucionizirala metode uređivanja gena u 21. stoljeću. CRISPR (eng. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) je prvi puta identificiran u bakteriji *Escherichia coli* 1987. godine kao grupa ponavljajućih fragmenata veličine 29 nukleotida koji su međusobno odvojeni fragmentima od 32 nukleotida specifičnih varijabilnih sekvenci. Pokazano je da ova pojava ima ključnu ulogu u nekoliko ćelijskih procesa uključujući termalnu adaptaciju (Riehle, 2001), popravku DNA (Makarova, 2011) i hromozomsku reorganizaciju (DeBoy, 2006). (Ahmed, 2021) Istraživanja tokom godina su pokazala da je CRISPR evoluirao kao mehanizam adaptivnog imunog sistema, štiteći bakterije i arheje od invazije stranih DNK molekula, poput onih porijeklom iz virusa i plazmida. (Eskandari, 2024)

CRISPR/Cas sistemi su grupisani u 2 klase, 6 tipova i 33 podtipa, na osnovu uloge različitih Cas proteina (eng. CRISPR-associated protein) unutar CRISPR okvira, koji ciljaju DNK, RNA, ili oboje. [Tabela 1.] (Eskandari, 2024)

Tabela 1. Klasifikacija CRISPR/Cas9 sistema (Eskandari, 2024)

Klasa		1			2	
Tip proteina		Multiplex	Multiplex	Multiplex	Single	Single
Tip	I	II	III	IV	V	VI
Pripadajući Cas protein	Cas 3	Cas 9	Cas 10	Cas 8	Cas 12a, Cas 12c, Cas 13a	Cas 13b, Cas 13c

Svi CRISPR/Cas9 sistemi su građeni od tri osnovna elementa: [1] nekodirajuća RNA, crRNA koja omogućava ciljano prepoznavanje segmenta DNA od interesa; [2] aktivirajući pomoćnik tracrRNA koji u kombinaciji sa crRNA formira himer poznat kao jedinstvena vodeća RNA (eng. single-guide RNA, sgRNA); [3] Cas protein koji se ponaša kao endonukleaza koja kontroliše cijepanje ciljanog segmenta DNA. Cas protein zahtjeva prisustvo specifične sekvence PAM (eng. Protospacer Adjacent Motif) kako bi efektivno prepoznao gen od interesa. (Eskandari, 2024)

U početnoj fazi CRISPR/Cas9 procesa, kratke DNA sekvence porijeklom iz faga ili plazmida se dodaju u genom domaćina. Ove sekvence, koje se nazivaju protospejseri (eng. protospacers), djeluju kao memorija prethodnih infekcija unutar ćelije. Ova funkcija omogućava prokariotskim organizmima da prepoznaju buduće napade kao spoljne i deaktiviraju nepoznatu DNA. (Bhaya, 2011) Spejser sekvence koje se nalaze u CRISPR lokusima preuzimaju se iz strane DNA, a ovaj proces uključuje učitavanje dva ključna proteina, Cas1 i Cas2. Cas1 pokazuje enzimsku funkciju potrebnu za integraciju u genom, dok Cas2 ima neenzimsku funkciju. Također, predloženo je da je Cas9 protein, u saradnji sa Cas1 i Cas2 proteinima, direktno uključen u preuzimanje spejser sekvenci. (Eskandari, 2024)

Druga faza počinje transkripcijom CRISPR lokusa kako bi se proizveo pre-crRNA, dugi molekul RNA koji sadrži sekvence koje odgovaraju spejserima i ponavljanjima. TracrRNA, još jedan molekul RNA potreban za maturaciju pre-crRNA, transkribuje se sa genetskog lokusa koji se nalazi ispred CRISPR lokusa. (Deltcheva, 2011) TracrRNA ima dio koji odgovara sekvenci CRISPR lokusa, što joj omogućava da se veže za 3' kraj pre-crRNA i formira dvostruki lanac RNA. Ovaj kompleks se zatim cijepa od strane ćelijske ribonukleaze III (RNA-aza III), koja je odgovorna za prepoznavanje i cijepanje dvostrukih lanaca RNA. Drugi rez se dešava kako bi se uklonio 5' kraj RNA sekvence, što rezultira zrelim crRNA: tracrRNA kompleksom, gRNA (eng. guided RNA) kompleksom, koji je sposoban da interaguje sa Cas proteinom. Svaki crRNA fragment sadrži jedinstvenu spejser sekvencu, koja je dužine 20 nukleotida. (Gasiunas, 2012) gRNA kompleks se veže za Cas9 protein, formirajući Cas9:gRNA efektor kompleks koji može da utiče na DNA, što rezultira CRISPR-medijiranim imunitetom. Cas9 protein je enzim sa dva ključna segmenta: segment za α -helikalno prepoznavanje (eng. recognition lobe, REC) i nukleazni segment (eng. nuclease lobe) koji su međusobno razdvojeni RNA kompleksom. Nukleazni segment sadrži HNH katalitičku domenu koja cijepa komplementarni DNA lanac prema crRNA i RuvC-sličnu domenu koja cijepa nekomplementarni DNA lanac. REC segment posjeduje most koji je bogat argininom, neophodan za interakciju sa RNA i povezivanje oba segmenta. (Anders, 2014) Nakon što se veže za gRNA kompleks, Cas9 postaje aktivan i traži strane nukleinske kiseline koje odgovaraju crRNA. To rezultira time da CRISPR/Cas9 cijepa DNA na specifičnom mjestu koje je komplementarno crRNA. (Eskandari, 2024) Opisani put je validan samo onda kada se neposredno nakon mjesta vezivanja crRNA nalazi prethodno spomenuta kratka sekvenca poznata kao PAM. (Ahmed, 2021)

Prekidi nastali u dvolančanoj DNA mogu se ispraviti kroz jedan od dva različita puta popravke DNA: direktni homologni put popravke DNA (eng. homology-directed repair, HDR) ili put nehomolognog spajanja krajeva DNA (eng. non-homologous end joining NHEJ). NHEJ put ligira krajeve na mjestu prekida DNA, te je podložan greškama i može dovesti do grešaka po principu insercije/delecije mutacija što rezultira neefikasnim genom. HDR koristi susjednu homolognu sekvencu kao kalup za popravak prekida. Ova metoda se može iskoristiti za potencijalno uvođenje ciljanih izmjena na preciznoj lokaciji u DNK sekvenci, pružanjem donorske sekvence koja je povezana s sgRNA za iniciranje popravke DNA. (Ahmed, 2021)

Iako je CRISPR/Cas9 izuzetno popularan alat za uređivanje gena, ima svoja ograničenja. Jedno od osnovnih ograničenja jeste zahtjev da PAM sekvenca selektuje ciljanu sekvencu DNA. Kako bi se zaobišla ova ograničenja, jedan od načina je korištenje različitih Cas9 proteina i poboljšanih spCas9 varijanata (eng. *Streptococcus pyogenes* CRISPR-associated protein 9) koji mogu prepoznati različite PAM sekvence, čineći CRISPR/Cas9 vrlo svestranim. (Chehelgerdi, 2024) Korištenjem deaktiviranih Cas9 (eng. endonuclease deficient Cas9, dCas9) sa mutiranim nukleaznim domenama, različiti proteini i enzimi mogu se koristiti za obavljanje različitih funkcija. Uz CRISPR interferenciju (CRISPRi) i aktivaciju (CRISPRa) korištenjem dCas9 sa represivnim transkripcijskim efektorima, kao što su KRAB domene (eng. The Krüppel associated box domain), ili aktivatorima transkripcija se može inhibirati ili promovirati. (Gilbert, 2013) Na kraju, korištenjem DNA metiltransferaza (DNMT) i DNA deaminaza, specifični obrasci metilacije i regije mogu se modifikovati. Generalno, ove tehnike i metode za CRISPR nam pomažu u boljem i efikasnijem liječenju bolesti poput raka, koje nastaju zbog različitih mutacija. (Ahmed, 2021)

DISKUSIJA

CRISPR/Cas9 u terapiji raka dojke

Geni uključeni u razvoj raka se obično kategorišu u dvije osnovne grupe: protoonkogeni koji promoviraju ćelijski rast i proliferaciju, a kada su mutirani ili prekomjerno eksprimirani konvertuju se u onkogene koji promoviraju tumorogenezu, te tumor supresorni geni koji su uključeni u procese popravke DNA i ćelijski rast a kada su mutirani ili inaktivirani vode nekontrolisanoj proliferaciji i genomskoj nestabilnosti. Onkogeni koji se najčešće dovode u vezu sa rakom dojke su: HER2, MYC, CXCR4, ACKR3, MAP3K11 (MLK3) i OPN, a tumor supresorni geni: TP53, PTEN i BRCA1/2. [Tabela 2.] Različite vrste mutacija na različitim nivoima mogu dovesti do njihove aberantne ili inhibisane ekspresije. CRISPR/Cas9 i njegove varijacije mogu prepoznati ove mutacije, ispraviti ih, te inhibirati ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju. (Rangel, 2024)

Tabela 2. Primjena CRISPR/Cas9 modela u terapiji raka dojke kroz uređivanje različitih gena od interesa (Rangel, 2024; Ahmed, 2021)

Gen od interesa	Proteinski produkt	CRISPR/Cas9 pristup	Efekti	Referenca
HER2	HER2	Indukcija frameshift mutacija na mjestu egzona 5, 10 i 12	Inhibicija proliferacije u HER2 pozitivnim ćelijskim kulturama	(Iqbal & Iqbal, 2014)
MYC	Myc	Epigenetičke modifikacije MYC regulatornih elemenata; Eliminacija MYC pojačivačkog mjesta pristajanja/ugradnje	Smanjenje ćelijske proliferacije i redukcija MYC nivoa ekspresije	(Schuijers et al., 2018)
	Myc	Modifikacije MYC mjesta vezivanja (tzv. E – mjesta)	Alternacije u vezivanju MYC za ciljne gene, ekspresiji ciljnih gena, rastu tumora in vivo i ćelijskoj proliferaciji in vitro	(Kazimierska et al., 2023)

CXCR4	CXCR4	Knockout gena (uklanjanje ili inaktivacija gena)	Smanjenje ćelijske proliferacije i invazije u druga tkiva	(Yang et al., 2019)
ACKR3	CXCR7	Knockout gena (uklanjanje ili inaktivacija gena)	Smanjenje ćelijske proliferacije i invazije u druga tkiva	(Yang et al., 2019)
MAP3K11	MLK3	Delecija gena	Smanjenje metastatskog potencijala	(Rattanasinchai & Gallo, 2016)
SPP1	OPN	Knockout gena (uklanjanje ili inaktivacija gena)	Redukcija ekspresije SPP1 gena; Smanjenje ćelijske vijabilnosti i inhibicija pokretanja mehanizama programirane ćelijske smrti	(Behbahani et al., 2021)
TP53	p – 53	Reverzija missense mutacija (tačkastih mutacija)	Supstitucija baza u TP53 genu	(Abuhamad et al., 2022)
PTEN	PTEN	Aktivacija ekspresije gena	Povećana PTEN ekspresija i inhibicija pokretanja AKT, mTOR i MAPK signalnih puteva	(Moses et al., 2019)
BRCA1	BRCA1	Interferiranje i smanjenje DNA metilacije	Povećana transkripcijska regulacija BRCA1 gena	(Choudhury et al., 2016)
BRCA 2	BRCA2	Knockout gena (uklanjanje ili inaktivacija gena)	Smanjenje ćelijske vijabilnosti	(Feng & Jasin, 2017)
MDR1	P – glikoprotein	Izmjena gena (genske ekspresije) po principu insercije ili delecije	Povećani odgovor na terapiju doksorubicinom i pokretanje mehanizama apoptoze	(Ha et al., 2016)
PARP1	Poli (ADP-ribozil) transferaza	Delecija gena	Povećana senzitivnost ćelija trostruko negativnog raka dojke na hemoterapeutike poput doksorubicina, gemcitabina i docetaksela	(Mintz et al., 2020)
DSTYK	DSTYK	Delecija gena	Aktivacija mehanizama apoptoze u hemorezistentnim ćelijama in vivo i in vitro modela	(Ogbu et al., 2021)
ATP8B3	ATP8B3	Knockout gena (uklanjanje ili inaktivacija gena)	Povećana rezistencija na paklitaksel kod ćelija trostruko negativnog raka dojke	(Yan et al., 2023)
FOXR2	FOXR2	Knockout gena (uklanjanje ili inaktivacija gena)	Povećana rezistencija na paklitaksel kod ćelija trostruko negativnog raka dojke	(Yan et al., 2023)

FRG2	FRG2	Knockout gena (uklanjanje ili inaktivacija gena)	Povećana rezistencija na paklitaksel kod ćelija trostruko negativnog raka dojke	(Yan et al., 2023)
------	------	--	---	--------------------

ZAKLJUČAK

Otkriće CRISPR/Cas9 tehnologije kao prospektivne metode za uređivanje gena u potpunosti je promijenilo polje genomike i omogućilo razvoj novih terapijskih procedura za liječenje različitih oboljenja, a tako i raka. CRISPR/Cas9 tehnologija u terapiji raka dojke omogućava manipulaciju genima koji su definisani kao onkogeni ili tumor supresorni geni sa ciljem supresije tumorogeneze, proliferacije, diferencijacije i metastaziranja. Iako brojne studije pokazuju veliki potencijal primjene ove metode, postoje određeni limiti poput etičkih dvojbi, potencijalne mutageneze i pogodnih načina primjene koji se moraju detaljno istražiti. Optimizacija CRISPR/Cas9 sistema sa ciljem prevazilaženja ovih limita je esencijalna kako bi se u potpunosti iskoristio potencijal ove metode u personaliziranoj terapiji.

LITERATURA

1. Abuhamad AY, Mohamad Zamberi NN, Sheen L, Naes SM, Mohd Yusuf SNH, Ahmad Tajudin A, et al (2022). Reverting TP53 Mutation in Breast Cancer Cells: Prime Editing Workflow and Technical Considerations. *Cells*. 11(10):1612. doi: 10.3390/cells11101612. PMID: 35626649. [27.2.2025.]
2. Ahmed M, Daoud GH, Mohamed A, Harati R (2021). New Insights into the Therapeutic Applications of CRISPR/Cas9 Genome Editing in Breast Cancer. *Genes*. 12:723. doi: <https://doi.org/10.3390/genes12050723>. [18.2.2025.]
3. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 513(7519):569-73. doi: 10.1038/nature13579. PMID: 25079318; PMCID: PMC4176945. [24.2.2025.]
4. Behbahani RG, Danyaei A, Teimoori A, Neisi N, Tahmasbi MJ (2021). Breast cancer radioresistance may be overcome by osteopontin gene knocking out with CRISPR/Cas9 technique. *Cancer/Radiothérapie*. 25(3):222–228. doi: 10.1016/j.canrad.2020.08.048. PMID: 33422414. [27.2.2025.]
5. Bhaya D, Davison M, Barrangou R (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*. 45:273-97. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132430. PMID: 22060043. [24.2.2025.]
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin*. 68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492. [24.2.2025.]
7. Chehelgerdi M, Khorramian-Ghahfarokhi M, Shafieizadeh M, Mahmoudi E, Eskandari F, Rashidi M, Arshi A, Mokhtari-Farsani A (2024). Comprehensive review of CRISPR-based gene editing: mechanisms, challenges, and applications in cancer therapy. *Mol Cancer*. 23(1):9. doi: 10.1186/s12943-023-01925-5. PMID: 38195537; PMCID: PMC10775503. [24.2.2025.]

8. Choudhury SR, Cui Y, Lubecka K, Stefanska B, Irudayaraj J (2016). CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget*. 7(29):46545–46556. doi: 10.18632/oncotarget.10234. PMID: 27356740. [27.2.2025.]
9. DeBoy RT, Mongodin EF, Emerson JB, Nelson KE (2006). Chromosome Evolution in the Thermotogales: Large-Scale Inversions and Strain Diversification of CRISPR Sequences. *J. Bacteriol*. 188:2364–2374. doi: <https://doi.org/10.1128/jb.188.7.2364-2374.2006>. [24.2.2025.]
10. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 471(7340):602-7. doi: 10.1038/nature09886. PMID: 21455174; PMCID: PMC3070239. [24.2.2025.]
11. Eskandari F, Aali M, Hadisadegh SN, Azadeh M (2024). Advances in breast cancer research using CRISPR/Cas9 system. *NanoSelect*. 5:2400015. doi: <https://doi.org/10.1002/nano.202400015>. [18.2.2025.]
12. Feng W, Jasin M (2017). BRCA2 suppresses replication stress-induced mitotic and G1 abnormalities through homologous recombination. *Nat Commun*. 8:525. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00634-0>. [27.2.2025.]
13. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(39):E2579-86. doi: 10.1073/pnas.1208507109. PMID: 22949671; PMCID: PMC3465414. [24.2.2025.]
14. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 154(2):442-51. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.044. PMID: 23849981; PMCID: PMC3770145. [24.2.2025.]
15. Ha JS, Byun J, Ahn DR (2016). Overcoming doxorubicin resistance of cancer cells by Cas9-mediated gene disruption. *Sci Rep*. 6:22847. doi: 10.1038/srep22847. PMID: 26961701. [27.2.2025.]
16. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S (2018). Charpentier, E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 172(6):1239–1259. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.032. [27.2.2025.]
17. Iqbal N, Iqbal N (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014:852748. doi: 10.1155/2014/852748. PMID: 25276427. [27.2.2025.]
18. Kazimierska M, Podralska M, Żurawek M, Woźniak T, Kasprzyk ME, Sura W, et al (2023). CRISPR/Cas9 screen for genome-wide interrogation of essential MYC-bound E-boxes in cancer cells. *Mol Oncol*. 17(11):2295–2313. doi: 10.1002/1878-0261.13493. PMID: 37519063. [27.2.2025.]
19. Khan SH (2019). Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 7(16):326–334. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.027. [24.2.2025.]
20. Ma Y, Zhang L, Huang X (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J*. 281:5186–5193. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.13110>. [24.2.2025.]
21. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, et al. (2011). Evolution and classification of the CRISPR—Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol*. 9:467–477. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>. [20.2.2025.]

22. Makki J (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. Clin. Med. Insights Pathol. 8. doi: <https://doi.org/10.4137/CPath.S31563>. [24.2.2025]
23. Mintz RL, Lao YH, Chi CW, He S, Li M, Quek CH, et al (2020). CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis to validate the synergy between PARP1 inhibition and chemotherapy in BRCA1-mutated breast cancer cells. Bioeng Transl Med. 5(1):e10152. doi: 10.1002/btm2.10152. PMID: 31989039. [27.2.2025.]
24. Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. J. Mol. Evol. 60:174–182. doi: <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>. [24.2.2025]
25. Moses C, Nugent F, Waryah CB, Garcia-Bloj B, Harvey AR, Blancafort P (2019). Activating PTEN Tumor Suppressor Expression with the CRISPR/dCas9 System. Mol Ther Nucleic Acids. 14:287–300. doi: 10.1016/j.omtn.2018.12.003. PMID: 30654190. [27.2.2025.]
26. Ogbu SC, Rojas S, Weaver J, Musich PR, Zhang J, Yao ZQ, et al (2021). DSTYK Enhances Chemoresistance in Triple-Negative Breast Cancer Cells. Cells. 11(1):97. doi: 10.3390/cells11010097. PMID: 35011659. [27.2.2025]
27. Rangel N, Camargo V, Castellanos G, Forero-Castro M, Rondón-Lagos M (2024). Exploring the Advantages and Limitations of CRISPR-Cas in Breast Cancer. Gene Expression. 23(2):116–126. doi: 10.14218/GE.2023.00154. [18.2.2025.]
28. Rattanasinchai C, Gallo KA (2016). MLK3 Signaling in Cancer Invasion. Cancers (Basel). 8(5):51. doi: 10.3390/cancers8050051. PMID: 27213454. [27.2.2025.]
29. Riehle MM, Bennett AF, Long AD (2001). Genetic architecture of thermal adaptation in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(2):525–530. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.525>. [24.2.2025.]
30. Schuijers J, Manteiga JC, Weintraub AS, Day DS, Zamudio AV, Hnisz D, et al (2018). Transcriptional Dysregulation of MYC Reveals Common Enhancer-Docking Mechanism. Cell Rep. 23(2):349–360. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.056. PMID: 29641996. [27.2.2025]
31. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. (2022) Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 72(1):7–33. doi: 10.3322/caac.21708. [24.2.2025.]
32. Yan G, Dai M, Poulet S, Wang N, Boudreault J, Daliah G, et al (2023). Combined in vitro/in vivo genome-wide CRISPR screens in triple negative breast cancer identify cancer stemness regulators in paclitaxel resistance. Oncogenesis. 12(1):51. doi: 10.1038/s41389-023-004979. PMID: 37932309. [27.2.2025.]
33. Yang M, Zeng C, Li P, Qian L, Ding B, Huang L, et al (2019). Impact of CXCR4 and CXCR7 knockout by CRISPR/Cas9 on the function of triple-negative breast cancer cells. Onco Targets Ther. 12:3849–3858. doi: 10.2147/OTT.S195661. PMID: 31190884. [27.2.2025]

UPOTREBA EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA U RAZVOJU I OPTIMIZACIJI METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE POD VISOKIM PRITISKOM (HPLC)

Amra Demirović¹, Alija Uzunović², Anisa Veledar-Hamalukić¹, Maida Šljivić Husejnović³

¹*Amsal Pharmaceuticals d.o.o. Sarajevo, Igmanska 38, 71320 Vogošća, Bosna i Hercegovina*

²*Agencija za lijekove i medicinska sredstva Bosne i Hercegovine, Maršala Tita 9, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina*

³*Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina*

Pregledni rad

SAŽETAK

Eksperimentalni dizajn je vrlo koristan alat čija je upotreba u savremenoj analitici lijekova, sa ciljem dobijanja najoptimalnije analitičke metode, u stalnom porastu. U ovom preglednom radu su objedinjena savremena saznanja iz ove oblasti, uz naglašavanje aplikativne vrijednosti eksperimentalnog dizajna u razvoju i optimizaciji analitičkih metoda. Navedena je klasifikacija različitih tipova dizajna uz pojašnjenje odabira najkritičnijih faktora, njihovoj optimizaciji u cilju dobijanja optimalnih odgovora. Pojašnjena je primjena Analitičke kvalitete prema dizajnu (AQbD) zasnovane na eksperimentalnom dizajnu. Dati su primjeri upotrebe eksperimentalnog dizajna u razvojnoj analitici, načini odabira dizajna u preliminarnim skrining ispitivanjima, te u dizajnu površine odgovora. Optimizirane HPLC metode vode otkrivanju visokog stepen slaganja prediktivnog i eksperimentalnog odgovora sistema. Budućnost korištenja eksperimentalnog dizajna u farmaceutskoj industriji je neupitna, u svim njenim procesima. Benefit u smislu uštede vremena, uštede hemikalija, te njen multivarijetni pristup kojim se može ispitati efekat svih faktora pojedinačno i međusobno joj omogućava primjenu u razvoju, optimizaciji, te ispitivanju robusnosti analitičkih metoda.

Ključne riječi: *HPLC, eksperimentalni dizajn, razvoj analitičkih metoda, optimizacija analitičkih metoda*

Autor za korespondenciju: Mr.sci. Amra Demirović
E-mail: a.demirovic@amsal.ba

THE USE OF EXPERIMENTAL DESIGN IN THE DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD

Amra Demirović¹, Alija Uzunović², Anisa Veledar-Hamalukić¹, Maida Šljivić Husejnović³

¹*Amsal Pharmaceuticals d.o.o. Sarajevo, Igmanska 38, 71320 Vogošća, Bosnia and Herzegovina*

²*Agency for Medicinal Products and Medical Devices of Bosnia and Herzegovina, Maršala Tita 9,
71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*

³*Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla,
Bosnia and Herzegovina*

Review article

SUMMARY

Experimental design is a highly valuable tool, and its application in modern drug analysis, aimed at achieving the most optimal analytical methods, is continually growing. This review paper synthesizes current knowledge in the field, highlighting the practical significance of experimental design in the development and optimization of analytical methods. The classification of different types of design is given, along with the clarification of the selection of the most critical factors, and their optimization to obtain optimal answers. The application of Analytical Quality by Design (AQbD) based on experimental design is clarified. Summaries of several references from the literature are provided as examples of how experimental design is applied in developmental analytics, including the selection of designs for preliminary screening trials and response surface designs. Optimized HPLC methods result in a high degree of agreement between the predicted and experimental responses of the system. The future of using experimental design in the pharmaceutical industry is unquestionable, in all its processes. Benefit in terms of saving time, saving chemicals, and its multivariate approach, which can examine the effect of all factors individually and mutually, enables its application in development, optimization, and testing the robustness of analytical methods.

Key words: *HPLC, experimental design, development of analytical methods, optimization of analytical methods*

Corresponding author: M.Sc. Amra Demirović
E-mail: a.demirovic@amsal.ba

UVOD

U svrhu razvoja specifične HPLC analitičke metode, koja bi imala maksimalne rezolucije između praćenih pikova (Schmidt i Molnár, 2013), dugo se koristio tradicionalni pristup razvoja metode mijenjajući jedan faktor u vremenu (eng. one factor at the time, OFAT). Nedostaci OFAT pristupa ogledaju se u nedovoljnom ispitivanju kombinacija svih varijabli koje mogu uticati na hromatografsko razdvajanje, ograničenom razumijevanju potencijala metode, uskom rasponu robusnosti, te nemogućnosti upravljanja rizikom u kvaliteti (Hubert i sar., 2014).

Razvoj hromatografske metode koja se koristi u savremenoj farmaceutskoj analizi predstavlja vrlo složen proces. Procjena hromatografskog ponašanja i uspostavljanje optimalnih hromatografskih uvjeta predstavlja izazov, jer je važno prikupiti što više korisnih informacija uz minimalan broj eksperimenata. Za određivanje optimalnih uslova može se koristiti više pristupa, pri čemu su u literaturi najčešći OFAT i multifaktorski pristup (Vander Heyden i sar., 2000).

OFAT pristup podrazumijeva promjenu samo jednog faktora dok su svi ostali konstantni, što omogućava posmatranje uticaja samo tog jednog faktora na sistem. Ovaj pristup ima ograničenja jer ne omogućava sagledavanje međusobnog uticaja više faktora, a broj eksperimenata eksponencijalno raste sa brojem faktora. Takođe, uslovi definisani ovim pristupom ne moraju nužno biti optimalni jer zavise od početnih uslova (Dejaegher i Vander Heyden, 2009; Slutsky, 1998).

Multifaktorski pristup (engl. multifactorial approach) je savremeni pristup ovoj problematici i podrazumijeva istovremeno testiranje više faktora primjenom eksperimentalnog dizajna koji omogućava postizanje definisanih ciljeva na najefikasniji i najpouzdaniji način, uz smanjenje utroška vremena i materijala tokom eksperimentalnog rada. Svaki sistem je cjelina koja se sastoji od tri osnovna elementa: ulaznih informacija, transformacija i izlaznih informacija (Huinh-Ba, 2009). Ulazni parametri (faktori) su kvalitativne ili kvantitativne varijable koje mogu uticati na sistem. Intenzitet ulaznog faktora je određen kao nivo. Izlazni parametri (odgovori) su jedna kvalitativna i kvantitativna varijabla koja se posmatra da bi se dobile informacije o ponašanju sistema pod uticajem ulaznih parametara (Huinh-Ba, 2009).

Mnoge industrije koriste eksperimentalni dizajn, a farmaceutska industrija je jedan od dominantnih korisnika. U farmaciji, aplikacije obuhvaćaju dizajn formulacije, optimizaciju procesa u proizvodnji, optimizaciju analitičkih postupaka, preliminarno testiranje za identifikaciju značajnih faktora i testiranje robusnosti i metode i proizvoda (Carlson, 2001; Lundstedt i sar., 1998).

U ovoj fazi se izvode preliminarni testovi na početku eksperimentalnog modeliranja – to su testovi nekoliko faktora da bi se vidjelo da li oni utiču na odgovore sistema, te kako bi se donijela odluka o odgovarajućim nivoima za te faktore. Tu leži pitanje da li je faktor važan ili ne. Eksperimentalno modeliranje se izvodi nakon preliminarnih ispitivanja radi optimizacije metode.

Cilj ovih eksperimenata je da se predvide odgovori svih mogućih kombinacija faktora unutar eksperimentalnog domena i identifikuju optimalni eksperimentalni uslovi, koji su često kompromis između djelimično suprotstavljenih uticaja pojedinih faktora. Pitanje koje se u ovoj fazi postavlja je koliko je faktor važan, a odgovor bi trebao pokazati da li je veza između faktora i odgovora pozitivna ili negativna, te prirodu njihovog odnosa (linearna, kvadratna, eksponencijalna itd.).

Cilj ispitivanja robusnosti metode ili procesa je potvrditi da li su oni neosjetljivi na male fluktuacije faktora ili, u protivnom, razumjeti koji su faktor ili faktori odgovorni i promijeniti ih dok ne dođemo do robusne metode ili procesa. Koristeći eksperimentalni dizajn, kroz seriju unaprijed definisanih eksperimenata, procjenjuje se uticaj prethodno odabranih faktora hromatografskih uslova na odgovore hromatografskih parametara, te efekti interakcija između izdvojenih faktora (Vander Heyden i sar., 2000).

Odabir faktora, nivoa faktora i odgovora

Kako bi se definisao faktorski dizajn koji će se koristiti, potrebno je odabrati faktore, nivoe faktora i odgovore.

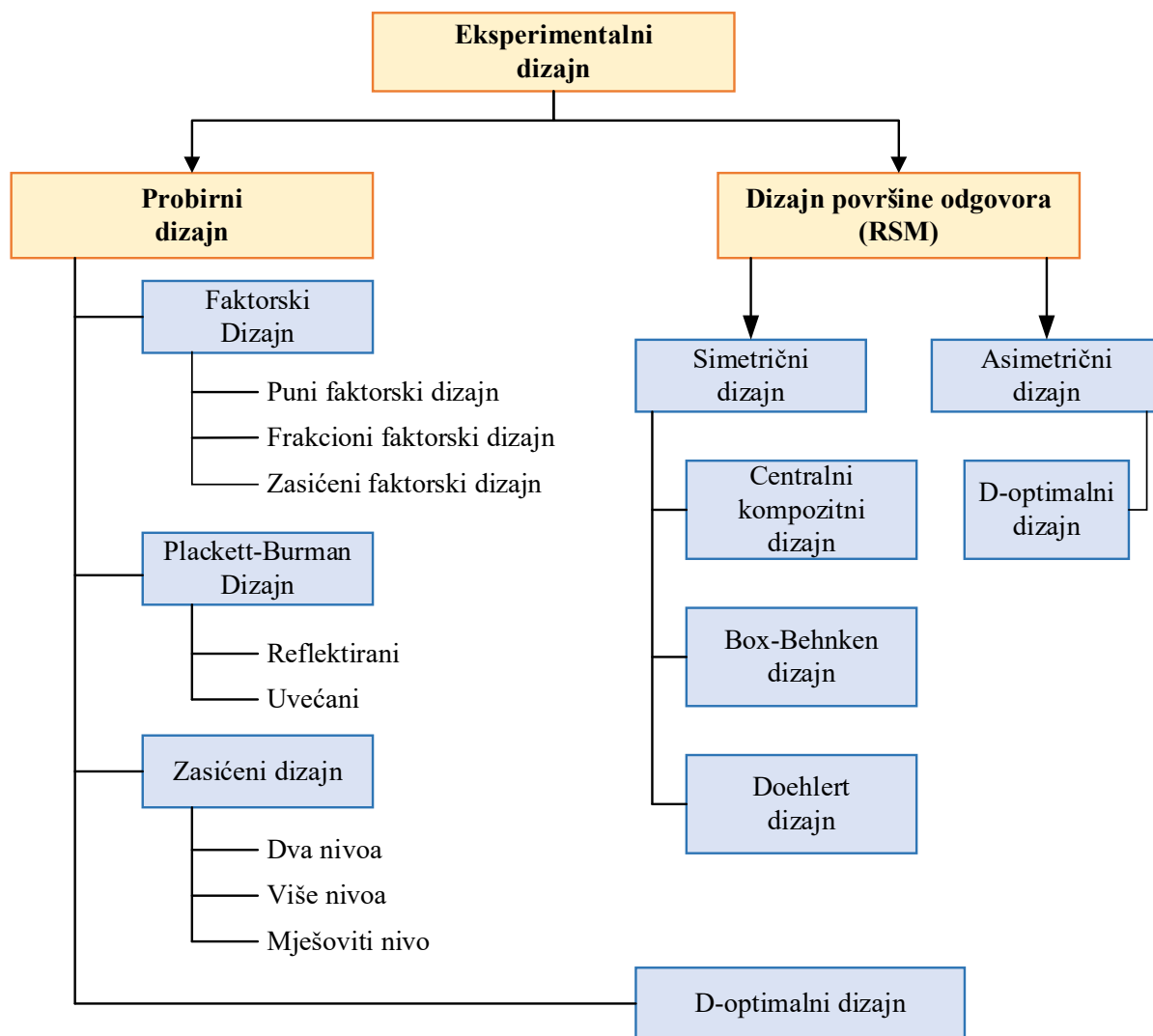
Odabir faktora predstavlja važnu fazu u eksperimentalnom dizajnu. Potencijalno važni faktori biraju se na osnovu analize svih mogućih faktora koji mogu uticati na odgovor sistema ili na osnovu preliminarnih eksperimenata. Odabrani faktori se uključuju u eksperimentalni dizajn, dok se ostali faktori drže konstantnim. Faktori mogu biti kontrolisani, tj. oni koji se lako regulišu, ili nekontrolisani, koji se teško regulišu, ali mogu imati uticaj na sistem. Takođe, faktori mogu biti: kvantitativni (npr. pH rastvora, temperaturakolone, koncentracijapufera, protok mobilne faze, talasnaduzinadetekcije), kvalitativni (npr. hromatografska kolona), ili faktori smjese (npr. koncentracija organskog rastvarača u mobilnoj fazi) (Vander Heyden i sar., 2001; Vander Heyden i sar., 1998). Osnovna karakteristika kvantitativnih faktora je njihova mogućnost da se mijenjaju u kontinuiranom obimu. Kod hromatografskih metoda, podešavanje ovih faktora je relativno jednostavno, ali je važno pravilno ih predstaviti. Treća grupa su faktori smjese, gdje se za smjesu od p komponenti, nezavisno može mijenjati samo $p - 1$. Faktori koji se mogu razmatrati prilikom procjene robusnosti HPLC metode uključuju: pH mobilne faze, koncentraciju organskog rastvarača, koncentraciju pufra, soli, jon-par reagensa, protok mobilne faze, temperaturu kolone, sastav mobilne faze kod gradijentnog eluiranja, nagib gradijenta, proizvodnu seriju stacionarne faze kolone, starost kolone, talasnu dužinu kod UV detekcije i faktore integracije kao što je osjetljivost.

Odabir nivoa faktora predstavlja odabir obima vrijednosti značajnih faktora, tj. određivanje njihovih graničnih vrijednosti u eksperimentu. Tokom preliminarnih ispitivanja obično se koristi širi opseg vrijednosti nego u fazi optimizacije. Odabir nivoa zahtijeva iskustvo analitičara. Kod ispitivanja robusnosti, faktori se obično ispituju na dva nivoa: nižem (-1) i višem (+1), u odnosu na nominalnu vrijednost definisanu u fazi optimizacije metode. Važno je precizno definisati odstupanja nivoa faktora od njihove nominalne vrijednosti. Preporuka je da se ti nivoi odrede prema nesigurnosti koja se može očekivati pri njihovom podešavanju – što je obično uzak interval. S druge strane, ako se faktor ispituje u širem obimu, moguće je izvući dodatne zaključke, ali se povećava i vjerovatnoća da faktor ima značajan efekat. Ako se pokaže da nema značajan uticaj ni u širem obimu, to povećava kvalitet metode, odnosno njenu robusnost. Znanje stečeno tokom razvoja i optimizacije metode je od velike pomoći prilikom definisanja nivoa, pa se ta odluka često prepušta analitičaru.

Odabir odgovora zavisi od cilja eksperimenta i može biti kvantitativan (numerička vrijednost) ili kvalitativan. Kvantitativni odgovori, poput sadržaja aktivne supstance, sadržaja nečistoća, površine ili visine pika, koriste se za kvantitativnu provjeru analitičke metode. S druge strane, odgovori koji definišu kvalitet separacije – kao što su faktor rezolucije, faktor selektivnosti i retencioni faktor – omogućavaju određivanje testa pogodnosti sistema (*System Suitability Test – SST*).

Klasifikacija eksperimentalnih dizajna korištenih u razvoju HPLC metode

Klasifikacija eksperimentalnih dizajna korištenih u razvoju HPLC metode je data na slici 1. (Jančić Stojanović, 2013).



Slika 1. Klasifikacija eksperimentalnih dizajna (Dejaegher i Vander Heyden 2009)

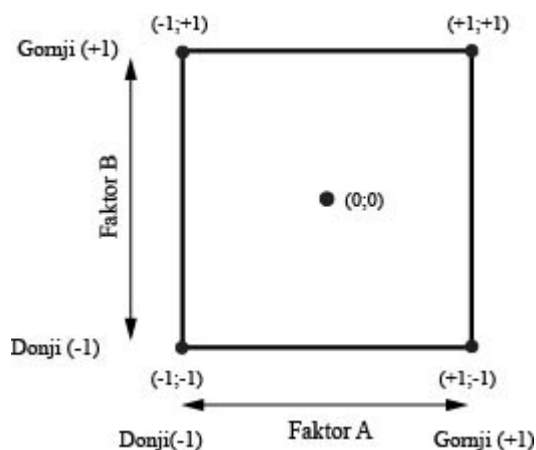
Preliminarni eksperimenti ili probirni dizajn se izvode primjenom punog faktorskog dizajna (eng. *Full Factorial Design*, FFD). U slučaju velikog broja faktora preliminarni eksperimenti se izvode primjenom frakcionog faktorskog dizajna (eng. *Fractional Factorial Design*).

Karakteristika punog faktorskog dizajna je da ispituje svaki faktor na dva nivoa i u centralnoj tački, što daje procijenu uticaja faktora ili interakcija između faktora na cjelokupni sistem.

Primjenom punog faktorskog dizajna istražuju se sve granične vrijednosti analiziranih faktora. Broj faktora koji se ispituju se označava sa n , a broj nivoa odabranih faktora sa k , pa je ukupan broj eksperimenata za puni faktorski dizajn k^n .

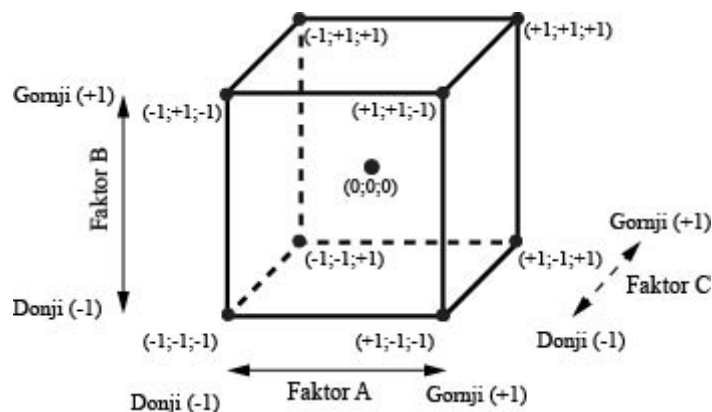
Najmanji broj eksperimenata je četiri, kada ispitujemo dva faktora na dva nivoa, ili 2^2 , uz još tri do pet eksperimenata koji se ispituju u centralnoj tački. Na ovaj način se uzima u obzir eksperimentalna greška, te smanjuje rizik nelinearnog odnosa u centralnoj tački.

Geometrijski se ovaj tip eksperimentalnog dizajna može prikazati kao kvadrat gdje svaka tačka u prostoru faktora predstavlja jedan eksperiment (slika 2).



Slika 2. Eksperiment faktorskog dizajna 2^2 (Dejaegher i Vander Heyden 2009)

U slučaju punog faktorskog dizajna, kada ispitujemo tri faktora na dva nivoa, ili 2^3 , uz još tri do pet eksperimenata koji se ispituju u centralnoj tački se može geometrijski predstaviti kao kocka, gdje je svaka tačka kocke ustvari jedan eksperiment (slika 3).



Slika 3: Eksperiment faktorskog dizajna 2^3 (Dejaegher i Vander Heyden 2009)

Svaki faktor se definiše donjom i gornjom graničnom vrijednošću. Obično se donja granična vrijednost označava kao -1 ili jednostavno „-“, a gornja kao +1 ili „+“. Nivo faktora u centralnoj eksperimentalnoj tački označava se kao 0.

Puni faktorski dizajn se koristi kada se ispituje uticaj dva do četiri faktora na dva nivoa. Međutim, kada broj faktora iznosi pet ili više, primjena punog faktorskog dizajna zahtijeva veliki broj eksperimenata, što često nije praktično ni ekonomski isplativo. Zbog toga se u takvim slučajevima koristi frakcioni faktorski dizajn – dizajn u kojem se istražuje samo dio graničnih vrijednosti analiziranih faktora. On se koristi i tokom preliminarnih ispitivanja, ali i u procjeni robustnosti.

Puni faktorski dizajn se koristi u preliminarnom ispitivanju hromatografskog ponašanja smjese aktivnih supstanci, te njihovih smjesa s nečistoćama u farmaceutskim doznim oblicima (Rakić i sar., 2014). Takođe se koristi za optimizaciju HPLC uslova separacije aktivne farmaceutske supstance (API – *Active Pharmaceutical Ingredient*) i njenih nečistoća kada se ispituje mali broj faktora (Jančić-Stojanović i sar., 2010). Frakcioni faktorski dizajn se, s druge strane, primjenjuje u procjeni robustnosti metode (Kasagić i sar., 2013).

Zasićeni faktorski dizajn (*Saturated Factorial Design – SFD*) je dizajn kod kojeg su svi stepeni slobode iskorišteni za procjenu parametara, bez preostalog stepena slobode za procjenu varijanse greške. Ovaj dizajn procjenjuje opštu srednju vrijednost i glavne efekte, dok se interakcije višeg reda zanemaruju. U posljednjim godinama raste interes za optimalni zasićeni dizajn glavnog efekta, posebno u slučajevima sa dva ili tri faktora na dva nivoa. Međutim, problem postaje složeniji kada se eksperimenti izvode sa tri ili četiri faktora na tri ili više nivoa.

Pored faktorskog dizajna, koristi se i Plackett-Burman-ov dizajn, odnosno smanjeni faktorijelni dizajn na dva nivoa koji ima povoljne karakteristike poput ravnoteže i ortogonalnosti. Ukupan broj eksperimenata (N) je uvijek višekratnik broja 4 (4, 8, 12, 16, 20, 24...), a za N eksperimenata može se analizirati N–1 faktora. Glavna prednost ovog dizajna je što omogućava procjenu velikog broja faktora sa malim brojem eksperimenata (npr. za 11 faktora potrebno je samo 12 eksperimenata) (Armstrong, 2006).

Zasićeni dizajn (*Saturated Design – SD*) može se uporediti s vještim ljekarom koji pacijentu postavlja nekoliko preciznih pitanja kako bi otkrio bolest ili problem. S druge strane, ako pacijent sam nabraja sve simptome bez usmjerenih pitanja, možda će doći do tačne dijagnoze, a možda i neće. Dobro osmišljeni eksperimenti, kao što su zasićeni dizajni, skraćuju vrijeme potrebno za identifikaciju glavnih efekata u sistemu, uz visok stepen tačnosti.

Zasićeni dizajni su najprikladniji za početna ispitivanja i preporučuju se kada se radi o novom sistemu sa velikim brojem faktora. Oni su obično rezolucije III i omogućavaju određivanje glavnih efekata uz minimalan broj eksperimenata.

Eksperimenti poput centralnog kompozitnog dizajna, Box-Behnken dizajna i punog faktorskog dizajna na tri nivoa pripadaju grupi dizajna površine odgovora (*Response Surface Methodology – RSM*). Riječ je o vrstama eksperimentalnog dizajna koji omogućavaju uspostavljanje kvadratne funkcionalne zavisnosti između faktora i odgovora, odnosno, zahtijevaju primjenu kvadratnog modela.

RSM je skup matematičkih i statističkih tehnika koje se koriste tokom razvoja, unapređenja ili optimizacije procesa. Primjena RSM metode obuhvata sljedeće korake:

1. Izbor faktora za analizu (na osnovu preliminarnih ispitivanja),
2. Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna i izvođenje eksperimenata,
3. Matematičko-statistička obrada podataka,
4. Procjena adekvatnosti modela,
5. Dobijanje optimalnih vrijednosti za svaki parametar uz pomoć grafičke analize (Mason i sar., 2003; Bezerra i sar., 2008).

Grafički prikaz odgovora sistema u funkciji ispitivanih faktora naziva se površina odgovora. Kako bi se u potpunosti sagledao uticaj faktora na odgovore sistema i pronašli optimalni uslovi, potrebno je prikazati uticaj dva faktora kao površinu u trodimenzionalnom prostoru.

Kompozitni dizajn se često koristi za optimizaciju jer sadrži donju i gornju graničnu vrijednost, eksperimente u centralnoj tački, kao i tzv. eksperimente zvijezde (*engl. Axial experiments*).

U ovom dizajnu svaki faktor se ispituje na tri do pet nivoa. U poređenju s preliminarnim eksperimentima, odabir faktora i odgovora u ovoj fazi je jednostavniji, jer su već identifikovani oni faktori koji imaju značajan uticaj na odgovore sistema. U toj fazi se odnos između faktora i odgovora ispituje korištenjem kvadratnog regresionog modela.

Centralni kompozitni dizajn je proširena verzija punog i frakcionog eksperimentalnog dizajna na dva nivoa (Toms i sar., 2017). Postoji nekoliko varijanti:

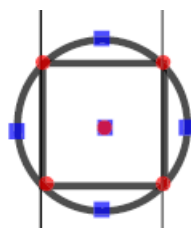
- CCC (*Central Composite Circumscribed*),
- CCF (*Central Composite Face-centered*),
- CCI (*Central Composite Inscribed*).

CCC dizajn se sastoji od:

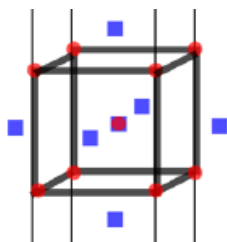
- graničnih faktorskih eksperimenata na dva nivoa,
- simetrično raspoređenih „zvjezdastih“ eksperimenata,
- ponovljenih eksperimenata u centralnoj tački.

Na ovaj način svaki od faktora se ispituje na pet nivoa. Karakteristika CCC dizajna je ta da se eksperimenti zvijezde nalaze izvan opsega graničnih vrijednosti.

Takođe, kod dizajna sa dva faktora, granični i zvjezdasti eksperimenti se nalaze na kružnici poluprečnika 1,41, dok se kod dizajna sa tri faktora nalaze na površini lopte poluprečnika 1,682 (*vidi sliku 4 i 5*).

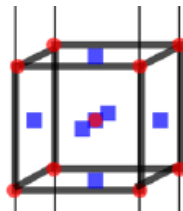


Slika 4. Eksperimenti CCC dizajna sa dva faktora (Toms i sar., 2017)



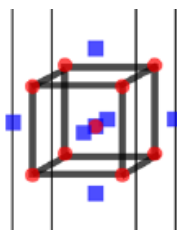
Slika 5. Eksperimenti CCC dizajna sa tri faktora (Toms i sar., 2017)

CCF dizajn ispituje svaki faktor na tri nivoa i u slučaju tri faktora sadrži eksperimente koji predstavljaju centralne tačke na stranicama kocke (slika 6). U ovom slučaju eksperimentalni prostor je kocka, a ne lopta. CCF se smatra standardnim dizajnom koji podržava kvadratni regresioni model (Carlson, 2001).



Slika 6. Eksperiment CCF dizajna sa tri faktora (Toms i sar., 2017)

CCI dizajn je modificirana verzija CCC dizajna, gdje je CCC dizajn podijeljen s α za generisanje CCI modela. Na kraju je utvrđeno da su CCC i CCI rotacijski model (slika 7) (Bhattacharya, 2021).



Slika 7. Eksperiment CCI dizajna sa tri faktora (Toms i sar., 2017)

Centralni kompozitni dizajn se najčešće koristi za definisanje retencionog ponašanja (Pous-Torres i sar., 2008), optimizaciju HPLC uslova (Crevar-Sakač i sar., 2013), kao i procjenu robustnosti metode (Petkovska i Dimitrovska, 2008; Petkovska i sar., 2008).

Box-Behnken dizajn je dizajn površine odgovora na tri nivoa. On zahtijeva manji broj eksperimenata (npr. kada se proučavaju tri faktora, potreban broj eksperimenata je 13, dok je kod centralnog kompozitnog dizajna 15). Ovaj dizajn ne uključuje eksperimente u kojima su svi faktori istovremeno na najvišem ili najnižem nivou. Primjenjuje se kada je poznato da se optimum nalazi u centralnom području eksperimentalne domene, ili kada eksperimentalne tačke sa svim faktorima na ekstremnim nivoima nisu korisne ili nisu izvedive (Hibbert, 2012; Dejaegher i Vander Heyden, 2011). Box-Behnken dizajn se uglavnom koristi za optimizaciju HPLC metoda sa tri važna eksperimentalna faktora.

Doehlert dizajn je nerotirajući dizajn koji omogućava analitičaru da odabere različit broj nivoa za različite faktore. Faktorima koji se smatraju važnijim može se dodijeliti veći broj nivoa. Ovaj dizajn je ekonomičniji od centralnog kompozitnog dizajna i Box-Behnken dizajna. Pregled literature pokazuje da je Doehlert dizajn korišten za optimizaciju sastava mobilne faze i brzine protoka mobilne faze u većini HPLC studija (Jebali i sar., 2019).

D-optimalni dizajn je posljednja kategorija dizajna koja omogućava ispitivanje faktora na različitim brojevima nivoa, što može dovesti do asimetričnog oblika ispitivane domene. Na primjer, D-optimalni dizajn je asimetričan dizajn. Dizajni koji se koriste isključivo za proučavanje varijabli smjese, odnosno za optimizaciju sastava HPLC mobilne faze, nazivaju se dizajni smjese.

Podaci dobijeni eksperimentalnim dizajnom analiziraju se korištenjem računarskih metoda, tj. izračunavanjem regresionog modela primjenom metode najmanjih kvadrata. Kada se ova metoda koristi za modeliranje uticaja većeg broja faktora, riječ je o primjeni višestruke linearne regresije (engl. *Multiple Linear Regression, MLR*). Multipla regresiona analiza koristi se kada je potrebno uspostaviti matematičku vezu između više faktora i jednog odgovora sistema (Armstrong, 2006).

Dobijeni matematički model omogućava procjenu efekta pojedinačnih faktora ili interakcija između faktora na posmatrani odgovor sistema. Za opisivanje odnosa između faktora i povezivanje informacija o promjenama faktora sa promjenama odgovora, najčešće se koriste polinomijalne funkcije.

Postoje tri osnovna polinomijalna modela:

1. Linearni model (jednačina 1),
2. Model interakcija (jednačina 2),
3. Kvadratni model (jednačina 3).

Odabir odgovarajućeg modela zavisi od cilja eksperimenta – na primjer, za optimizaciju se koriste kvadratni modeli, dok se u preliminarnim istraživanjima često koriste modeli interakcije (Đorđević Filijović, 2015).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \varepsilon \quad (1.)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \varepsilon \quad (2.)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \varepsilon \quad (3.)$$

gdje su:

$x_1, x_2, \dots, x_i$ – faktori
 $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_i$ – koeficijenti regresionog modela
 ε – rezidua tj. odstupanje modelovanja
 y – odgovor sistema.

Koeficijenti regresionog modela pokazuju uticaj pojedinih faktora. Njihove vrijednosti odgovaraju polovini odgovarajuće procjene efekta.

Kada se prati uticaj više faktora na jedan odgovor sistema oni se međusobno povezuju formiranjem jednog modela, sa jednim setom regresionih koeficijenata. Sa druge strane, ukoliko se kao rezultat uticaja više faktora prate promjene nekoliko odgovora sistema (npr. M), tada se za opisivanje međusobnog odnosa među njima formira M modela i M setova regresionih koeficijenata.

Analiza varijanse, ANOVA, predstavlja statistički alat koji se koristi za procjenu regresionog modela i eksperimentalnog dizajna, odnosno načina na koji je opisan odnos između faktora i odgovora sistema. Za kvantifikaciju varijabilnosti koristi se zbir kvadrata (eng. *Sum of Squares, SS*). ANOVA omogućava podjelu ukupne varijanse izabranog odgovora sistema na dvije komponente, jedna koja potiče od regresionog modela i druga koja potiče od rezidua (jednačina 4).

$$SS_{\text{total corrected}} = SS_{\text{regression}} + SS_{\text{residual}} \quad (4.)$$

gdje je:

$SS_{total\ corrected}$ - ukupna varijansa odgovora korigovana za prosječnu vrijednost
 $SS_{regression}$ - varijansa koja se može modelovati
 $SS_{residual}$ - varijansa koja se ne može modelovati

Za model kažemo da je dobar ukoliko mu je varijansa koja se može modelovati ($SS_{regression}$) velika, a ona koja se ne može modelovati ($SS_{residual}$) mala. Varijansa koja se ne modeluje može da se podijeli na varijansu koja potiče od nesavršenosti modela ($SS_{model\ error}$) i varijansu do koje dolazi prilikom ponavljanja eksperimenata tzv. eksperimentalnu nesigurnost ($SS_{replicate\ error}$).

$$SS_{residual} = SS_{model\ error} + SS_{replicate\ error} \quad (5.)$$

U idealnom slučaju $SS_{model\ error}$ i $SS_{replicate\ error}$ su male i slične veličine.

Numeričke vrijednosti ovih varijansi porede se primjenom F-testa. Prvi F-test poredi $SS_{regression}$ pri broju stepeni slobode (d.f.=P-1) sa $SS_{residual}$ pri broju stepeni slobode (d.f.=N-P), gdje je P broj koeficijenata u jednačini regresionog modela, a N ukupan broj eksperimenata uključujući ponavljanja. Između dvije varijanse postoji statistički značajna razlika kada je $p < 0,05$. Drugi F test poredi $SS_{model\ error}$ pri broju stepeni slobode (d.f.=F-P) i $SS_{replicate\ error}$ pri broju stepeni slobode (d.f.=N-F), gdje je F broj kombinacija eksperimenata u eksperimentalnom dizajnu. Drugi F test se zove *lack-of-fit* test i služi za procjenu validnosti modela. Kada je vrijednost greške modela niska i model dobro opisuje eksperimentalne podatke, za takav model kažemo da nema *lack-of-fit*. U ovim situacijama $p > 0,05$.

ANOVA test daje procjenu i drugih indikatora performansi modela, kvadrata koeficijenta korelacije R^2 , kvadrata koeficijenta korelacije prilagođenog ukupnom broju eksperimenata R^2_{adj} (eng. *Goodness of fit*) i sposobnosti modela za predviđanje Q^2 (eng. *Goodness of prediction*). Kvadrat koeficijenta korelacije, R^2 , ukazuje na mogućnost modela da dobro opiše eksperimentalno dobijene podatke, dok Q^2 pokazuje sposobnost modela da predviđa nove eksperimentalne podatke. Dobar model ima visoke vrijednosti R^2 i Q^2 , koje se približavaju jedinici, kao i razliku $R^2 - Q^2 < 0,2 - 0,3$ (Đorđević Filijović, 2015).

Funkcije hromatografskog odgovora

Funkcija hromatografskog odgovora (eng. *Chromatographic Response Function*, CRF) je vrlo korisno matematičko rješenje, tj. koeficijent koji vrijednuje hromatografsku metodu sa aspekta više definisanih kriterijuma kvalitete (Jančić-Stojanović i sar., 2010; Kasagić i sar., 2013; Bezerra i sar., 2008; Cela i sar., 1989). U hromatografiji pod visokim pritiskom CRF se izračunava iz raznih hromatografskih karakteristika pikova supstanci iz smjese, kao što su širina pika, vrijeme zadržavanja, simetrija, itd. Koristi se kako bi se pomogao razvoj i optimizacija hromatografskih metoda, naročito za smjese sa većim brojem supstanci, gdje postoji mogućnost preklapanja pikova, kao kod analiza srodnih supstanci. Pomoću ovih funkcija se pored razdvajanja komponenata, procjenjuju i druge karakteristike metode kao što su vrijeme trajanja hromatografske analize, simetrija pika, itd. Sa matematičkog aspekta su dizajnirane tako da se sastoje iz nekoliko članova, od kojih svaki procjenjuje po jednu karakteristiku kvalitete hromatograma. Kombinacijom svih članova se dobije finalna numerička vrijednost. Na taj način će svaki hromatogram biti jednako ocijenjen, pa se jedino tako svi hromatogrami mogu porediti i rangirati (Cela i sar., 2003). Do sada je poznat velik broj funkcija hromatografskog odgovora

(Berridge, 1982; Schlabach i Excoffier, 1988; L. Morgan i N. Deming, 1975; Dose, 1987; Bylund i sar., 1997; Glajch i sar., 1980; Duarte i Duarte, 2010; Djordjević Filijović i sar., 2014), ali se čini da ni jedna nije savršena, te svaka sadrži nekoliko ograničenja koja se moraju uzeti u obzir prije nego što ih se odabere kao kriteriji za optimizaciju, naročito zbog činjenice da razlike u matematičkom pristupu mogu dovesti do značajnih razlika u procjeni hromatograma.

Većina funkcija hromatografskog odgovora sastoji se iz člana koji procjenjuje razdvajanje i člana koji procjenjuje dužinu trajanja hromatografske analize. Pojedine CRF koje su dizajnirane za analizu višekomponentnih smjesa sadrže i član koji mjeri broj supstanci koje se eluiraju. Ovaj član najčešće se definiše kao broj pikova koji su se eluirali na hromatogramu. Većina hromatografskih funkcij asadrži i težinske faktore koji prate navedene članove. Na taj način se kreiraju funkcije koje su prilagodljive raznim problemima, jer se analitičaru omogućava da definiše svoja očekivanja u vezi sa problemom koji rješava.

Hromatografska funkcija (CRF), koju je uveo Beridž (Berridge, 1982), procjenjuje kvalitet razdvajanja prema sljedećoj jednačini:

$$CRF = \sum_{i=1}^L Ri + L_1^w - w_2|T_A - T_L| - w_3|T_1 - T_0| \quad (6.)$$

gdje je R_i -rezolucija između i -tok pik para, L -broj parova pikova, T_A -specificirano vrijeme analize, T_L -vrijeme zadržavanja posljednjeg pika, T_1 -vrijeme zadržavanja prvog pika, T_0 -definisano minimalno vrijeme zadržavanja, $w_1:2$, $w_2:1$, $w_3:0,5$ - težinski faktori koje bira analitičar.

Beridžova funkcija je prva funkcija hromatografskog odgovora poznata u literaturi. Sastoji se iz četiri člana: prvi procjenjuje kvalitet separacije sabirajući faktore rezolucije ($\sum_{i=1}^L Ri$), drugi procjenjuje broj pikova koji su se pojavili na hromatogramu (L), treći procjenjuje vrijeme trajanja hromatografske analize ($T_A - T_L$) i četvrti procjenjuje vrijeme zadržavanja prvog pika koji se pojavio na hromatogramu ($T_1 - T_0$). Na osnovu jednačine se može zaključiti da u seriji analiza rađenih primjenom eksperimentalnog dizajna, najveću CRF vrijednost imaće hromatogram sa najbolje razdvojenim pikovima analiziranih jedinjenja.

Jedan od nedostataka ove hromatografske funkcije je to što loše razdvojeni pikovi ne utiču mnogo na njenu vrijednost, već se kvalitet hromatograma određuje dobro razdvojenim pikovima. Razdvajanje na baznoj liniji je pouzdano ukoliko pikovi imaju oblik Gausove krive, dok se u slučaju asimetričnih pikova teško određuje faktor rezolucije (Siouffi i Phan-Tan-Luu, 2000a). Međutim, ukoliko se CRF-funkcijom obuhvati samo razdvajanje pikova koji nisu dobro razdvojeni, CRF postaje važan parametar pri optimizaciji metoda u tačnoj hromatografiji.

Hromatografska eksponencijalna funkcija (eng. *Chromatographic Exponential Function*, CEF) koju je prvi primijenio Moris (Morris i sar., 1996) izračunava se prema sljedećoj jednačini:

$$CEF = \left[\left(\sum_{i=1}^{n-1} (1 - e^{a(R_{opt} - R_i)})^2 \right) + 1 \right] \left[1 + \frac{t_f}{t_{max}} \right] \quad (7)$$

gdje je R_{opt} - optimalna rezolucija za i -ti pik par (maksimalno dobijena R_i vrijednost je korištena kao optimalna rezolucija i -tog pik para), R_i - rezolucija između i -tog pik para, T_A - specificirano vrijeme

analize, T_L - vrijeme zadržavanja posljednjeg pika, t_{max} - maksimalno prihvatljivo vrijeme, t_f - vrijeme zadržavanja posljednjeg pika, a - faktor za podešavanje nagiba krive koji iznosi 3 i n - broj očekivanih pikova.

$$\left(\left(\sum_{i=1}^{n-1} (1 - e^{a(R_{opt}-R_i)})^2 \right) + 1 \right) \quad (8)$$

Eksponecijalna funkcija sadrži dva člana: prvi koji procjenjuje razdvajanje i drugi koji procjenjuje vrijeme trajanja analize $\left(1 + \frac{t_f}{t_{max}}\right)$. Jednačina pokazuje da će u seriji analiza rađenih primjenom eksperimentalnog dizajna najmanju vrijednost imati hromatogram sa najbolje razdvojenim pikovima ispitivanih jedinjenja. Prednost ove hromatografske funkcije je to što nema nedefinisanih tačaka i manji akcenat se stavlja na vrijeme trajanja analize u odnosu na rezoluciju, što ima više smisla.

Glajcova hromatografska objektivna funkcija (eng. *Glajchs Chromatographic Objective Function*, COF) (Glajch i sar., 1980) se izračunava prema sljedećoj jednačini:

$$COF = \sum_{i=1}^n A_i \ln(R_i/R_{id}) + B(t_m - t_n) \quad (9)$$

gdje su R_i i R_{id} eksperimentalno dobijeni i željeni rezolucioni faktori između susjednih pikova, posljedično, t_m i t_n su željena i eksperimentalno dobijena vremena zadržavanja zadnjeg eluirajućeg pika, odnosno A_i i B su težinski faktori.

Dozova hromatografska funkcija odgovora (eng. *Dose*, $D_{0,CRF}$) se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$D_{0CRF} = \frac{t_{R,n}}{t_{R,crit}} + \sum_{i \neq j} e^{-R_{s,ij}/R_{s,crit}} \quad (10)$$

gdje su $t_{R,n}$ i $t_{R,crit}$ vremena zadržavanja zadnjeg eluirajućeg pika i željenog vremena zadržavanja, odnosno, $R_{s,ij}$ je eksperimentalno dobijen faktor rezolucije između susjednih pikova dok je $R_{s,crit}$ željeni faktor rezolucije postavljen od analitičara.

Šlabahova hromatografsko rezoluciona statistička funkcija (eng. *Schlabach chromatographic resolution statistics*, CRS) (Schlabach i Excoffier, 1988) se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{(R_i - R_{opt})^2}{R_i(R_i - R_{min})^2} \right] + \sum \frac{(R_i)^2}{(n-1)R_{av}^2} \right\} \times \frac{t_f}{n} \quad (11)$$

gdje su R_i , R_{opt} i R_{min} eksperimentalno dobijeni, željeni/optimalni i minimalno prihvatljivi faktori rezolucije. R_{av} je prosječna vrijednost svih eksperimentalno dobijenih faktora rezolucije, t_f je vrijeme eluiranja zadnjeg eluirajućeg pika i n je ukupan broj pikova na hromatogramu.

Duarteova hromatografska funkcija odgovora (eng. *Duartes chromatographic response function*, D_{CRF}) se izračunava prema formuli:

$$D_{CRF} = \sum_{i=1}^{N-1} \phi_{S,1} + N - \left(\frac{t_{R,L} - t_0}{t_{R,L}} \right) \quad (12)$$

gdje je $t_{R,1}$ vrijeme eluiranja posljednjeg pika, t_0 je volumen mobilne faze u koloni, N je ukupan broj pikova koji se pojavljuju na hromatogramu i ϕ se računa prema Karlovoj jednačini, kako slijedi:

$$\phi_{S,1} = 1 - \left(\frac{H_v \times |t_{R,l} - t_{R,s}|}{|t_{R,v} - t_{R,s}|} \times (H_l - H_s) + H_s \times |t_{R,l} - t_{R,s}| \right) \quad (13)$$

gdje su H_s i H_l visine susjednih pikova, H_v je visina doline, $t_{R,s}$ i $t_{R,l}$ su vremena zadržavanja pikova i $t_{R,v}$ je vremenska pozicija doline.

Funkcija hromatografskog odgovora treba biti dovoljno pouzdana i sposobna da sa zadovoljavajućom tačnošću procjenjuje hromatograme, ali nije realno očekivati da je niti jedna odabrana „idealna“. Takva funkcija bi trebala da bude efikasna u poređenju i razlikovanju hromatograma, efikasna u kvantitativnom rangiranju kvalitete hromatograma, da odgovara očekivanjima analitičara, da zavisi od parametara koje analitičar može kontrolisati, a ne uključuje parametre koje nije moguće kontrolisati, da posjeduje korelaciju sa separacionim parametrima da bi uz pomoć nje analitičar znao šta da poboljša kod narednog eksperimenta i da bude matematički korektna (Crevar-Sakač i sar., 2013; Petkovska i Dimitrovska, 2008).

Eksperimentalni dizajn (DoE) – pristup zasnovan na razvoju i validaciji RP-HPLC analitičke metode za određivanje Efavirenza (EFZ) u bulku i formulacijama

Preliminarna ispitivanja su provedena upotrebom Plackett-Burman dizajna za identifikaciju faktora koji značajno utiču na odgovore, kao vrijeme zadržavanja, broj teoretskih tavana, tailing faktor (10%) i visinu ekvivalentnu teoretskom tavanu HPLC metode (Saha i Pandey, 2022). Udio acetonitrila u mobilnoj fazi, temperatura kolone, molarnost pufera, volumen injiciranja, pH pufera, brzina protoka i talasna dužina detekcije zavisni su faktori koji zapravo utiču na odgovore HPLC metode. Svi zavisni faktori varirali su u dva nivoa predstavljeni kao +1 i -1. Design-Expert® Software verzija 8.1 predložio je ukupno 12 eksperimenata za preliminarna ispitivanja.

Na osnovu preliminarnih ispitivanja su odabrani faktori koji kritično utiču na odgovore HPLC metode i studija optimizacije provedena je korištenjem Box Behnken dizajna. Utvrđeno je da su udio acetonitrila u mobilnoj fazi, pH pufera i brzina protoka značajni faktori za odgovore, tj. vrijeme zadržavanja i broj teoretskih tavana HPLC metode. Sva tri zavisna kritična faktora data su na tri nivoa: visoki (+1), srednji (0) i niski (-1). Za udio acetonitrila u mobilnoj fazi (+1) = 60%v/v, (0) = 55%v/v i (-1) = 50%v/v, za pH pufera (+1) = 6, (0) = 5 i (-1) = 4 i za brzinu protoka (+1) = 1,25 ml/min, (0) = 1,00 ml/min i (-1) = 0,75 ml/min. Dizajnirana je matrica s ukupno 17 eksperimenata kao što je predložio Design-Expert® te je korišteno 33 eksperimenta za Box-Behnken dizajn. Cilj studije optimizacije bio je postići minimalno vrijeme zadržavanja, s maksimalnim brojem teoretskih tavana, te dobiti dobar, oštar, dobro razdvojen EFZ pik.

Statistička analiza podataka provedena je korištenjem Design-Expert® uz pomoć Pareto dijagrama. Pareto dijagrami pokazali su da su vrlo značajni faktori udio acetonitrila u mobilnoj fazi, pH i brzine protoka, na oba odgovora, tj. vrijeme zadržavanja i broj teoretskih tavana HPLC metode jer je utvrđeno da su veći od granice t-vrijednosti i Bonferronijeve granice u Pareto dijagramima, s visokom statističkom signifikantnošću. Sva tri faktora negativno su uticala na vrijeme zadržavanja i broj teoretskih tavana. Ova tri parametra koji značajno utiču na odgovore su zatim odabrani kao kritični faktori za studije optimizacije metode korištenjem Box-Behnken dizajna. Studija optimizacije metode je provedena kako bi se dobila optimizirana i validirana hromatografska metoda. Dobijeni

podaci uklopljeni su u različite modele, a konačni model odabran je ovisno o najvišoj F-vrijednosti, p-vrijednosti i r^2 za buduće eksperimente. Model je potvrđen korištenjem dvostranog ANOVA testa.

Dijagrami površine odgovora su pokazali isti odnos između faktora i odgovora hromatografske metode kao i regresioni koeficijenti iz polinomne jednačine. Na vrijeme zadržavanja, udio acetonitrila i pH imaju negativan efekat kada se brzina protoka održava na srednjem nivou.

Dijagrami su pokazali da pH nema značajan efekat na vrijeme zadržavanja, ali brzina protoka ima negativan efekat na vrijeme zadržavanja. Isto potvrđuju i regresioni koeficijenti u polinomnoj jednačini.

Udio acetonitrila i pH mobilne faze imaju negativan efekat na broj teoretskih tavana kao i kada se zadržava pH na srednjem nivou. Postoji negativan efekat pH i brzine protoka na broj teoretskih tavana kada se udio acetonitrila održava konstantnim na srednjem nivou. Isto potvrđuju regresioni koeficijenti u polinomnoj jednačini za broj teoretskih tavana.

Na kraju je zaključeno da su optimalni uslovi sljedeći: udio acetonitrila: 51,17% v/v, pH: 4,04, brzina protoka: 1,25 ml/min, dok su dobijeni odgovori vrijeme zadržavanja: 11,031 min i broj teoretskih tavana: 9.498.787. Koristeći gore navedene optimizirane hromatografske uslove provedeno je šest eksperimenata i odgovori su upoređeni s predviđenim vrijednostima koje je dao model, koristeći t-test. Rezultati statističkog ispitivanja pokazali su da srednje vrijednosti i vrijednosti standardne devijacije za vrijeme zadržavanja i broj teoretskih tavana nisu značajno različite, na 0,05 nivou signifikantnosti.

Optimizacija RP-UFLC metode za simultanu kvantifikaciju Remogliflozina (REM) i Teneligliptina (TEN) korištenjem eksperimentalnog dizajna

Za optimizaciju metode je korišten dizajn površine odgovora (RSM) ili multivarijetni optimizacijski pristup koji ispituje efekte različitih varijabilnih faktora (Panchal i Dhalani, 2024). Korištenjem RSM-a je potrebno manje vremena i zahtijeva manje eksperimentiranja. RSM daje vrijedne informacije o međudjelovanju različitih hromatografskih parametara uključujući relevantne podatke i statistiku. Eksperimentalni dizajn koristio je trofaktorski Box-Behnkenov dizajn na tri nivoa. Tri faktora brzina protoka (1,8; 2,0; 2,2), pH (4,5; 5,0; 6,0) i koncentracija acetonitrila (55%; 60%; 65%) su bili uzeti u obzir kao hromatografski parametri. Rezolucija između pikova i vrijeme zadržavanja REM-a su korišteni kao odgovori. Koristeći pet centralnih tačaka i slučajnim redoslijedom provedeno je 17 testova prema Design Expert ver.13. Kvadratni regresioni model je korišten za procjenu uticaja faktora na rezoluciju i vrijeme zadržavanja. Vrijednosti regresionih koeficijenta kao i p-vrijednosti ($p < 0,05$) pokazale su da je rezolucija između pikova pod značajnim uticajem svakog od tri faktora, te da je svaki od tri faktora imao važan efekat na vrijeme zadržavanja. Efekat protoka, pH i udio acetonitrila, kao i kvadratni efekat ovih varijabli na rezoluciju su bili vrlo značajni ($p < 0,001$). pH i rezolucija je pokazala pozitivnu vezu, ali je udio acetonitrila i protok imao suprotan efekat. Sve tri karakteristike su smanjile rezoluciju između REM i TEN. F-vrijednosti u odnosu na model su bile 759,70 za rezoluciju, odnosno 189,18 za vrijeme zadržavanja, dok je $p < 0,05$. S visokim vrijednostima rezolucije i niskom vrijednošću vremena zadržavanja za REM, regresioni koeficijenti odgovaraju modelu. Uzevši u obzir grafički prikaz površina, rezolucija se poboljšava snižavanjem postotka acetonitrila. Kraće vrijeme analize postiže se smanjenjem postotka acetonitrila, jer je povećanje koncentracije acetonitrila dovelo do smanjenja vremena zadržavanja REM-a, ali i smanjenja rezolucije. Očekivana i stvarna vrijednost

rezolucije su bile slične. Vrijeme zadržavanja za REM od 1,2–1,5 i rezolucija između pikova od 6,0–6,5 su odabrane kako bi se dobila metoda ultra-brze tečne hromatografije (eng. *Ultra-Fast Liquid Chromatography*, UFLC) sa odgovarajućim trajanjem analize i prihvatljivom visokom rezolucijom. U konačnici, model je pokazao da su optimalni hromatografski uslovi 59% acetonitrila, pH 5,1 i protok 2,2 ml/min.

Razvoj, optimizacija i validacija RP-HPLC metode za kvantifikaciju Resveratrola (RSV)

U ovoj studiji, preliminarna ispitivanja su urađena korištenjem 2^3 punog faktorijelnog dizajna, te je provedeno ukupno 8 eksperimenata (Shah i Nayak, 2019). Praćeni su efekti neovisnih faktora kao što su udio acetonitrila, pH puferne otopine amonijevog acetata i brzina protoka mobilne faze na odgovore kao vrijeme zadržavanja, površina, tailing faktor (10%) i broj teoretskih tavana pomoću dijagrama perturbacije u softveru Design Expert verzija 9.0.3.1. Dijagram perturbacije je pokazao da na vrijeme zadržavanja značajno utiču promjene postotka acetonitrila i brzine protoka mobilne faze. Vrijeme zadržavanja se smanjuje, s povećanjem faktora postotka acetonitrila i protoka mobilne faze, dok na njega ne utiču promjene pH mobilne faze. Na vrijeme zadržavanja značajno utiče promjena brzine protoka mobilne faze. Vrijeme zadržavanja se smanjuje sa povećanjem brzine protoka, dok na njega ne utiču udio acetonitrila i pH mobilne faze. Na odgovor tailing faktor (10%) značajno je uticala promjena navedenih faktora. Tailing faktor se smanjuje s povećanjem postotka acetonitrila, dok raste s brzinom protoka mobilne faze. pH mobilne faze nije imao značajan efekat na tailing faktor. Efekat faktora na broj teoretskih tavana je pokazao da se smanjenje broja teoretskih tavana dešava sa povećanjem postotka acetonitrila i brzine protoka mobilne faze, dok na njega ne utiče promjena pH vrijednosti mobilne faze. Polinomne jednačine su generirane sa DOE softverom i analizirane ANOVA regresionom metodom. Rezultati analize studija robusnosti pokazali su da su kvadratni efekti faktora i odgovora bili statistički signifikantni. Na kraju je zaključeno da su optimalni uslovi sljedeći: udio acetonitrila: 45% v/v, pH: 4,50, brzina protoka: 0,9 ml/min, dok je dobijeno vrijeme zadržavanja: 5,8 min.

Multivarijetna optimizacija i validacija RP-HPLC analitičke metode za određivanje losartan kalija u kapsulama

Eksperimentalni pristup usvojen u ovom radu proveden je prema uputama Montgomery (Montgomery, 2013) kako bi se istražilo koji su eksperimentalni faktori najvažniji, a koji faktori ne utiču značajno na eksperimentalne rezultate. Ispitivano je pet faktora na dva nivoa, donjem (–) i gornjem (+) (Bonfilio i sar., 2009). Faktori i njihovi nivoi su bili sljedeći: pH pufera korištenog u mobilnoj fazi (2,5 i 7,0), udio fosfatnog pufera u mobilnoj fazi (60% i 70%), temperatura kolone (25°C i 35°C), brzina protoka mobilne faze (0,8 i 1,2 ml/min) i tip kolone (RP-8 i RP-18). Analitički odgovor korišten u ovom eksperimentalnom dizajnu temeljio se na odnosu teoretskih tavana/vremena zadržavanja, kako bi se optimiziralo što kraće trajanje analize. Nakon utvrđivanja odgovora zasnovanih na odnosu teoretskih tavana/vremena zadržavanja, odabran je frakcijski faktorski dizajn 2^{5-1} s ukupno 16 eksperimenata, a svaki je eksperiment izveden dva puta nasumičnim redoslijedom. Procijenjeni kontrast, kao i efekat svakog faktora, prosjek je svih dobijenih vrijednosti (u ovom slučaju, teoretski tavani/vrijeme zadržavanja) kada su faktori bili na pozitivnom nivou, minus prosjek vrijednosti koje odgovaraju linijama kada su na negativnom nivou. Nakon utvrđivanja značajnih faktora iz frakcijskog faktorskog dizajna, urađena je optimizacija korištenjem Doehlertovog dizajna, koji se sastoji od sedam uslova, sa centralnom tačkom provedenom u triplikatu. Faktori i njihovi nivoi su: pufer koji se koristi u mobilnoj fazi (2,0; 3,25; 4,5; 5,75 i 7,0) i udio fosfatnog pufera u mobilnoj fazi (60%; 65% i 70%).

Iz ovog dizajna bilo je moguće primijeniti metodu površine odgovora (RSM) za optimizaciju nivoa faktora. Svi podaci obrađeni su statističkim programom StatSoft verzija 6,0. Nakon optimizacije metode, HPLC analize su provedene korištenjem pufera kalijevog fosfata (pH 6,2; 58 mmol l⁻¹) i acetonitrila (65:35, v/v) kao mobilne faze, brzina protoka pri 1,0 ml min⁻¹ s temperaturom kolone od 35°C, analitička kolona Nucleosil C8, korištenjem talasne dužine-UV detekcije na 254 nm i 20 µl volumena injiciranja. Kada procijenjeni kontrasti faktorskog dizajna premaše procijenjenu grešku, ovaj efekat postaje statistički značajan. Varijable s pozitivnim procijenjenim kontrastima pokazuju da povećanje njihovog nivoa osigurava značajno povećanje analitičkog odgovora, a negativni efekti znače da se viši odnos teoretskih tavana i vremena zadržavanja postiže smanjenjem nivoa varijabli. Poređenjem rezultata procijenjenog kontrasta s procijenjenom pogreškom zaključeno je da su svi faktori statistički značajni. Pozitivni procijenjeni kontrasti za temperaturu, pH pufera i brzinu protoka mobilne faze pokazuju da se analitički signal značajno povećava s povećanjem nivoa ovih faktora. S druge strane, procijenjeni kontrasti za udio fosfatnog pufera i vrstu kolone su negativni, što ukazuje da će se viši analitički signal postići smanjenjem njihovih nivoa. Kako je vrsta kolone kvalitativni faktor, odlučili su usvojiti kolonu C8 za naredne studije. Vrijednosti temperature kolone iznad 35°C nisu ispitane jer upotreba mobilne faze pri visokom pH i visokim temperaturama može oštetiti silicij stacionarne faze. Stoga je temperatura kolone postavljena na 35°C. Povećanje analitičkog odgovora uočeno s povećanjem brzine protoka mobilne faze pripisano je smanjenju vremena zadržavanja i, naravno, popraćeno smanjenjem teoretskih tavana. Vrlo visoko povećanje brzine protoka mobilne faze nije korisno, jer može štetiti procesu difuzije losartan kalija između nepokretne i mobilne faze. Stoga je brzina protoka mobilne faze fiksirana na srednju vrijednost (1 ml/min). Zbog značajne interakcije između udjela komponenti u mobilnoj fazi i pH pufera korištenog u mobilnoj fazi, konačna optimizacija ovih faktora postignuta je dizajnom Doehlerta. Smanjenje udjela fosfata u mobilnoj fazi kada je pH vrijednost niska dovodi do značajnog poboljšanja analitičkog signala. S druge strane, kada se pH održava na visokoj vrijednosti, na primjer pH 7,0, smanjenje udjela fosfata je samo malo značajno. Stoga, korištenjem visokih pH vrijednosti unutar eksperimentalne domene, bilo koji udio fosfata može se koristiti bez značajne promjene u analitičkom odgovoru. Osim toga, mora se naglasiti da se takvi rezultati nikada ne bi mogli uočiti da je korištena univarijantna metoda. Dakle, iako visoke pH vrijednosti daju najbolje rezultate, odlučili su koristiti fosfatni pufer na pH 6,2 kako bi očuvali životni vijek kolone, dok je udio fosfata u puferu na pH 6,2 bio fiksiran na 65%. Nisu korišteni manji odnosi sadržaja puferske mobilne faze, jer je eksperimentalno uočeno da ovo stanje može uzrokovati vrlo nisko vrijeme zadržavanja. Stoga, metoda razvijena za određivanje losartan kalija u kapsulama ima sljedeće hromatografske parametre: kalij fosfatni pufer (pH 6,2; 58 mmol/l)–acetonitril (65:35, v/v) kao mobilna faza, brzina protoka na 1,0 ml/min s temperaturom kolone od 35°C, C8 analitička kolona, UV detekcija talasna dužina na 254 nm i 20 µl volumena injekcije.

Regulatorne smjernice za korištenje eksperimentalnog dizajna (DoE) u razvoju i optimizaciji HPLC metode

Quality-by-Design (QbD) je specifičan koncept koji se koristi u razvoju lijekova s krajnjim ciljem osiguranja kvaliteta konačnog proizvoda. Zbog značajne uloge koju analitički postupci igraju u procjeni kvalitete upotreba QbD pristupa za razvoj farmaceutskih metoda je definisana kroz nekoliko regulatornih dokumenata uključujući smjernice Međunarodnog vijeća za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu (eng. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), kao što su ICH Q8, ICH Q9, ICH

Q10 i ICH Q11. Robusnost metoda treba procijeniti sistemskim pristupom koji uključuje početnu procjenu rizika i multivarijantni eksperimentalni pristup, kao što je DoE.

Načela QbD primijenjena na razvoj analitičkih metoda označavaju se kao Analytical QbD (AQbD). Istraživanje literature otkrilo je veliki broj HPLC metoda koje su posljednjih godina razvijene korištenjem AQbD pristupa zasnovanog na DoE (Yabré i sar., 2020); (Saini i sar., 2020); Otašević i sar., 2019; Sylvester i sar., 2018, (Patel i Kothari, 2016); (Panda i sar., 2021)

ZAKLJUČAK

Eksperimentalni dizajn čini okosnicu mnogih naučnih istraživanja, djelujući kao poveznica između pukog posmatranja i pronicljivog zaključivanja. Razumijevanje njegovih osnova je neophodno kako bi se mogao koristiti u razvoju učinkovitih i robusnih metoda. Prikladan eksperimentalni dizajn je specifičan za pojedinačnu studiju, te pri odabiru treba uzeti u obzir prednosti, nedostatke i posebne karakteristike koje pruža određeni dizajn, kako je objašnjeno u ovom preglednom radu. Korištenje QbD-a u kombinaciji s eksperimentalnim dizajnom rezultira analitičkom metodom visoke tačnosti i preciznosti, čija se primjena temelji na upravljanju rizikom.

LITERATURA

1. Armstrong NA (2006) Pharmaceutical experimental design and interpretation, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton
2. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP et al (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 15;76(5):965–77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
3. Berridge JC (1982) Unattended optimisation of reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations using the modified simplex algorithm. *J Chromatogr A* 244(1):1–14. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)80117-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80117-X)
4. Bhattacharya S (2021) Central Composite Design for Response Surface Methodology and Its Application in Pharmacy <https://www.intechopen.com/books/response-surface-methodology-in-engineering-science/central-composite-design-for-response-surface-methodology-and-its-application-in-pharmacy>. Accessed 16 December 2024.
5. Bonfilio R, Tarley CRT, Pereira GR et al (2009) Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. *Talanta* 80(1):236–41. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.060>
6. Bylund D, Bergens A, Jacobsson SP (1997) Optimisation of chromatographic separations by use of a chromatographic response function, empirical modelling and multivariate analysis. *Chromatographia* 44(1–2):74–80. <https://doi.org/10.1007/BF02466519>
7. Carlson R (2001) Design of Experiments, Principles and Applications. *J Chemom* 15(5):495–6. <https://doi.org/10.1002/cem.686>
8. Cela R, Barroso CG, Pérez-Bustamante JA (1989) Objective functions in experimental and simulated chromatographic optimization. *J Chromatogr A* 485:477–500. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89157-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89157-3)

9. Cela R, Martínez JA, González-Barreiro C et al (2003) Multi-objective optimisation using evolutionary algorithms: its application to HPLC separations. *Chemom Intell Lab Syst* 69(1–2):137–56. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2003.07.001>
10. Crevar-Sakač M, Vujić Z, Brborić J et al (2013) An Improved HPLC Method with the Aid of a Chemometric Protocol: Simultaneous Determination of Atorvastatin and Its Metabolites in Plasma. *Molecules* 25;18(3):2469–82. <https://doi.org/10.3390/molecules18032469>
11. Dejaegher B, Vander Heyden Y (2009) The use of experimental design in separation science. *Acta Chromatogr* 21(2):161–201. <https://doi.org/10.1556/AChrom.21.2009.2.1>
12. Dejaegher B, Vander Heyden Y (2011) Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J Pharm Biomed Anal* 56(2):141–58. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.04.023>
13. Djordjević Filijović N, Pavlović A, Nikolić K et al (2014) Validation of an HPLC method for determination of aripiprazole and its impurities in pharmaceuticals. *Acta Chromatogr* 26(1):13–28. <https://doi.org/10.1556/AChrom.26.2014.1.15>
14. Dose E V (1987) Off-line optimization of gas chromatographic temperature programs. *Anal Chem* 1;59(19):2420–3. <https://doi.org/10.1021/ac00146a021>
15. Duarte RMBO, Duarte AC (2010) A new chromatographic response function for use in size-exclusion chromatography optimization strategies: Application to complex organic mixtures. *J Chromatogr A* 1217(48):7556–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.021>
16. Glajch JL, Kirkland JJ, Squire KM et al (1980) Optimization of solvent strength and selectivity for reversed-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. *J Chromatogr A* 199:57–79. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)91361-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)91361-5)
17. Hibbert DB (2012) Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J Chromatogr B* 910:2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>
18. Hubert C, Lebrun P, Houari S et al (2014) Improvement of a stability-indicating method by Quality-by-Design versus Quality-by-Testing: A case of a learning process. *J Pharm Biomed Anal* 88:401–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.09.026>
19. Huynh-Ba K (2009) *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-85627-8>
20. Jebali S, Belgacem C, Louhaichi MR et al (2019) Application of Factorial and Doehlert Designs for the Optimization of the Simultaneous Separation and Determination of Antimigraine Drugs in Pharmaceutical Formulations by RP-HPLC-UV. *Int J Anal Chem* 15;2019:1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/9685750>
21. Jančić Stojanović B (2013) Factorial-Based Designs in Liquid Chromatography. *Chromatographia* 76(5–6):227–40. <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2350-1>
22. Jančić-Stojanović B, Popović I, Malenović A et al (2010) Factorial Design in Optimization of Chromatographic Separation of Ramipril and Its Impurities. *Chromatographia* 71(9–10):799–804. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1546-5>
23. Kasagić I, Malenović A, Jovanović M et al (2013) Chemometrically assisted optimization and validation of RP-HPLC method for the analysis of itraconazole and its impurities. *Acta Pharm* 1;63(2):159–73. <https://doi.org/10.2478/acph-2013-0015>
24. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L et al (1998) Experimental design and optimization. *Chemom Intell Lab Syst* 42(1–2):3–40. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00065-3)
25. L Morgan S, N Deming S (1975) Optimization strategies for the development of gas-liquid chromatographic methods. *J Chromatogr A* 112:267–85. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)99959-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)99959-X)

26. Mason RL, Gunst RF, Hess JL (2003) Statistical Design and Analysis of Experiments: With Applications to Engineering and Science. In: Wiley 1st ed; New Jersey, USA. <https://doi.org/10.1002/0471458503>
27. Montgomery DC (2013) Design and analysis of experiments. NJ: John Wiley & Sons, New York, USA
28. Morris VM, Hughes JG, Marriott PJ (1996) Examination of a new chromatographic function, based on an exponential resolution term, for use in optimization strategies: application to capillary gas chromatography separation of phenols. *J Chromatogr A* 755(2):235–43. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00600-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00600-0)
29. Otašević B, Šljivić J, Protić A et al (2019) Comparison of AQbD and grid point search methodology in the development of micellar HPLC method for the analysis of cilazapril and hydrochlorothiazide dosage form stability. *Microchem J* 145:655–63. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.033>
30. Panda SS, Dutta S, Bera R K V V et al (2021) Analytical eco-scale and quality by design-oriented liquid chromatography method for simultaneous quantification of metoprolol succinate, telmisartan, and cilnidipine in their fixed-dose combination. *Sep Sci PLUS* 4(3):128–36. <https://doi.org/10.1002/sscp.202000115>
31. Panchal J, Dhalani J (2024) An optimization through experimental design approach for simultaneous quantification of Remogliflozin and Teneligliptin by RP-UFLC. *Res J Chem Environ* 30;28(11):16–24. <https://doi.org/10.25303/2811rjce016024>
32. Patel MN, Kothari CS (2016) Multivariate Approaches for Simultaneous Determination of Avanafil and Dapoxetine by UV Chemometrics and HPLC-QbD in Binary Mixtures and Pharmaceutical Product. *J AOAC Int* 1;99(3):649–63. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0259>
33. Petkovska R, Cornett C, Dimitrovska A (2008) Development and Validation of Rapid Resolution RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Atorvastatin and Related Compounds by Use of Chemometrics. *Anal Lett* 5;41(6):992–1009. <https://doi.org/10.1080/00032710801978566>
34. Petkovska R, Dimitrovska A (2008) Use of chemometrics for development and validation of an RP-HPLC method for simultaneous determination of haloperidol and related compounds. *Acta Pharm* 58(3). <https://doi.org/10.2478/v10007-008-0019-y>
35. Pous-Torres S, Torres-Lapasió JR, Baeza-Baeza JJ et al (2008) Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. *J Chromatogr A* 1193(1–2):117–28. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.019>
36. Rakić T, Kasagić-Vujanović I, Jovanović M et al (2014) Comparison of Full Factorial Design, Central Composite Design, and Box-Behnken Design in Chromatographic Method Development for the Determination of Fluconazole and Its Impurities. *Anal Lett* 24;47(8):1334–47. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.867503>
37. Saha P, Pandey MM (2022) Design of Experiment (DoE)-Approach Based RP-HPLC Analytical Method Development and Validation for Estimation of Efavirenz in Bulk and Formulations. *J Chromatogr Sci* 1;60(1):35–44. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab029>
38. Saini S, Sharma T, Patel A et al (2020) QbD-steered development and validation of an RP-HPLC method for quantification of ferulic acid: Rational application of chemometric tools. *J Chromatogr B* 1155:122300. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122300>
39. Schmidt AH, Molnár I (2013) Using an innovative Quality-by-Design approach for development of a stability indicating UHPLC method for ebastine in the API and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 78–79:65–74. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.01.032>
40. Schlabach TD, Excoffier J L (1988) Multi-variate ranking function for optimizing separations. *J Chromatogr A* 439(2):173–84. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83832-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83832-2)

41. Shah AA, Nayak Y (2019) Development, Optimisation and Validation of RP-HPLC Method for the Quantification of Resveratrol. *Indian J Pharm Educ Res* 17;53(3s):s356–63. <https://doi.org/10.5530/ijper.53.3s.106>
42. Siouffi AM, Phan-Tan-Luu R (2000) Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 892(1–2):75–106. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00247-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00247-8)
43. Slutsky B (1998) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. *J Chem Inf Comput Sci* 23;38(6):1254–1254. <https://doi.org/10.1021/ci980427d>
44. Sylvester B, Tefas L, Vlase L et al (2018) A Quality by Design (QbD) approach to the development of a gradient high-performance liquid chromatography for the simultaneous assay of curcuminoids and doxorubicin from long-circulating liposomes. *J Pharm Biomed Anal* 158:395–404. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.018>
45. Toms D, Deardon R, Ungrin M (2017) Climbing the mountain: Experimental design for the efficient optimization of stem cell bioprocessing. *J Biol Eng* 11(1):110. doi:10.1186/s13036-017-0078-z
46. Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J et al (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal* 24(5–6):723–53. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00529-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00529-X)
47. Vander Heyden Y, Perrin C, Massart DL (2020) Chapter 6 Optimization strategies for HPLC and CZE. In: *Handbook of Analytical Separations* <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567719200800091>. Accessed 12 December 2024
48. Vander Heyden Y, Questier F, Massart L. (1998) Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels. *J Pharm Biomed Anal* 18(1–2):43–56. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00174-5)

**STRUČNI RADOVI/
PROFESSIONAL PAPERS**

PROFESIONALNA OBOLJENJA U FARMACIJI

Enisa Redžić¹, Merima Ibišević¹, Maida Šljivić Husejnović¹

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

Stručni rad

SAŽETAK

Farmaceutski radnici suočavaju se s različitim rizicima koji mogu dovesti do profesionalnih oboljenja, uključujući respiratorne, alergijske, mišićno-koštane i mentalne poremećaje. Izloženost toksičnim hemikalijama, ponavljajućim pokretima, stresu i neprikladnim radnim uslovima glavni su uzroci tih oboljenja. Respiratorna oboljenja, poput astme i hroničnog bronhitisa, često su rezultat izloženosti hemijskim supstancama u laboratorijama i apotekama. Alergijske reakcije na hemikalije, dermatitis i druge kožne bolesti također su česte među farmaceutima. Fizički problemi, poput bolova u leđima i sindroma karpalnog tunela mogu nastati zbog ponavljajućih pokreta i loših radnih položaja. Mentalni stres, anksioznost i sindrom sagorijevanja („burnout“) predstavljaju ozbiljan izazov zbog visokih zahtjeva i pritisaka u svakodnevnom radu. Prevencija ovih oboljenja podrazumijeva upotrebu zaštitne opreme, pravilnu ergonomiju radnog prostora, redovne pauze i fizičku aktivnost, kao i edukaciju i psihološku podršku farmaceutima. Samo adekvatnom zaštitom i pristupom zdravstvenim mjerama moguće je osigurati sigurnije radno okruženje za farmaceutske radnike.

Ključne riječi: profesionalne bolesti, farmacija, respiratorna oboljenja, alergije, stres, prevencija

Autor za korespondenciju: mr ph. Enisa Redžić
E-mail: redzicenisa8@gmail.com

PROFESSIONAL DISEASES IN PHARMACY

Enisa Redžić¹, Merima Ibišević¹, Maida Šljivić Husejnović¹

¹*Faculty of Pharmacy, University of Tuzla, Urfeta Vejzagića 8, Tuzla, Bosna i Hercegovina*

Professional paper

ABSTRACT

Pharmaceutical workers face various risks that can lead to occupational diseases, including respiratory, allergic, musculoskeletal, and mental disorders. Exposure to toxic chemicals, repetitive movements, stress, and inadequate working conditions are the primary causes of these health issues. Respiratory conditions such as asthma and chronic bronchitis often result from exposure to chemical substances in laboratories and pharmacies. Allergic reactions to chemicals, dermatitis, and other skin conditions are also common among pharmacists. Physical problems such as back pain and carpal tunnel syndrome may arise due to repetitive motions and poor working postures. Mental stress, anxiety, and burnout pose significant challenges due to the high demands and pressures of daily work. Preventive measures include the use of protective equipment, maintaining proper workspace ergonomics, taking regular breaks, engaging in physical activity, and providing pharmacist with education and psychological support. Only through adequate protection and comprehensive health measures can a safer working environment be ensured for pharmaceutical workers.

Keywords: *professional diseases, pharmacy, respiratory diseases, allergies, stress, prevention*

Corresponding author: mr ph. Enisa Redžić
E-mail: redzicenisa8@gmail.com

UVOD

Profesionalne bolesti u farmaceutskoj djelatnosti nastaju kao rezultat izlaganja farmaceutskih radnika raznim hemikalijama, lijekovima i drugim toksičnim supstancama. Izloženost tim faktorima može dovesti do niza akutnih i hroničnih zdravstvenih problema, koji se, zavisno od simptoma, mogu podijeliti u različite kategorije. Kao kompleksna i svestrana oblast, farmacija zahtjeva preciznost, visoke tehnološke standarde, neprekidnu kontrolu kvaliteta i konstantan naučnoistraživački rad, što može rezultirati svakodnevnim stresom i pritiskom na radnom mjestu, povredama ili nekim dugoročnim zdravstvenim problemima. Zbog toga je jako važno da psihofizičko zdravlje radnika u farmaceutskoj praksi postane univerzalna briga, te da se razviju odgovarajuće strategije za zaštitu i prevenciju profesionalnih bolesti.

KLASIFIKACIJA PROFESIONALNIH OBOLJENJA U FARMACIJI

1. **Respiratorne bolesti** – Farmaceutski radnici koji rade u proizvodnji, laboratorijama ili pakovanju mogu biti izloženi udisanju prašine, hemikalija ili isparavanja;
2. **Dermatološke bolesti** – Kontinuirani rad sad hemikalijama i potencijalno toksičnim supstancama mogu dovesti do oštećenja slojeva kože, iritacija i kontaktnih dermatitisa, što i jeste najčešći oblik profesionalnih kožnih oboljenja;
3. **Problemi sa mišićno-koštanim sistemom** – Dugotrajno sjedenje, stajanje, nepravilno držanje tijela ili ponavljajući pokreti mogu dovesti do poremećaja, kao što je sindrom karpalnog tunela.;
4. **Problemi sa vidom** - Radnici koji provode duže vrijeme radeći sa sitnim komponentama u laboratorijama ili tokom kontrole kvaliteta mogu razviti sindrom suhog oka i naprezanje očiju;
5. **Trovanja** – Akutna i hronična trovanja različitim hemikalijama i lakoisparljivim rastvaračima;
6. **Maligne neoplazme**;
7. **Mentalni stres i psihičko sagorijevanje (engl. burnout);**

Ovisno o dijagnozi odnosno uzroku bolesti i njenoj pripadajućoj šifri prema desetoj reviziji Međunarodne klasifikacije bolesti i srodnih stanja (MKB-10) u Tabeli 1. i 2. priložene su moguće odgovarajuće tačke Liste profesionalnih bolesti (*Pravilnik o listi profesionalnih bolesti*, „Službene novine FBiH“ 45/19) s njihovim punim nazivima i mogućim uzrocima nastanka pojedine bolesti.

Tabela 1. Profesionalne bolesti kože prema Listi profesionalnih bolesti, uz pripadajuće uzroke nastanka i klasifikaciju prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti (MKB-10). Obuhvaćene su dermatoze koje nastaju kao posljedica izloženosti štetnim faktorima u radnom okruženju, a tabela služi kao osnova za identifikaciju rizika i planiranje mjera zaštite u farmaceutskoj djelatnosti.

Tačka liste profesionalnih bolesti (LPB)	Uzrok nastanka	Profesionalna bolest kože	Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih stanja – 10. revizija (MKB-10)
Profesionalne bolesti kože uzrokovane supstancama kojima je naučno dokazano alergijsko ili nadražujuće djelovanje, ovisno o uzroku nastanka profesionalne bolesti.			
6, 7, 19, 25, 50	Hrom, nikal i njihovi spojevi, benzokinoni	Alergijski kontakni dermatitis (AKD)	L23.0
19, 22	Neorganske kiseline, neorganski spojevi azota, alifatski i aciklični ugljikovodici iz nafte i njihovi halogenirani derivati, alkoholi, ketoni, organske kiseline i naftoli	Iritantni kontaktni dermatitis (IKD)	L24.1, L24.2, L24.5, L24.8, L24.9
25, 26	Formaldehidi, fenoli, homolozi i halogeni derivati fenola, alifatski amini	AKD, IKD	L23.5, L24.5, L25.3
6, 7, 19	Ostali fizički i hemijski faktori	Urtikarija (kontaktna) alergijska i fizikalna (vibracijska, kontaktna hladnoća, vrućina, trenje, pritisak, solarna) IKD (mehanička iritacija)	L50.0, L50.2, L50.4, L50.6, L50.9, L56.3, L24
Bolesti uzrokovane jonizirajućim zračenjem.			
29	Jonizirajuće zračenje	Hronični radiodermatitis, malignomi kože	L58.1, L58.9, C44
Bolesti uzrokovane nejonizirajućim zračenjem.			
30	Nejonizirajuće zračenje (UV, infracrveno)	Aktinična keratoza, druge promjene kože uzrokovane dugotrajnom izloženosti nejonizirajućem zračenju, malignomi kože	L57.0, L57.1, L57.2, L57.5, L57.8, L57.9, L59.0, L59.8, L59.9, C44

Zarazne ili parazitske bolesti prenesene na čovjeka sa životinja ili životinjskih ostataka Zarazne ili parazitske bolesti uzrokovane radom u djelatnostima gdje je dokazan povećan rizik zaraze.			
37, 38	Bakterije prenesene sa životinje na čovjeka ili sa čovjeka na čovjeka	Bakterijske infekcije kože	L02.0, L02.1, L02.4, L02.9
Bolesti kože i maligni tumori kože uzrokovani ćađom, katranom, bitumenom, antracenom ili njihovim spojevima, mineralnim ili drugim uljima, karbazolom ili njegovim spojevima i nusproizvodima destilacije ugljena.			
3, 6, 24, 51	Arsen, hrom (VI), halogeni derivati aromatskih ugljikovodika, aromatski amini i derivati ćađa, katran, bitumen, antracen i njegovi spojevi, karbazol i njegovi spojevi, nusproizvodi destilacije ugljena	Malignomi kože	C44, C63.2
22	Alifatski i aciklični ugljikovodici iz nafte, mineralna i druga ulja	Akne	L70.8
25	Benzokinoni	Promjene pigmentacije kože	L81.9

Tabela 2. Profesionalne respiratorne bolesti koje nastaju kao posljedica izloženosti supstancama sa naučno dokazanim alergijskim ili nadražujućim djelovanjem, uz pripadajuće uzroke nastanka i šifre prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti (MKB-10).

Tačka liste profesionalnih bolesti (LPB)	Uzrok nastanka	Profesionalna bolest	Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih stanja – 10. revizija (MKB-10)
Profesionalne bolesti respiratornog trakta uzrokovane supstancama kojima je naučno dokazano alergijsko ili nadražujuće djelovanje, ovisno o uzroku nastanka profesionalne bolesti.			
3, 5	Arsen, mangan	Hronična opstruktivna bolest pluća (HOPB)	J44
3, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 19, 21	Teški metali (arsen, hrom, nikl, kadmij), mangan, selen, aluminij, halogeni derivati (fluor), amonijak	Hronični bronhitis	J41.0, J41.1, J45
6, 7, 9, 14, 17	Teški metali (hrom, nikl, kadmij, aluminij), antimon	Hemijski pneumonitis	J70

25	Formaldehidi, izocijanati	Astma, plućna fibroza	J45.0, J45.1, J45.9, J84.1
J60,	Silicijum dioksid	Pneumokonioza (silikoza, silikotuberkuloza)	J60, J62.8, J65

POSTAVLJANJE DIJAGNOZE

Dijagnosticiranje profesionalnih bolesti predstavlja složen i zahtjevan postupak koji je u nadležnosti specijalista medicine rada. Profesionalne bolesti dokazuju se pomoću prihvaćenih programa obrade (algoritama). Osnova za postavljanje dijagnoze profesionalnih bolesti je:

1. **Anamneza (radna i porodična)** uz detaljno dokazivanje povezanosti između bolesti i profesionalne izloženosti štetnostima na radnom mjestu; ;
2. **Klinička slika** sa prisustvom oštećenja funkcije i/ili morfologije organa ili organskih sistema za koje je poznato da je određena radna štetnost može uzrokovati;
3. **Pozitivni nalazi dijagnostičkih metoda** koje mogu objektivizirati to oštećenje (klinički pregled, laboratorijski testovi, alergološka dijagnostika, mikrobiološka analiza, RTG, CT, spirometrija i druge)

PROCJENA RIZIKA U RADNIM USLOVIMA

Procjena rizika obuhvata nekoliko obaveznih koraka počevši od prepoznavanja opasnosti, zatim utvrđivanje karakteristika izloženosti i potencijalnih oštećenja zdravlja, te određivanja vjerovatnoće nastanka i ozbiljnosti ozljeda i bolesti. Naredni korak uključuje procjenu nivoa rizika, nakon čega slijedi naknadno planiranje odgovarajućih mjera zaštite. Konačni rezultat mora sadržavati konkretne mjere za efikasno sprečavanje oboljenja i povreda na radu. U slučaju respiratornih bolesti, izloženost radnika potencijalno štetnim faktorima moguće je pratiti putem graničnih vrijednosti izloženosti (**GVI**), koje su jasno definisane zakonskim aktima. (*Pravilnik o graničnim vrijednostima emisije zagađujućih materija u zraku*, „Službene novine FBiH“ 12/05).

Granična vrijednost izloženosti na radu predstavlja maksimalnu dopuštenu koncentraciju određenih supstanci u zraku na radnom mjestu, iznad koje postoji povećan rizik od negativnih zdravstvenih posljedica na zdravlje. Kratkotrajna granična vrijednost izloženosti (**KGVI**) odnosi se na maksimalnu koncentraciju štetne supstance u zraku na radnom mjestu kojoj radnik može biti izložen tokom kratkog vremenskog perioda (obično 15 minuta) bez očekivanih zdravstvenih posljedica.

Tabela 3. Granične vrijednosti izloženosti (GVI) za praškaste neorganske supstance u radnom okruženju, u skladu s važećim zakonskim propisima. (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisije zagađujućih materija u zraku, „Službene novine FBiH“ 12/05).

I klasa štetnosti	
Kadmij i njegovi spojevi Hrom i njegovi spojevi Nikl i njegovi spojevi	Pri masenom protoku 1 g/h ili više 0,2 mg/m ³
II klasa štetnosti	
Arsen i njegovi spojevi Selen i njegovi spojevi Olovo i njegovi spojevi	Pri masenom protoku 5 g/h ili više 1,0 mg/m ³
III klasa štetnosti	
Antimon i njegovi spojevi, janidi, Mangan i njegovi spojevi Cink i njegovi spojevi, Silicij dioksid i njegovi spojevi	Ci- Fluoridi, Pri masenom protoku 25 g/h ili više 5,0 mg/m ³

Tabela 4. Granične vrijednosti emisije (GVI) za neorganske supstance u gasovitom agregatnom stanju ili stanju pare u skladu sa važećim zakonskim propisima. (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisije zagađujućih materija u zraku, „Službene novine FBiH“ 12/05).

I klasa štetnosti	
Arsen - hidrid, Fluor Fosfor – hidrid	Pri masenom protoku 10 g/h ili više 1,0 mg/m ³
II klasa štetnosti	
Hlor – dioksid Brom i njegovi spojevi Sumporvodonik	Pri masenom protoku 50 g/h ili više 5,0 mg/m ³
III klasa štetnosti	
Hidrogen hlorid Fluor i njegovi spojevi	Pri masenom protoku 300 g/h ili više 30 mg/m ³
IV klasa štetnosti	
Oksidi sumpora Oksidi nitroгена Amonijak	Pri masenom protoku 5 g/h ili više 500 mg/m ³

Benzen također spada u I klasu štetnosti zbog dokazanog kancerogenog djelovanja i njegova granična vrijednost pri masenom protoku od 0,5 g/h ili više iznosi 0,1 mg/m³.

Za razliku od respiratornih bolesti, u kojima se precizno mogu odrediti standardi izloženosti (GVI i KGVI), ne postoji objektivna metoda mjerenja intenziteta izloženosti kože štetnim agensima. Zbog toga je izuzetno važno poznavati sve faktore rizika koji mogu dovesti do razvoja kožnih bolesti, poznavati karakteristike radnog mjesta i svojstva hemikalija sa kojima se dolazi u kontakt, te poduzeti sve preventivne mjere kako bi se spriječila pojava oboljenja. Za kvalitetnu procjenu rizika od nastanka profesionalnih kožnih bolesti, osim informacija o tome da li su određena sredstva rada ili hemikalije opasni ili štetni za kožu, neophodno je utvrditi način i mjesto kontakta kože sa štetnom hemikalijom ili opasnom površinom kao i procijeniti vrijeme trajanja i učestalost ponavljanja tog kontakta.

PREVENTIVNE MJERE

U cilju zaštite zdravlja radnika i prevencije profesionalnih bolesti, neophodno je provoditi sveobuhvatan sistem mjera koji obuhvata više ključnih koraka. Prvi i osnovni korak jeste identifikacija i procjena rizika, kojom se prepoznaju potencijalno štetni faktori na radnom mjestu i procjenjuje stepen njihove opasnosti po zdravlje zaposlenih. Nakon toga, potrebno je provesti kontrolu izloženosti, nastojeći potpuno eliminisati izloženost štetnim agensima, a u slučajevima gdje to nije izvodljivo, poduzeti potrebne mjere za njeno smanjenje na prihvatljiv nivo. Naredi korak jeste osigurati odgovarajuću ličnu zaštitnu opremu, prilagođenu vrsti i stepenu izloženosti. To podrazumijeva upotrebu zaštitnih maski ili respiratora, naočala, vizira, specijalizovane radne odjeće i rukavica, pri čemu je od ključne važnosti da oprema bude pažljivo odabrana, redovno održavana i pravilno korištena. Redovni sistematski zdravstveni pregledi omogućavaju pravovremeno otkrivanje potencijalnih zdravstvenih problema, čime se povećavaju šanse za efikasnu intervenciju. Profesionalna obuka i usavršavanje radnika imaju centralnu ulogu u izgradnji svijesti o profesionalnim rizicima, pravilnom korištenju zaštitne opreme i postupanju u slučaju izloženosti ili nesreće. Pravilna organizacija radnog vremena, uključujući pravovremene pauze, rotaciju zadataka i po potrebi skraćivanje radnih smjena, može znatno doprinijeti smanjenju psihofizičkog opterećenja i povećane produktivno. Na kraju, kontinuirano unapređivanje radnih uslova kroz tehnička, organizaciona i edukativna poboljšanja, predstavlja osnovu za održavanje visokog nivoa sigurnosti i zaštite zdravlja na radu. Implementacija ovih mjera ne samo da doprinosi smanjenju incidencije profesionalnih bolesti, već i unapređuje radnu efikasnost i kvalitet radnog okruženja.

SAVREMENA ISTRAŽIVANJA

Kao najpoznatija profesionalna bolest¹ u 21. stoljeću, COVID – 19 ostavio je mnoge posljedice kako po zdravlje čitave populacije, tako i po zdravlje zdravstvenih radnika uključujući i farmaceute. Pored prepoznatljivih fizičkih tegoba koji su podrazumijevali određene kliničke simptome, došlo je do značajnog povećanja mentalnog sagorijevanja jer su farmaceuti bili “front-linijski” zdravstveni radnici sa značajnom ulogom u rješavanju globalne zdravstvene krize i prevazilaženju instinktivnog straha od same zaraze i njenih posljedica. U toku pandemije došlo je do povećanja

1 Evropska komisija je 2022. godine predložila da se Covid – 19 uključi u Prilog I Evropske liste profesionalnih bolesti kao „Covid-19 izazvan radom u prevenciji bolesti, u zdravstvenoj ili socijalnoj zaštiti i u kućnoj pomoći, ili u kontekstu pandemije, u sektorima gdje je dokazano postojanje rizika od infekcije u određenim aktivnostima.“ (engl. COVID-19 caused by work in disease prevention, in health and social care and in domiciliary assistance, or, in a pandemic context, in sectors where there is an outbreak in activities in which a risk of infection has been proven”)

radnih sati, smanjenog broja neradnih dana u toku jednog mjeseca i konstantnoj izloženosti strahu, nervozu i stresu. Brojna istraživanja koja su sprovedena u mnogim zemljama od početka pandemije pa sve danas, koristeći Copenhagen Burnout Inventory (CBI) dokazala su znatno povećanje mentalnog sagorijevanja kod farmaceuta koje je direktno povezano sa pandemijom COVID – 19. Nivoi sagorijevanja kod farmaceuta posebno su izraženi u relaciji klijent/korisnik, a prosječne vrijednosti različitih podskala sagorijevanja su veće kod farmaceutskih tehničara u odnosu na farmaceute.

ZAKLJUČAK

Profesionalne bolesti u farmaciji predstavljaju ozbiljan zdravstveni rizik za radnike, s obzirom za zahtjevne i specifične uslove rada u ovoj djelatnosti. Izloženost hemijskim supstancama, prašini, toksinima i drugim štetnim faktorima može dovesti do nastanka ozbiljnih zdravstvenih problema pogađajući različite organske sisteme. Stoga je jako važno prepoznati rizike i implementirati adekvatne mjere zaštite kako bi se smanjio njihov uticaj na radnika. Investiranje u prevenciju i kontinuirano poboljšanje radnih uslova štiti zdravlje radnika, a ujedno i doprinosi kvaliteti i opštoj dobrobiti farmaceutske struke.

LITERATURA

1. Arandjelović M., Jovanović J., (2009), Medicina rada, Medicinski fakultet Univerzitet u Nišu. Dostupno na : [Microsoft Word - KK.doc](#)
2. Benavidades F., Ramada J. M., Delclós J., Serra C., (2023). COVID-19: it's time for its full recognition as an occupational disease, *Arch Prev Riesgos Labor*. 14;26(3):179-186. DOI: [10.12961/apr1.2023.26.03.01](#)
3. Bogadi – Šare A., Bubaš M., Kerner I., Macan J., Pejnović N., Skroza D., Turk R., (2014), Pristup profesionalnim bolestima kože u medicini rada, Zagreb.
4. Carlsten C., Gulati M., Hines S., Rose C., Scott K., Tarlo S., Torén K., Sood A., De la Hoz R., (2021). *COVID – 19 as an occupational disease*, *Am J Ind Med*, Apr;64(4):227-237. DOI: [10.1002/ajim.23222](#)
5. Coelho E., Amaral A. P., Rocha C., Cruz R., Brito-Costa S., (2022). *Burnout in Pharmacy professionals during Covid-19 outbreak*, *Acta Biomed*, 16;93(6):e2022281. DOI: [10.23750/abm.v93i6.13386](#)
6. European Union. (2022). Recommendation 2022/2337 of the European Commission of 14 December 2022 on the inclusion of COVID-19 in the European List of Occupational Diseases. *Official Journal of the European Union*, L 324, pp. 47-49. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reco/2022/2337/oj/eng>
7. Federalno ministarstvo okoliša i turizma. (2005). *Pravilnik o graničnim vrijednostima emisije zagađujućih materija u zraku*, Službene novine Federacije BiH, broj 12/05.
8. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. (2016). *Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema – deseta revizija*, svezak 1. – drugo izdanje. Hrvatski zavod za javno zdravstvo.
9. Kowalski, M., & Thomas, E. (2018). *Prevention of Occupational Health Problems in Pharmacy Practice*. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 31(2), 223-235.

10. Ministarstvo zdravstva Federacije Bosne i Hercegovine. (2019.) *Pravilnik o listi profesionalnih bolesti*, „Službene novine FBiH“ 45/19. Dostupno na: <https://www.pfsa.unsa.ba/pf/wp-content/uploads/2020/04/Pravilnik-o-listi-profesionalnih-bolesti-2.pdf>
11. Teufer, B., Ebenberger, A., Affengruber, L., Kien, C., Klerings, I., Szelag, M., Grillich, L., & Griebler, U. (2019). *Evidence-based occupational health and safety interventions: a comprehensive overview of reviews*. BMJ Open, 9(12), e032528. DOI: [10.1136/bmjopen-2019-032528](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-032528)
12. World Health Organization. (2016). Sixty-ninth World Health Assembly. Resolution WHA.69.19: Global strategy on human resources for health: workforce 2030. Available at: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69/A69_R19-en.pdf?ua=1&ua=1
13. Word Health Organization (2017). *Occupational health and safety in the pharmacy practice*. Svjetska zdravstvena organizacija. Dostupno na: <https://www.who.int/health-topics/occupational-health>

ULOGA FARMACEUTA U TRETMANU ATOPIJSKOG DERMATITISA

**Amna Hasić, Alisa Karić, Amina Husejbašić, Inela Avdić, Selma Sejmenović,
Ermina Cilović Kozarević, Merima Ibišević***

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

Stručni rad

SAŽETAK

Atopijski dermatitis (AD) predstavlja hroničnu upalnu bolest kože koja značajno utiče na kvalitetu života pacijenata. Uz pravilan pristup liječenju, moguće je kontrolirati simptome i spriječiti pogoršanja, a farmaceuti igraju ključnu ulogu u ovom procesu. Kroz savjetovanje pacijenata o pravilnoj upotrebi lijekova, edukaciji o njezi kože, prepoznavanju okidača bolesti, te savjete o odgovarajućoj prehrani i životnim navikama, farmaceuti mogu značajno doprinijeti poboljšanju stanja kože. Osim toga, prate napredak pacijenata kroz kontinuiranu evaluaciju terapije i prilagodbu liječenja prema individualnim potrebama, čime se smanjuje broj hospitalizacija i potreba za hitnim medicinskim intervencijama. Farmaceuti imaju važnu ulogu u pružanju emocionalne i psihološke podrške pacijentima, jer kroz empatiju i aktivno slušanje mogu pomoći pacijentima da se nose sa stresom i izazovima atopijskog dermatitisa.

Ključne riječi: atopijski dermatitis, edukacija, terapija, njega kože, prevencija

Autor za korespondenciju: dr sc. Merima Ibišević, docent
E-mail: merima.ibisevic@untz.ba

ROLE OF PHARMACISTS IN THE TREATMENT OF ATOPIC DERMATITIS

**Amna Hasić, Alisa Karić, Amina Husejbašić, Inela Avdić, Selma Sejmenović, Ermina Cilović
Kozarević, Merima Ibišević***

**Faculty of Pharmacy, University of Tuzla,, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina*

Professional paper

SUMMARY

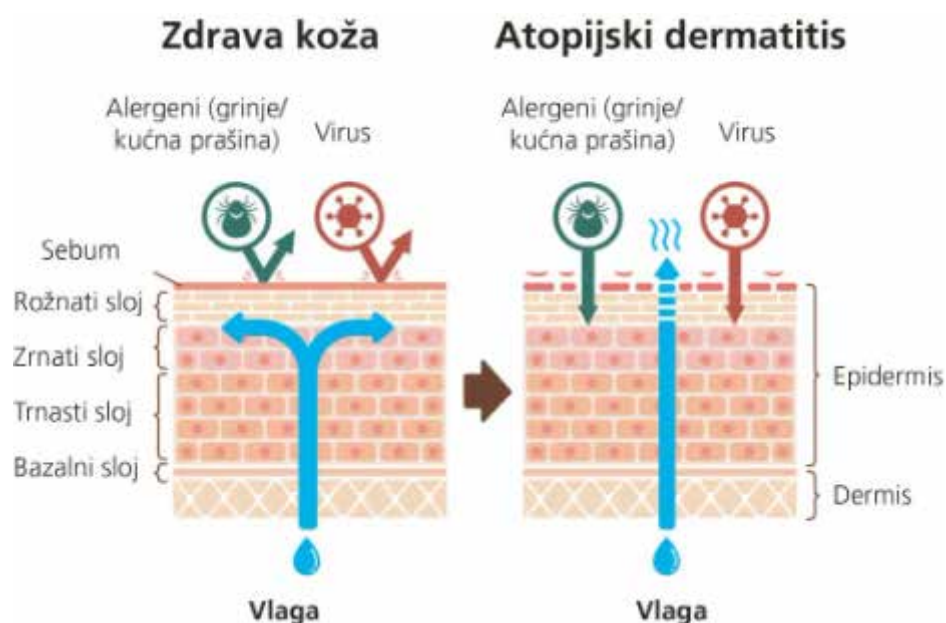
Atopic Dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease that significantly impacts the quality of life of patients. With the proper approach to treatment, it is possible to control symptoms and prevent flare-ups, and pharmacists play a key role in this process. Through advising patients on the correct use of medications, educating them about skin care, identifying disease triggers, and providing advice on proper nutrition and lifestyle habits, pharmacists can significantly contribute to improving the condition of the skin. Additionally, they monitor patients' progress through continuous evaluation of therapy and adjustment of treatment according to individual needs, thereby reducing hospitalizations and the need for urgent medical interventions. Pharmacists also play an important role in providing emotional and psychological support to patients, as through empathy and active listening, they can help patients cope with the stress and challenges of atopic dermatitis.

Keywords: *atopic dermatitis, education, therapy, skin care, prevention*

Corresponding author: Merima Ibišević, PhD, Assistant Prof.
E-mail: merima.ibisevic@untz.ba

UVOD

Atopijski dermatitis ili atopijski ekcem (AD) je hronično upalno stanje kože. Radi se o hroničnoj upalnoj nezaraznoj kožnoj bolesti, često udruženoj s drugim atopijskim bolestima, poput bronhijalne astme i alergijskog rinitisa/rinokonjunktivitisa. Uključuje kompleksne interakcije između imunoloških, nasljednih i okolišnih faktora (Vaughn, 2019). Glavni simptomi koji se javljaju su suhoća i crvenilo kože, svrbež i ekcemi. Atopijski dermatitis je bolest s visokom prevalencijom (2- 5% u populaciji), a najčešće se pojavljuje u djece (10-20%). Učestalost AD u svijetu je različita i u stalnom je porastu. Smatra se da se pojava atopijskog dermatitisa povećala 2 do 3 puta samom industrijalizacijom. Kod dojenčadi, ekcem se obično javlja u obliku sitnih prištića na obrazima, dok se kod starije djece i odraslih često javlja osip na pregibima koljena ili laktova, na poledini ruku ili na vlasištu (Eichenfield, 2014).



Slika 1. Razlike između zdrave i atopične kože

Atopijski dermatitis može se manifestovati i kao alergija na određenu hranu, kao astma i alergijski rinitis te se sve to zajedno naziva atopijski marš. U većini slučajeva, postoje periodi kada je bolest pogoršana, nazvani egzacerbacijski periodi ili plamteći periodi, iza kojih slijede periodi kada se koža popravlja ili potpuno čisti, a to su remisijski periodi. Kod osoba koje nikad nisu patile od ove bolesti u djetinjstvu, ona se može razviti u odrasloj dobi. Razlikujemo „intrinzični“ tip AD (nealergijski oblik) bez udruženosti s ostalim atopijskim bolestima i alergijski („ekstrinzični“ tip) atopijski ekcem/dermatitis sindrom (AEDS) udružen s IgE na osnovu genskih faktora i/ili faktora okoliša (Lipozenčić, 2011).

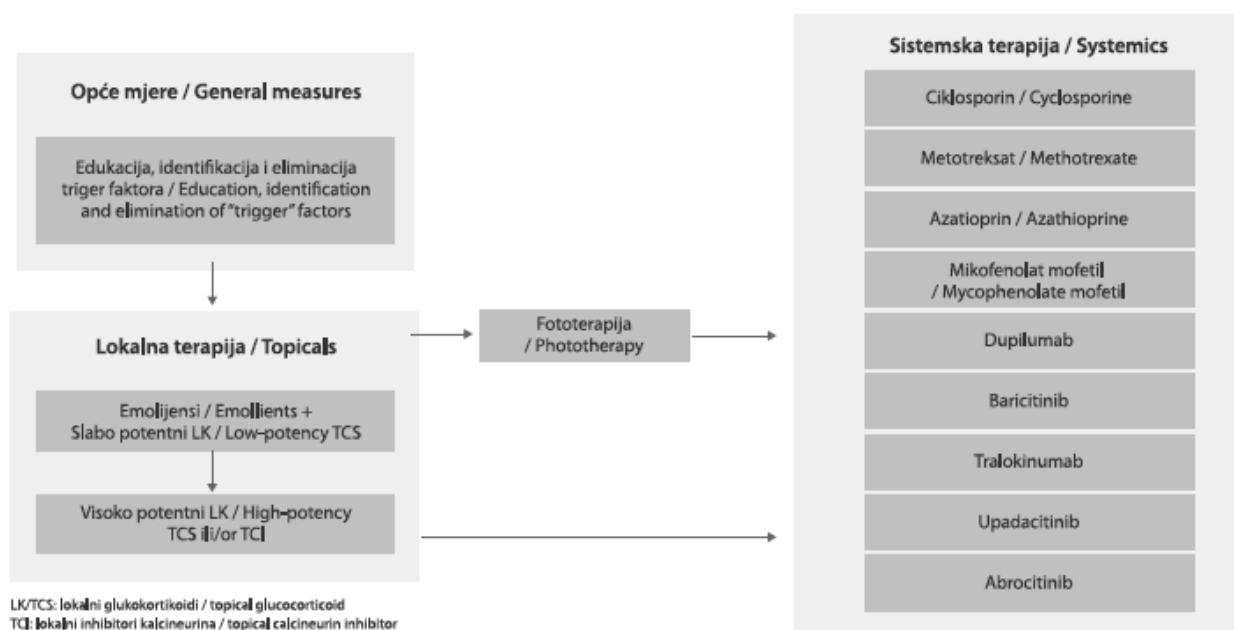
ULOGA FARMACEUTA U TRETMANU ATOPIJSKOG DERMATITISA

Farmaceuti kao zdravstveni stručnjaci mogu da pruže osnovne informacije o prirodi bolesti i važnosti redovnog tretmana. Edukacija pacijenata o atopijskom dermatitisu obuhvata informacije o uzrocima, simptomima, rizicima od infekcija i mogućim komplikacijama, kao i značaju primjene tretmana u

skladu sa preporukama. Farmaceuti mogu pomoći pacijentima i da prepoznaju okidače za pogoršanje simptoma, kao što su stres, alergeni, zagađenje i drugi faktori.

Prema studiji objavljenoj u American Journal of Clinical Dermatology (2016), edukacija pacijenata o atopijskom dermatitisu može poboljšati adherenciju na terapiju i smanjiti učestalost akutnih pogoršanja (Wollenberg, 2016).

TRETMAN ATOPIJSKOG DERMATITISA



Slika 2. Shema liječenja atopijskog dermatitisa (Ljubojević Hadžadvić, 2022)

Emolijensi

Primjena emolijenasa je osnova svakodnevnog tretmana atopijskog dermatitisa i preporučuje se kod svih pacijenata, bez obzira na stepen ozbiljnosti bolesti. Hidratacija kože pomaže u obnavljanju kožne barijere, smanjuje suhoću i svrab, te smanjuje potrebu za lokalnim lijekovima, kao što su kortikosteroidi. Preporučuje se upotreba emolijenasa dva puta dnevno, posebno nakon kupanja, kako bi se maksimalno povećao efekat hidratacije (Zaenglein, 2020).

Najčešći aktivni sastojci u emolijensima uključuju:

- Glicerol – veže vodu iz dubljih slojeva kože i okoline, zadržava vlagu u epidermisu (humektans).
- Urea (karbamid) – hidrira i omekšava kožu, dok u višim koncentracijama (npr. 10%) ima i blago keratolitičko djelovanje.
- Ceramidi – obnavljaju lipidni sloj kože, jačaju kožnu barijeru i sprečavaju transepidermalni gubitak vode.
- Shea maslac, lanolin, skvalan – prirodni emolijensi koji omekšavaju kožu i poboljšavaju njezinu elastičnost.

Ovi sastojci djeluju sinergistički – zadržavaju vlagu, popravljaju barijeru, te fizički sprječavaju gubitak vode – što ih čini ključnim za kontrolu simptoma atopijskog dermatitisa.

Topikalni kortikosteroidi

Kortikosteroidni lijekovi su standardna terapija za ublažavanje akutnih simptoma atopijskog dermatitisa, uključujući crvenilo i inflamaciju. Za blage oblike bolesti preporučuju se kortikosteroidi niske potencije (poput hidrokortizona), dok za teže oblike treba koristiti kortikosteroide srednje ili visoke potencije (poput betametazona). Terapija kortikosteroidima treba biti ograničena na period kada su simptomi aktivni, kako bi se izbjegli neželjeni efekti, poput kožne atrofije (Wollenberg, 2016).

Topikalni imunomodulatori (takrolimus i pimekrolimus)

Za pacijente sa osjetljivijom kožom ili za one koji ne podnose kortikosteroide, topikalni imunomodulatori predstavljaju alternativu. Ovi lijekovi (takrolimus, pimekrolimus) inhibiraju imunološke reakcije koje izazivaju upalu na koži. Preporučuju se u liječenju blagih do umjerenih oblika atopijskog dermatitisa, a mogu se koristiti i za održavanje stanja kože u fazama remisije (Eichenfield, 2017).

Sistemska terapija (oralni lijekovi i biološki tretmani)

Za teže oblike atopijskog dermatitisa, koji nisu podložni lokalnoj terapiji, mogu se koristiti oralni lijekovi, kao što su oralni kortikosteroidi ili sistemski imunomodulatori (poput ciklosporina ili metotreksata). Posljednjih godina, biološki lijekovi kao što su dupilumab, koji inhibira IL-4 i IL-13, pokazali su visoku efikasnost u tretmanu teških oblika atopijskog dermatitisa (Agarwal, 2020).

Tabela 1. Europske smjernice (EuroGuiDerm 2025) za liječenje atopijskog dermatitisa

Klinička slika	Vrsta terapije	Terapijski pristup	Napomene
Blagi AD	Nefarmakološke mjere	Emolijensi, izbjegavanje iritansa, edukacija pacijenta	Osnova liječenja u svim fazama
	Topikalni kortikosteroidi (TCS)	Slabi do umjereni TCS (npr. hidrokortizon 1%) prema potrebi	1 × dnevno, do smirivanja upale
	Topikalni inhibitori kalcineurina (TCI)	Takrolimus/pimekrolimus za osjetljiva područja (lice, vrat)	Alternativa TCS, osobito kod djece
	Proaktivna terapija	TCS ili TCI 2 × tjedno na hroničnim lezijama	Prevenција recidiva
Umjereni AD	TCS srednje jačine + emolijensi	Redovita primjena TCS (npr. mometazon) uz hidrataciju	Učestalije epizode, šira zahvaćenost
	TCI	Sustavno kod potrebe za dugoročnim liječenjem	Smanjuje potrebu za TCS
	Fototerapija	UVB 311 nm, UVA1 ili PUVA	Kod lošeg odgovora na lokalnu terapiju
Teški AD	Sistemski imunosupresivi	Ciklosporin (1. izbor), metotreksat, azatioprin, MMF	Do 2 godine uz redovito praćenje

Klinička slika	Vrsta terapije	Terapijski pristup	Napomene
	Biološka terapija	Dupilumab (IL-4/13R), lebrikizumab (IL-13), nemolizumab (IL-31R)	Prva linija kod teških oblika
	JAK-inhibitori	Abrocitinib, upadacitinib, baricitinib	Brzi učinak, posebno kod pruritusa
	Kombinovana terapija	Biologik + topikalni TCS/TCI	Prilagodba ovisno o težini i odgovoru

Uvidom u Registar lijekova i medicinskih sredstva Bosne i Hercegovine iz 2025. godine utvrđeno je da dupilumab, abrocitinib i lebrikizumab još uvijek nemaju potvrdu o registraciji u našoj državi, ali su registrovani na području Europske unije.

Upravljanje komplikacijama i prevencija infekcija

Pacijenti sa atopijskim dermatitisom su podložniji sekundarnim infekcijama, posebno uzrokovanim bakterijom *Staphylococcus aureus*. Prevencija ovih infekcija uključuje održavanje higijene, primjenu antiseptičkih tretmana, i izbjegavanje grebanja kožnih lezija koje mogu izazvati oštećenje kože i omogućiti ulazak patogena. U slučaju infekcija, često je potrebna primjena topikalnih ili oralnih antibiotika kako bi se zaustavio razvoj infekcije (Ng, 2017).

Edukacija pacijenata i izbjegavanje okidača

Edukacija pacijenata o atopijskom dermatitisu i pravilnoj njezi kože ključna je za dugoročni uspjeh liječenja. Pacijenti trebaju biti edukovani o pravilnoj primjeni terapije, upotrebi hidratantnih krema i prepoznavanju okidača koji mogu pogoršati simptome, kao što su stres, alergeni, zagađenje ili određeni prehrambeni faktori (Lee, 2019). Također, pacijentima se preporučuje izbjegavanje iritanasa kože, poput jakih deterdženata, sintetičkih materijala, ekstremnih temperatura.

Psihosocijalni aspekti liječenja

Atopijski dermatitis može imati značajan uticaj na mentalno zdravlje pacijenata, izazivajući stres, anksioznost i depresiju, naročito kada je bolest vidljiva i uzrokuje socijalnu stigmatizaciju. U takvim slučajevima, važno je pružiti emocionalnu podršku pacijentima, kao i obezbjediti im pristup psihološkim resursima ili savjetovanju (Jemec, 2017).

Preporuke za specifične terapije

- **Kratkoročna terapija:** Za blage oblike atopijskog dermatitisa, terapija može biti ograničena na upotrebu topikalnih kortikosteroida i emolijenasa.
- **Dugoročna terapija:** Kod pacijenata sa umjerenim do teškim oblicima bolesti, preporučuje se kombinacija topikalnih imunomodulatora i emolijenasa, uz moguću upotrebu sistemskih lijekova u slučaju komplikacija.
- **Zdravstvena njega i edukacija:** Stalno praćenje stanja kože, edukacija o pravilnoj primjeni terapije i kontrola uzroka pogoršanja simptoma su ključni za kontrolu bolesti.

Alternativna medicina

Zbog narušene kožne barijere i suhe kože, topikalna primjena ulja se preporučuje kao dodatna terapija konvencionalnoj terapiji ili kao terapija održavanja u remisiji obzirom da dovodi do poboljšanja barijerne funkcije kože te ima određena protuupalna svojstva. Najčešće korištena ulja su kokosovo ulje (*Cocos nucifera*), ulje noćurka (*Oenothera biennis*) te boražine (*Borago officinalis*).

Hypericum perforatum sadrži aktivne komponente hiperforin, hipericin i flavonoide (amentoflavon, hiperozid). Lokalno primijenjen hiperforin dovodi do smanjene proliferacije T-limfocita u epidermisu. Kliničke studije su pokazale kako 1,5%-tna krema s hiperforinom reducira broj bakterija *S.aureus* na koži oboljelih od atopijskog dermatitisa (Schempp, 2003).

Farmakološke studije su pokazale kako je mast s ekstraktom cvijeta kamilice učinkovitija od 0,1%-tnog hidrokortizona u smanjenju upale, eritema, svrbeža i deskvamacije za što su najzaslužniji α -bisabolol i apigenin koji inhibicijom lipooksigenaze i ciklooksigenaze inhibiraju nastanak upalnih medijatora prostaglandina i leukotriena. Osim navedenog učinka, α -bisabolol pokazuje i baktericidni i fungicidni učinak prema *S.aureus* i *C.albicans*, što je dodatna prednost u liječenju atopijskog dermatitisa (Dawid-Pać, 2013).

Higijena i njega kože

Kod osoba s atopijskim dermatitisom bitna je adekvatna i primjerena higijena kože. Preporučuje se upotreba sredstava koja su hipoalergena i bez mirisa, blagog kiselog pH (pH 4- 6) koja bi što manje dodatno iritirala kožu. Poslije kupanja i tuširanja bitno je nanijeti sredstvo za njegu kože s dodatkom ulja u što kraćem vremenskom periodu, po mogućnosti dok je koža još vlažna. Poremećaj kožne barijere obilježen manjkom intracelularnih lipida, neadekvatnom zastupljenosti holesterola, esencijalnih masnih kiselina i ceramida povećava transdermalni gubitak vode i isušuje kožu oboljelih od atopijskog dermatitisa. Kroz tako oštećenu kožu olakšan je prolazak alergena i razvoj senzibilizacije. Stoga je bitan cilj terapije obnoviti funkciju epidermalne barijere intenzivnom hidratacijom epidermisa.

Preporučena ishrana kod atopijskog dermatitisa

Ishrana kod atopijskog dermatitisa treba da bude balansirana i bogata hranljivim sastojcima koji podržavaju zdravlje kože i smanjuju inflamaciju. S obzirom na to da se atopijski dermatitis često povezuje sa alergijama i povećanom reaktivnošću imunološkog sistema, izuzetno je važno pratiti potencijalne okidače hrane i izbjegavati ih, ako postoji osjetljivost.

Omega-3 masne kiseline imaju protuupalno dejstvo, te pomažu u održavanju integriteta kožne barijere smanjujući upalu i rizik od pogoršanja simptoma. Omega-3 masne kiseline se nalaze u masnoj ribi (losos, skuša, sardine), orašastim plodovima (orasi) i sjemenkama (lan, čia). Istraživanje iz 2018. godine pokazalo je da suplementacija omega-3 masnim kiselinama dovodi do smanjenja svraba i poboljšanja kvaliteta života kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom (Daris, 2018). Preporučuje se dnevni unos od 1-2 grama omega-3 masnih kiselina.

Vitamin D igra ključnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora i održavanju zdravlja kože. Nedostatak vitamina D može povećati rizik od razvoja atopijskog dermatitisa i pogoršanja simptoma. Preporučuje

se unos vitamina D putem izlaganja suncu ili konzumiranjem hrane bogate ovim vitaminom, kao što su masna riba, jaja i obogaćeni mliječni proizvodi. Također, suplementacija vitaminom D može biti korisna, posebno kod osoba sa nedostatkom ovog vitamina (Mahlknecht, 2019).

Probiotici mogu doprinijeti ravnoteži crijevne flore i smanjiti upalu, što može pozitivno uticati i na simptome atopijskog dermatitisa. Istraživanja sugerišu da suplementacija probioticima može smanjiti učestalost recidiva i ozbiljnost simptoma kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom (Taipale, 2017). Probiotici se mogu naći u fermentisanim namirnicama kao što su jogurt, kefir, kiseli kupus, ili kao suplementi.

Antioksidansi, kao što su vitamini A, C i E igraju važnu ulogu u zaštiti kože od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima. Oni pomažu u smanjenju oksidativnog stresa koji može pogoršati simptome atopijskog dermatitisa. Namirnice bogate antioksidansima, poput bobičastog voća, citrusa, zelenog povrća i orašastih plodova, trebaju biti uključene u svakodnevnu ishranu.

Namirnice koje treba izbjegavati

Kod nekih osoba sa atopijskim dermatitisom, mliječni proizvodi mogu izazvati alergijske reakcije koje pogoršavaju simptome. Iako nije kod svih pacijenata, isključivanje mlijeka i mliječnih proizvoda iz ishrane može pomoći u smanjenju upale i svraba (Osborn, 2020).

Jaja su potencijalni alergen koji može izazvati pogoršanje simptoma kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom, naročito kod onih koji su alergični na proteine jaja (Beyer, 2018).

Iako nije dokazano da gluten direktno uzrokuje atopijski dermatitis, neki pacijenti sa AD-om mogu primjetiti poboljšanje simptoma nakon eliminacije glutena iz ishrane.

ZAKLJUČAK

Farmaceuti kao zdravstveni stručnjaci igraju ključnu ulogu u tretmanu atopijskog dermatitisa, kako u pogledu farmakoterapije, tako i u edukaciji pacijenata i prevenciji komplikacija. Pravilna edukacija o terapiji, redovno praćenje stanja pacijenta, kao i saradnja sa drugim zdravstvenim radnicima, mogu značajno poboljšati kvalitet života pacijenata sa atopijskim dermatitisom.

REFERENCE

1. Agarwal S i sar. (2020). Biologic therapy for atopic dermatitis: An overview of recent developments. *Dermatology Clinics*, 38(3): 381-394.
2. Beyer K i sar. (2018). Food allergy in atopic dermatitis: Impact of food exclusion. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(2): 436-445.
3. Daris M (2018). Omega-3 fatty acids and their role in atopic dermatitis. *Clinical Dermatology*, 36(2): 162-168.
4. Eichenfield LF, Tom WL, Berger TG, Krol A, Paller AS, Schwarzenberger K, Bergman JN, Chamlin S et al (2014). Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 2.

- Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol*, 71(1):116-32.
5. Eichenfield LF i sar. (2017). Atopic dermatitis: Pathogenesis and management. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(5):1376-1388.
 6. Jemec GBE i sar. (2017). Psychosocial aspects of atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, 97(4): 450-454.
 7. Lee DM i sar. (2019). Role of moisturizers in the management of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 81(6): 1485-1493.
 8. Lipozenčić J, Ljubojević S, Gregurić S (2011). Atopijski dermatitis u djece i odraslih, *Acta Med Croatica*, 65(2): 87 – 96.
 9. Ljubojević Hadžavdić S i sar. (2022). Smjernice za liječenje atopijskog dermatitisa, *Liječ Vjesn*, 144 :279–294.
 10. Mahlknecht P (2019). The role of vitamin D in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11): 1910.
 11. Ng D i sar. (2017). Prevention and management of secondary infections in atopic dermatitis. *Dermatitis*, 28(6): 346-354.
 12. Osborn LA i sar. (2020). Dietary interventions in atopic dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 58(3): 377-388.
 13. Schempp CM, Hezel S, Simon JC. Behandlung der subakuten atopischen Dermatitis mit Johanniskraut-Creme (2003). Eine randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie im Halbseitendesign. *Hautarzt*, 54(3):248-53.
 14. Taipale V (2017). Probiotics and prebiotics in the management of atopic dermatitis. *Current Dermatology Reports*, 6(2): 94-102.
 15. Vaughn AR, Foolad N, Maarouf M, Tran KA, Shi VY (2019). Micronutrients in Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *J Altern Complement Med*, 25(6):567-577.
 16. Wollenberg A i sar. (2016). Patient education and the management of atopic dermatitis: A review of current approaches. *American Journal of Clinical Dermatology*, 17(3): 163-174.
 17. Wollenberg A. i sar. (2025). EuroGuiDerm living guideline on atopic eczema – systemic treatment update. *JEADV*.
 18. Zaenglein AL i sar. (2020). Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: 2019 update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 81(3): 713-738.

Generalni pokrovitelj



Sponzori



ABDIIBRAHIM



zENTIVA

ATC
ANTONIOTRADECOSMETICS
LUXURY HEALTH & BEAUTY



vitamed™



TUZLA FARM

ALKALOID
Brinemo o zdravlju

HERCEGOVINALIJEK
S punim povjerenjem

ZADA
PHARMACEUTICALS



PRO.MED.CS
Praha a.s.



Royal Pharma

eliksir
PHYTOPHARM

HIF Hemofarm
STADA GRUPA



Co plus
R&B MEDICAL

SANDOZ

amsal



SALVUS

PharmaS



THE HOLISTIC CHOICE



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