UDC 615
661.12

ISSN 1409 - 8695

Македонски Фармацевтски билтен

Macedonian Pharmaceutical Bulletin

СПИСАНИЕ НА МАКЕДОНСКОТО ФАРМАЦЕВТСКО ДРУШТВО • JOURNAL OF THE MACEDONIAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION

Макед. фарм. билт., **52,** (1,2) с. 1-88, 2006 Скопје
Maced. Pharm. Bull., **52,** (1,2) pp. 1-88, 2006 Skopje

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 3-8 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 616.152-074:543.423.3

Original scientific paper

Optimization of method for simultaneous multi-element determination of trace elements by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry: Chemometric approach

Rumenka Petkovska*, Aneta Dimitrovska

Faculty of Pharmacy, University "Ss.Cyril and Methodius", Vodnjanska 17, Skopje, R.Macedonia

Received September 2005, accepted December 2005

Abstract

Two objective functions for multi-element optimization in ICP-OES were used and compared using signal-to-background ratios as a figure of merit. Three dimensional response surfaces were generated for a number of elements (Fe, Zn, Cu, Se, Mn, Cr, Ni and Co) to evaluate the performance of both objective functions in locating the optimum compromise instrumental operating conditions in multi-element determinations. IEC technique was used for correction of spectral interferences. Validation of the applied method was carried out by determination of linearity (1 to 100 μg/l), accuracy, precision, detection and quantification limit for each element. Detection limit was calculated using SBR-RSD approach. Both objective functions gave the same set of instrumental operating conditions for simultaneous multi-element determination as the best compromise.

Key words: ICP-OES; multi-element determination; objective functions; interelement correction

Introduction

Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) is a powerful technique for multi-element analysis. ICP-OES is applicable to around 73 elements and provides fast multi-element analysis with superior detection limits to atomic absorption spectrometry (AAS) for many elements. The versatility of ICP-OES makes it a good analytical technique for a wide variety of applications. This versatility is due not only to the large number of elements that can be determined rapidly at trace levels but also to the wide variety of sample types that can be analyzed using the ICP-OES technique (1-4).

Optimization of instrumental operating conditions in simultaneous multi-element ICP-OES methods may improve analytical accuracy, precision and limit of detection. The instrumental operating conditions of an ICP that may be optimized are Rf power, nebulization gas flow rate and observation region in the plasma. Using the conventional lateral viewing mode of the ICP, the net signal, sensitivity (S) and signal-to-background ratio (SBR) are highly dependent on these parameters. It has already been demonstrated that Rf power, nebulization gas flow rate and the viewing height play a major role in both the energy transferred from the plasma to the analyte species and the residence time of the species in the plasma (2, 3). For most of the lines alteration of instrumental operating conditions lead not only to variable gross line signals but also to variable background values. Because the net signal and the background are not modified in a similar way, the SBR optimization does not correspond to that of S. The SBR is a good figure of merit since it can be correlated to detection limits (5-7).

Optimization of simultaneous multi element analysis requires a single value representing each set of operating conditions corresponding to the best results for each element. Since the parameters are often linked together, an unvaried search, which is the most common way, will sometimes fail to determine an optimum set of conditions. One of the most commonly used strategies for optimization of the plasma parameters is the simplex method. Numerous

e-mail: rupe@ff.ukim.edu.mk
tel. (+) 389 2 3126 032, fax: (+) 389 2 3123 054

objective functions have been proposed for the simplex optimization procedures. We tested two approaches for satisfying the criteria required for obtaining optimum compromise conditions: (1) the maximization of the signal-background ratio; (2) the minimization of the relative standard deviation of the background; (3) the maximization of the ratio of atomic or ionic lines; (4) obtaining the maximum compromise SBRs for all the elements and (5) emphasizing the maximization of SBR of the elements close to their detection limits (2, 8-10). The first approach was Leary's objective function based on SBRs, which is represented by the sum of the reciprocals of the SBRs of elements studied, as follows:

$$F = n / \sum_{i=1}^{n} (SBR)_i^{-1} \qquad (1)$$

where *n* is the number of the elements studied for the optimization and SBR*i* are the SBRs of each of the i^{th} elements. This equitation generates a value, for each set of instrumental operating conditions using the SBR of all elements. The second tested approach was an objective function called Combinated Ratio Method (CRM), and it is given by:

$$F = \sum_{i=1} (SBR)_i / \sum_{j=1}^{k} R_j \qquad (2)$$

where *n* is the number of studied elements, *k* is (n-1)+(n-2)+….+1, SBR*i* are the SBRs of each of the elements and *Rj* is the ratio of the SBRs of two given elements (j^{th} combination), where the maximum SBR of the two is the numerator, so that Rj >1.The CRM performs a weighted average on the sum of the SBRs and maximizes the individual SBRs while minimizing the difference among these ratios.

ICP-OES is a powerful technique for multi-element analysis, but it can be affected by spectral interferences which limit the accuracy, repeatability and reproducibility of the method. Several methods for correction of spectral interferences have been applied (2,9,11) One of the most frequently used is the method of Interelement Correction Factor (IEC). According to this method, Eqn 3 was applied to obtain the corrected analyte concentration:

$$C_c = C_u - \Sigma(K_i \times I_{ic}) \qquad (3)$$

where C_u, C_c F_i and I_{ic} are uncorrected analyte concentration, corrected analyte concentration, IEC factor and interfering concentration, respectively, for each interfering element *i*.

The aim of our work was optimization of the method for simultaneous multi-element determination of the following elements: Fe, Zn, Cu, Se, Mn, Cr, Ni and Co. In this work, we compeared Leary's objective function and CRM by examing the factors obtained by each function and by evaluating the performance of each function in determining the optimum instrument operating conditions. We have also determined IEC for all suspected elements.

Experimental

Instrumentation

Measurements were made on Perkin Elmer, Optima 2000 DV ICP emission spectrometer equipped with: Coupled Echelle monochromator; CCD (Charged coupled devise) detector with wavelength range 165-800 nm, Spectral band pass 0.009 nm on 200 nm, 0.,027 nm on 700 nm and radially and axially viewing on plasma; 40 MHz Rf generator with 750-1500W power. Three channel peristaltic pump with sample uptake rate of 0.2-1.5 ml/min and ultrasound nebuliser U 5000AT was used.

Chemicals and reagents

All working solutions were prepared from standard solutions of 1000 mg/l solutions of the element of interest (Merck) and ICP multi-element standard solution VIII 100 mg/l (Merck). Standards solutions were diluted with 0.1 mol/l HNO_3 (Merck, trace pure).

Methods

Optimization

All operating conditions were held constant except for the observation height and Rf power. Nebulisation gas flow, auxiliary gas flow and plasma gas flow were 0.75 l/min, 0.5 l/min, and 15 l/min respectively. The sample flow rate was 2.5 ml/min. Axially viewing on plasma and signal integration time of 1.0 s were used. The background for each line was selected at 0.05 nm on both sides of each spectral line peak. An average of the background was used for all readings.

The observation height varied from 9.0-24.0 mm above the top of the load coil (ATOLC) in steps of 3.0 mm and the Rf power varied from 900-1400 W in steps of 100 W.

The SBR were determined for all eight elements (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn and Se) at each set of operating conditions using 10 μg/l working solutions. Spectral lines of these eight elements studied are shown in Table 1 along with their excitation and ionization potentials (16).

Table 1. Selected analytical lines

Element (*)	*λ (nm)*	*EP (eV)*	*IP(eV)*
Co II	228.616	5.60	7.86
Cr II	267.716	6.18	6.76
Cu I	324.752	3.82	7.72
Fe II	259.940	4.77	7.87
Mn II	257.610	4.81	7.43
Ni II	231.604	6.39	7.63
ZnII	213.856	5.80	9.39
Se I	196.026	6.32	9.75

*(I-atomic line, II-ionic line)

Based on these SBRs, a set of operating conditions for determination of each of the elements was made. Using these values for the eight elements, two response surfaces were generated, one using Leary's objective function and the other using CRM. The single value representing each set of operating conditions corresponding to the best results for each element were determined from these surfaces and used in comparison of two objective functions.

Interelement correction(IEC)

Interelement correction factors for each of the suspected interfering elements were determined. Determinations were made using standard solution of each element (10.μg/l) in presence of interfering element in concentration of 1000 μg/l. Measurements were made on wavelength on analyte line of interest. The concentrations of the analyte and of the interfering element were determined. IEC factor was calculated by dividing the apparent analyte concentration at that particular wavelength by the interfering concentration. Eqn. 3 was applied to obtain the corrected analyte concentration.

Results and discussion

It has already been told that Rf power, the nebulization gas flow rate and viewing height play a major role in both the energy transferred from plasma to analyte species and in the residence time of the species in the plasma (1-4). The Rf power is directly linked to the amount of energy transferred to the species and then it has a direct influence on the net signal intensities and on SBR values. For most of the lines, increasing the Rf power lead not only to higher gross line signals but also to higher background values (12-14).The role of the nebulisation gas flow rate is more complex. An increase in this rate increases the amount of analyte and solvent introduced into the plasma, but leads to a decrease in the residence time and then in the energy transfer efficiency. These two competitive effects usually result in an optimum value of the carrier gas flow rate, which is then a compromise between the amounts of aerosol introduced into the plasma and the residence time of the species. In line with the literature data, it was concluded that using ultrasound nebuliser, nebulisation gas flow rate of 0.75 l/min gave satisfactory sensitivity value of analytical signals (11,15,17). The effect on the location of the maximum intensity, i.e., the viewing height where the maximum intensity could be observed, was described by Boomans (2). The lines can be subdivided into two basic categories. One group, atomic and ionic lines with EP < 5.8 eV and IP < 8.0 eV (called "soft" lines after Boumans) have spatial emission behavior that is very dependent on power, aerosol flow and analyte excitation and ionization characteristics. The second group, ionic lines with EP > 5.8 eV and IP > 8.0 eV (called "hard" lines after Boumans) have spatial emission behavior that is relatively insensitive to all of the above parameters. In all cases ion lines have hard line behavior similar to majority atom lines. Under fixed ICP conditions all hard lines have their peak emission at essentially the same position in the discharge which is always higher in the discharge than it is for soft lines (1,2,4).

In our work, the Rf power and viewing height were studied simultaneously, i.e., for each value of viewing height, Rf power was studied in range 900-1400 W. The influence of Rf power and viewing height was studied on the SBR value. The SBRs of each element at each set of operating conditions were determined. The obtained SBRs values have revaled that all the behaviors of analytical lines were dependent on the Rf power and viewing height.

The maximum value of SBR for atomic lines (CuI) and ionic lines (CoII, FeII, MnII) with EP < 5.8 eV and IP < 8.0 eV was obtained in "thermal region" on plasma. Behaviors of these lines were strongly dependent on viewing height value. Atomic lines (Se I) and ionic lines (CrII, NiII, ZnII) with EP > 5.8 eV and IP > 8.0 eV had maximum SBR value in "non-thermal" region on plasma. Measurement of SBRs on different Rf power, has shown three different behaviors of the used analytical lines. For analytical line of CuI (324.752), the highest SBR values were obtained for a low Rf power (900 -1000 W); further increase of Rf power leads to a decrease of SBR value. For analytical lines of FeII (259.94) and MnII (257.610), the SBR values increase with increasing of Rf power in range of 900-1200 W; further increase of Rf power leads to a decrease of SBR values. For analytical lines of CoII (238.892), CrII (267.716), NiII (231.604), ZnII (213.856) and SeI (196.026), the highest SBR values were obtained for a high Rf power (1200-1300 W); further increase of Rf power leads to small changes of SBR value.

The optimum instrumental operating conditions, which mean the highest obtained value of SBR for each element, are presented in Table 2.

Table 2. Optimum operating conditions for each element

*Selected analytical line (λnm)**	*Observation height (mm)*	*Rf power (W)*	*SBR*
CoII (228.616)	15	1200	13.02
Cr II (267.716)	18	1300	7.81
Cu I (324.752)	12	1000	38.44
Fe II (259.94)	15	1200	39.95
Mn II (257.610)	12	1200	41.05
Ni II (231.604)	15	1300	14.48
ZnII (213.856)	15	1200	17.73
Se I (196.026)	18	1300	10.32

*(I-atomic line, II-ionic line)

As it can be seen in Table 2, optimum instrumental operating values for Rf power and viewing height for each element have different values. For example, optimized parameters for CoII, FeII and ZnII lines have the same value, but the use of the optimum parameters for these lines would degrade SBR values of the MnII, CrII, CuI, NiII and SeI lines. Similarly, the use of the optimized parameters for the CrII and SeI lines, would degrade SBR values of other lines. Because of these reasons, using the obtained SBR values for each element for each set of operating conditions, the optimum compromise instrumental operating conditions for all elements were determined using Leary's function and CRM. The application of these two objective functions produces value of factors F (Leary's function) and CRM factors (Combinated Ratio Method). The highest generated value of factors indicates the best compromise instrumental operating conditions for determination of all of the elements. Values of factor F (Leary's function) and CRM factors are shown in Table 3 and Table 4 respectively.

Leary's objective function provides the best compromise instrumental operating conditions maximizing the total of the SBRs, but CRM puts the more emphasis on minimizing the difference between the SBRs of investigating elements. Instead of two different approaches of applied functions, values of obtained factors (factor F and CRM factor), shown in Tables 3 and 4, indicate that two functions provides the same set of operating conditions as the best compromise (Rf power of 1300 W and observation height of 15 mm).

Analyzing emission spectra of investigating elements (2,3,18-20), spectral interferences from analytical lines of Cu, Fe and Mn were expected. Interelement correction factors were determined for all analytical lines of interest. Values of IEC are presented in Table 5.

Table 3. Values of coefficient F (according to Leary's objective function)

	Rf power(W)						
Observation height (mm)		900	1000	1100	1200	1300	1400
	6	0.397	0.595	0.995	1.535	1.610	1.095
	9	0.550	0.908	1.639	2.880	3.420	2.896
	12	1.060	1.629	3.966	5.943	7.469	5.194
	15	2.023	3.611	6.541	9.770	10.973	7.670
	18	3.014	5.409	8.519	10.314	8.537	7.428
	21	3.012	5.063	7.575	8.213	6.134	5.453
	24	2.591	3.855	4.770	4.616	3.898	3.174

Table 4. Values of coefficient CRM (according to Combinated ratio method)

	Rf power (W)						
Observation height (mm)		900	1000	1100	1200	1300	1400
	6	0.050	0.076	0.130	0.236	0.226	0.156
	9	0.074	0.117	0.214	0.391	0.497	0.440
	12	0.136	0.210	0.538	0.829	1.187	0.857
	15	0.267	0.485	0.930	1.470	1.198	1.402
	18	0.405	0.762	1.291	1.693	1.527	1.388
	21	0.426	0.788	1.285	1.547	1.084	0.943
	24	0.379	0.524	0.810	0.763	0.620	0.486

Table 5. Magnitude of IEC factors used to correct spectroscopic interferences

Interfering element	*Cu*	*Fe*	*Mn*
	K_i	K_i	K_i
Analytical line(λ, nm)			
Co II (228.616)	$1.08x10^{-4}$	$1.38x10^{-3}$	$2.45x10^{-4}$
Cr II (267.716)	$6.78x10^{-5}$	$5.45x10^{-3}$	$2.05x10^{-3}$
Cu I (324.752)	/	$1.47x10^{-5}$	$8.03x10^{-5}$
Fe II (259.940)	$2.95x10^{-5}$	/	$1.07x10^{-2}$
Mn II (257.610)	$1.37x10^{-5}$	$1.36x10^{-2}$	/
Ni II (231.604)	$2.23x10^{-5}$	$6.95x10^{-3}$	$7.32x10^{-3}$
Zn II (213.856)	$4.89x10^{-2}$	$8.75x10^{-4}$	$1.67x10^{-2}$
Se I (196.026)	$6.50x\ 10^{-2}$	$9.90x10^{-2}$	$6.68x10^{-5}$

Table 6. Calibration parameters (concentration range of all elements 1 -100 μg/l)

Element	$a \pm SDx10^{-3}$	$b \pm SDx10^{-3}$	R^2	*LOD(μg/l)*	*LOQ(μg/l)*
Co	0.2254±2.98	0.4845±5.67	0.9992	0.061	0.305
Cr	0.2553±3.41	0.6406±7.81	0.9979	0.045	0.225
Cu	0.1142±1.72	0.1471±2.56	0.9996	0.077	0.385
Fe	0.2008±2.32	0.1796±2.89	0.9960	0.056	0.280
Mn	0.8564±9.21	0.1644±3.14	0.9987	0.007	0.035
Ni	0.1106±1.75	0.4729±6.25	0.9996	0.080	0.400
Zn	0.8085±9.31	0.8290±9.71	0.9997	0.150	0.750
Se	-0,1183±2.32	0.31066±4.53	0.9979	1.050	5.250

a-intercept, b-slope, R-coeficient of correlation, LOD-limit of detection, LOQ-limit of quantification

The magnitude of the IEC factors varied considerably from $1.37x10^{-5} – 1.36x10^{-2}$**.** Values of IEC factors have shown: spectral interference from emission spectra of Mn (259.373 nm, 257.610 nm and 260.568 nm emission lines) to analytical line of Fe II (259.940 nm); spectral interference from emission spectra of Fe (259.373 nm emission line) to analytical line of Mn II (257.610 nm); spectral interference from emission spectra of Cu (213.597 nm, 224.700 nm emission lines) and from Mn (spectral range 250-260 nm) to analytical line of Zn II (213.856); spectral interference from emission spectra of Cu (spectral range 217-220 nm) and from Fe (spectral range 234 - 239 nm) to analytical line of Se I (196.026 nm).

Concentrations of affected elements from spectral interferences, Fe II (259.940 nm), Mn II (257.610 nm) and Se I (196.026 nm), were corrected using values of IEC, according to Eqn 3.

Validation of the optimized method for simultaneous determination of Fe, Zn, Cu, Se, Mn, Cr, Ni and Co was carried out by determination of linearity (in concentration range 1-100 μg/l), accuracy, precision, detection and quantification limit for each element. Detection limit was calculated using signal-to-background ratio-relative standard deviation approach (SBR-RSD). Calibration parameters with obtained limits of detection and limits of quantification of each investigated element are diven in Table 6.

Conclusion

ICP-OES method for simultaneous determination of trace elements Fe, Zn, Cu, Se, Mn, Cr, Ni and Co was developed and validated. The obtained results of proposed ICP-OES method for simultaneous determination of trace elements have shown improved detection limits (Fe 0.056, Zn 0.15, Cu 0.077, Se 1.05, Mn 0.007, Cr 0.045, Ni 0.08 and Co 0.061 μg/l) which were in agreement with literature (5,6,9,15). Optimization was made using two factorial designs which gave the same set of instrumental operating conditions as the best compromise. Both objective functions, Leary's objective function and CRM method, could easily be applied to optimization of the other instrument parameters (e.g. gas flow rates, solution pump rate to the nebuliser) using any group of analyte elements.

References:

1. Skoog D. A. , Leary J. J. Leary, *Principles of Instrimental Analysis*, 4th ed., Saunders College Publishing, 1992
2. Boumans P. W. J. M., *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy, Part I: Methodology, Instrumentation and Performance*, Wiely-Interscience, New York, 1987
3. Blades M. W., Horlick G., *Spectrochim. Acta*, **36B,** 861 (1981)
4. Smid T., *Theoretical principles of Plasma Physics and Atomic Physic, Essential facts and Formulae*, Academic press, New York, 2002
5. Chausseau M., Poussel E., Mermet J. M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**, 1293, (2000)
6. Sturman B. T., Doidge P. S., *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 69, (1998)
7. Boumans P. W. J. M., Bosveld M., Spectrochim. Acta, **34B**, 59 (1979)
8. Belchamber R. M., Horlick G., *Spectrochim. Acta*, **37B**, 1037 (1982)
9. Townsend A. T., *J. Anal. At. Spectrom.*, **15,** 307, (2000)
10. Falciani R., Novaro E., Marchesini M., Gucciardi M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **15,** 561, (2000)
11. Masson P., Vives A., Orignac D., Prunet T., *J.Anal. At. Spectrom.*, **15**, 543, (2000)
12. Benkhedda K., Infante H. G., Ivanova E., Adams F. C., *J.Anal. At. Spectrom.*, **15,** 1349, (2000)
13. Park C. J., Suh J. K., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12,** 573, (1997)
14. Boumans P. W. J. M., De Boer F. J., *Spectrochim. Acta*, **31B,** 355 (1976)
15. Rodushkin I., Odman F., Olofsson R., Axelsson M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **15,** 937, (2000)
16. Juan Mora J. L. T., Canals A., Hernandis V., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12,** 445, (1997)
17. Winge R. K., Fassel V. A., Peterson V. J. Floyd M. A., *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy: An Atlas of Spectral information*, Elsevier, Amsterdam-New York, 1985
18. Villaneuva M., Catasus m., Salin E. D., Pomares M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **15,** 877, (2000)
19. Sesi N. N., Hieftje G. M., *Spectrochim. Acta*, **51B,** 1601 (1996)
20. Griffiths M. L., Svozil D., Worsfold P. J., Denham S., Evans E. H., *J. Anal. At. Spectrom.*, **15,** 967, (2000)

Резиме

Оптимизација на метод за симултано мултиелементарно определување на микроелементи со примена на индуктивно спрегната плазма-оптичка емисиона спектрометрија: хемометриски пристап

Руменка Петковска*, Анета Димитровска

[1]*Фармацевтски Факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, Скопје, Р.Македонија*

Клучни зборови: ICP-OES, микроелементи, мултиелементарно определување, објективни функции, корекција на интерференции

Оптимизацијата на методот за симултана мултиелементна анализа на Fe, Zn, Cu, Se, Mn, Cr, Ni и Co со примена на ICP-OES беше извршена со примена на две објективни математички функции. Однесувањето на избраните аналитички линии при промена на моќноста на радиофрекфентниот генератор и висината на зоната над магнетниот калем беше определено преку утврдување на зависноста на односот сигнал-позадинско зрачење (SBR) за сите испитувани елементи. Утврдувањето на присуство на спектрални интерференции и проценката на нивната значајност беше извршено со примена на експериментално - математичкиот модел за пресметување на фактор за интерелементна корекција на спектрални интерференции (IEC). Методот беше валидиран преку определување на линеарност (во концентрациско подрачје од 1-100 μг/л), точност, прецизност, лимит на детекција и лимит на квантификација за секој елемент одделно. Лимитот на детекција за секој елемент беше определен користејќи го пристапот на проценка на односот меѓу сигнал/релативна стандардна девијација на задинско зрачење (SBR-RSD). Резултатите покажуваат дека лимитите на детекција на одделните елементи се во согласност со долните граници на лимитите на детекција познати во литературата (Fe 0.056, Zn 0.15, Cu 0.077, Se 1.05, Mn 0.007, Cr 0.045, Ni 0.08 и Co 0.061 μg/l).

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 9-16 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 615.256.3.074:543.544.5

Original scientific paper

Determination of ethinylestradiol and levonorgestrel in oral contraceptives with HPLC methods with UV detection and UV/fluorescence detection

Zorica Arsova-Sarafinovska[1]*, Liljana Ugrinova[2], Katerina Starkoska[1], Dragan Djordjev[1], Aneta Dimitrovska[2]

[1]*Republic Institute for Health Protection, Skopje, Macedonia*
[2]*Faculty of Pharmacy, Center for Drug Quality Control, Skopje, Macedonia*

Received April 2006 , accepted June 2006

Abstract

Oral contraceptives are pharmaceutical formulations containing an estrogen in a small amount and a synthetic progestin in 5-30 times bigger amount. A sensitive, accurate and rapid method for determination of active compounds is required.

We have developed HPLC methods for determination of ethinylestradiol (EED) and levonorgestrel (LNG) in commercially available tablets. Chromatographic separation was performed on a Purospher® STAR RP-18e reversed-phase column (150 X 4.0 mm I.D.; particle size 5 µm) in an isocratic mode with a mobile phase constituted of 47% acetonitrile: 53% water (V/V) for both methods. The elution was carried out at a flow rate of 1.50 ml /min. All analyses were performed at room temperature (24 +/- 2°C). In the HPLC method with UV detection (internal standard method) both compounds were detected at 215 nm. Drospirenone was used as an internal standard. In HPLC method with UV/fluorescence detection (external standard method) LNG was monitored at 242 nm, while EED was detected with fluorescence detector at 310 nm (excitation 285 nm).

The methods' performances were fully validated by a determination of linearity, reproducibility, accuracy and sensitivity. Both methods were applied for determination of *Uniformity of Dosage Units*. The results obtained with both methods were highly comparable. However, the HPLC method with UV/ fluorescence detection has showed superior sensitivity for EED indicated by 83 times lower detection limit.

HPLC method with UV/ fluorescence detection could be recommended as a method of choice for determination of ethinylestradiol, present at a very low dosage level in low-dose oral contraceptives, that also contain bigger amount of synthetic progestin.

Key words: ethinylestradiol, levonorgestrel, high performance liquid chromatography, oral contraceptives

Oral contraceptives are pharmaceutical formulations containing steroid hormones in a relatively small amount. The most commonly encountered estrogen is ethinylestradiol (Fig. 1), present at a very low dosage level (30-100 µg per tablet), in combination with an orally active synthetic progestin (one of the most commonly used is levonorgestrel (Fig. 2)), present at a level of 5 to 30 times that that of the estrogen. Ethinylestradiol (EED) is a semi synthetic estrogen female sex hormone and levonorgestrel (LNG) is a synthetic steroid with an extremely potent progestational action (1, 2, 3).

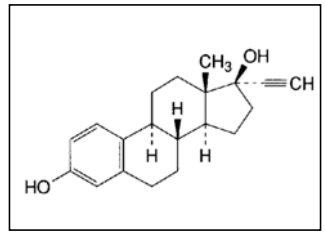


Fig. 1. Structure of ethinylestradiol (EED)

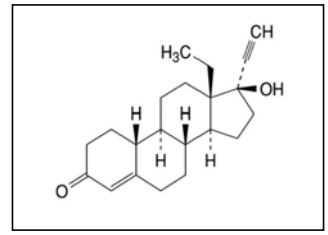


Fig. 2. Structure of levonorgestrel (LNG)

Tel:+389 (0)2 314 7070; Fax: +389 (0)2 322 3354
*e-mail: zarsova2002@yahoo.co.uk

Therefore, the modern low-dose oral contraceptives require a sensitive, accurate and rapid methods of quantitative determination which is unaffected by the small amount of the estrogen and the large excess of progestogen.

There are several reports (4-13) on determination of EED and LNG, including the use of derivative spectrometry (4), high performance liquid chromatography with fluorescence detection (5), gas chromatography-mass spectrometry on the pentafluorobenzoyl derivatives (6) and pentafluorobenzyl-trimethylsilyl derivatives (7), solid phase extraction followed by gas chromatography /MS/MS after derivatization with mixture of N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, trimethylsilylimidazole, and dithioerytrol (8), solid phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry (9, 10), affinity chromatography with tripeptide column (11), etc. Although the listed methods give high sensitivity, they still have drawbacks, including time consuming in extraction process when solid phase extraction is performed. Furthermore, the target analytes have to be derivatized if GS-MS is used which makes these procedures unsuitable for routine analysis. Additionally, spectrometry is susceptible to much interference of excipients, degradation products, and impurities.

On the contrary, liquid chromatography (LC) has only been employed in a few occasions (12, 13) regardless of its advantages over the already mentioned techniques. Thus, unlike GC-MS, LC enables determination of steroid without derivatization and it is not limited by such factors as properties of the substances (non volatile) and high molecular weight.

The aim of this research was standardization of HPLC methods for quantitative determination of associations of ethinylestradiol (ETE) - levonorgestrel (LNG) in commercially available oral contraceptives.

Experimental

HPLC instrumentation and conditions

HPLC analyses were performed using a Schimadzu LC-2010 chromatographic system (Schimadzu, Kyoto, Japan) consisting of a LC-20AT Prominence liquid chromatograph pump with DGU-20A5 Prominence degasser, a SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, RF 10AXI fluorescence detector and a SIL-20 AC Prominence auto sampler. Data analyses were done using Class VP 7.3 Software.

Chromatographic separation was performed on a Purospher® STAR RP-18e reversed-phase column (150 X 4.0 mm I.D.; particle size 5 μm), in an isocratic mode with a mobile phase constituted of 47% acetonitrile: 53% water (*V/V*).

The elution was carried out at a flow rate of 1.50 ml /min. The injection volume was 10 μl. All analyses were performed at room temperature (24 +/- 2 degrees C). In the UV method the column effluent was quantified at a wavelength of 215 nm with drospirenone used as an internal standard. In the method with UV / fluorescent detection, LNG was quantified at a wavelength of 242 nm, while EED was quantified with fluorescent detection (excitation 285 nm/ emission 310 nm).

Preparation of solutions

Commercially available samples, coated tablets containing 30 μg of EED and 150 μg of LNG, were used in this research. Levonorgestrel, ethinylestradiol and internal standard were supplied by Schering Deutschland GmbH (Berlin, Germany). HPLC-grade acetonitrile was from Merck (Darmstadt, Germany). Double-distilled water was used to prepare mobile phase solutions.

A solvent was prepared by mixing 60 volumes of acetonitrile and 40 volumes of water. An internal standard solution used in the HPLC method with UV detection was prepared by dissolving an appropriate amount of drospirenone in solvent in order to obtain final concentration of 50.0 μg/ml.

All solvents and solutions for HPLC analysis were filtered through a membrane filter (0.45 μm pore size) and vacuum degassed before use.

Calibration curves

Stock solution of EED was prepared by dissolving Ethinylestradiol standard substance (25 mg) with 100 ml solvent in a 100-ml volumetric flask. Standard solutions were prepared by dilution of EED stock solution with solvent to obtain final concentrations ranging from 3.75 μg/ml – 15.0 μg/ml (in the method with UV detection) and 0.6 μg/ml – 3.0 μg/ml (in the method with UV / fluorescence detection).

Stock solution of LNG was prepared by dissolving Levonorgestrel standard substance (65 mg) with 100 ml solvent in a 100-ml volumetric flask. Standard solutions were prepared by dilution of LNG stock solution with solvent to obtain final concentrations ranging from 18.75 μg/ml – 75.0 μg/ml (in the method with UV detection) and 3.0 μg/ml – 15.0 μg/ml (in the method with UV / fluorescence detection).

Sample preparation

In the HPLC method with UV detection, internal standard method, each of 10 tablets was transferred in 5-ml volumetric flask and 4 ml internal standard solution was added. The solution was heated at 60°C in an ultrasonic bath for 25 minutes, cooled and filtered through 0.45 μm-nylon syringe filter. 10 μl of the clear solution was injected into chromatograph.

In the HPLC method with UV/ fluorescence detection, external standard method, each of 10 tablets was transferred in 25-ml volumetric flask and 20 ml solvent was added.

The solution was heated at 60°C in an ultrasonic bath for 25 minutes, cooled, filled up with the solvent and filtered through 0.045 μm-nylon syringe filter. 10 μl of the clear solution was injected into chromatograph.

Recovery tests

To study the accuracy of the proposed analytical methods, recovery tests were conducted using the standard addition method. To discover whether excipients interfered with the analysis, known amounts of standard were added to tablet formulation samples and the resulting mixtures were analyzed by the proposed methods. The percent of recovery was calculated using the calibration equation.

Results and discussion

HPLC method with UV detection, internal standard method

In the preliminary research, the absorption spectra of EED and LNG in solvent were studied. The UV spectrum characteristic of the EED presents two maxima, one at 215 nm and another at 280 nm, due to $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions in the aromatic ring (14). LNG shows a characteristic absorption maximum at 242 nm which arises from $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions (in this case in the conjugated α, β-unsaturated ketone (C=C-C (O)-C) at position 3 (23). As both analyzed compounds absorb almost equally at a wavelength of 215 nm, this wavelength was chosen as the most adequate for a simultaneous detection of EED and LNG in a mixture.

British Pharmacopoeia (BP) (15) separation method for Ethinylestradiol and Levonorgestrel Tablets, two active components in contraceptive tablets, uses a reversed-phase column (15 cm x 4.6 mm) packed with octadecyl silica gel (particle size 5 μm) and a mobile phase consisting of 49% acetonitrile and 51% water, with a flow rate of 1.5 ml per minute and a detection wavelength of 215 nm. 2-hydroxybiphenyl was recommended as an internal standard. As 2-hydroxybiphenyl was not available at the time of performing the analysis, we have modified the proposed method by choosing another substance as an internal standard.

There are a few substances cited in the literature as internal standards in the determination of EED and LNG, such as: buthyl-hydroxytoluene (16), hydrocortisone (17) and drospirenone (13). However, the results we have obtained with buthyl-hydroxytoluene and hydrocortisone were not satisfactory. Namely, the elution of hydrocortisone was too fast, and buthyl-hydroxytoluene showed low absorptivity at the wavelength of 215 nm. Finally, drospirenone has fulfilled all conditions to be used as an internal standard.

Chromatograms that represent the separation of EED and LNG (with drospirenone as an internal standard) in mixed standard solution and sample solution with UV detection at wavelength of 215 nm are shown in Fig. 3. and Fig. 4, respectively.

System suitability test is an integral part of the liquid chromatographic method. System repeatability was estimated by 10 repeated injections of mixed standard solution at 100% of test concentration (7.5 μg/ml EED, 37.5 μg/ml LNG, 50.0 μg/ml IS). The variation in retention times among 10 replicate injections was very low with RSD values: 0.21% for EED, 0.22% for internal standard, and 0.23% for LNG. The variation in peak areas among 10 replicate injections was also low with RSD values: 0.39% for EED, 0.19% for internal standard, and 0.20% for LNG. These results are in accordance with European Pharmacopoeia (2). The data obtained from system suitability test are presented in Table 1.

The linearity of EED and LNG were established from a series of standard solutions for both EED and LNG separately, with concentrations ranging from 50% to 250% of the test concentration. Good linearity was observed for both analyzed compounds (r^2 = 0,9999 for both EED and LNG). The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated according to ICH Guideline (18). LOD for EED was 0.0538 μg/ml, while LOQ for

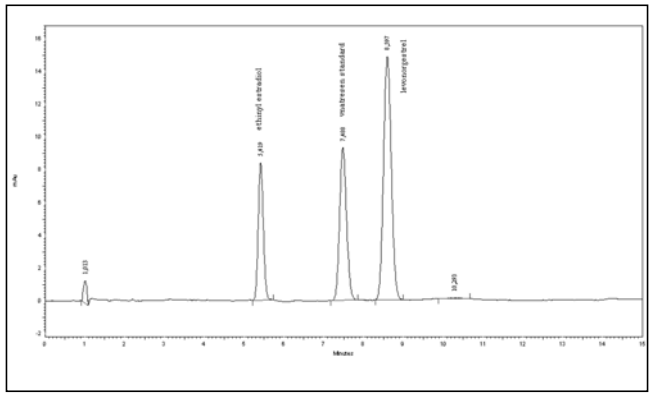


Fig. 3. A typical chromatogram of mixed standard solution (7.5 μg/ml EED, 37.5 μg/ml LNG, and 50.0 μg/ml internal standard) detected by UV detector at a wavelength of 215 nm

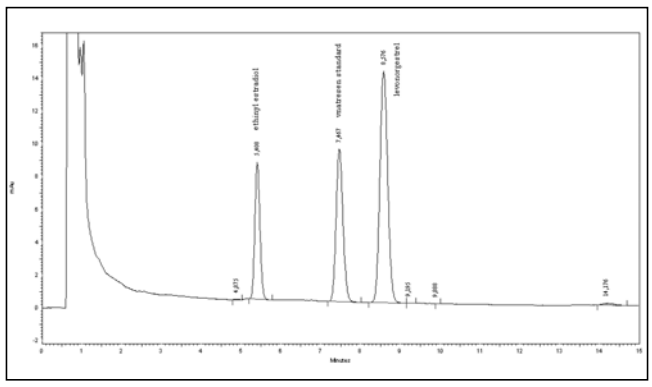


Fig. 4. A typical chromatogram of a sample solution detected by UV detector at a wavelength of 215 nm

Table 1. System suitability test parameters, comparative data between two methods

Method	UV detection[1]			UV / fluorescence detection[2]	
Parameter	EED	IS	LNG	EED	LNG
Capacity factor (k')	4.349	6.392	7.487	4.147	7.027
Selectivity factor (α)[3]	$\alpha_{2/1}$ = 1.470		$\alpha_{3/2}$ = 1.171	$\alpha'_{2/1}$ = 1.694	
Theoretical plates	3835	5607	6108	4175	6654
Resolution[4]	$R_{2/1}$ = 5.517		$R_{3/2}$ = 2.640	$R'_{2/1}$ = 8.087	
Symmetry factor	1.10	0.95	1.07	1.09	1.11

[1] HPLC method with UV detection at wavelength of 215 nm (for both levonorgestrel and ethinylestradiol), internal standard method

[2] HPLC method with UV detection at wavelength of 242 nm (for levonorgestrel) and fluorescence detection at 310 nm (excitation at 285 nm) (for ethinylestradiol), external standard method

[3] $\alpha_{2/1}$: selectivity factor between EED peak and IS (internal standard) peak; $\alpha_{3/2}$; selectivity factor between IS (internal standard) peak and LNG peak; $\alpha'_{2/1}$; selectivity factor between EED peak and LNG peak;

[4] $R_{2/1}$: resolution between EED peak and IS (internal standard) peak; $R_{3/2}$: resolution between IS (internal standard) peak and LNG peak; $R'_{2/1}$: resolution between EED peak and LNG peak

Table 2. Linearity, comparative data between two methods

	EED		LNG	
	UV detection[1]	UV / florescence detection[2]	UV detection[1]	UV / florescence detection[2]
Concentration range (ì g/ml)	3.75 – 18.75	0.6 – 3.0	18.75 – 93.75	3.0 – 15.0
Slope	4.4489	2213460	2.1364	21504
Intercept	0.0276	9795	0.0113	1299.2
Correlation coefficient (r^2)	0.9999	1	0.9999	0.9998
Limit of detection (µg/ml)	5.38×10^{-2}	6.5×10^{-4}	7.84×10^{-2}	3.81×10^{-2}
Limit of quantification (µg/ml)	0.1629	1.97×10^{-3}	0.2378	0.1156

[1] HPLC method with UV det ection at wavelength of 215 nm (for both levonorgestrel and ethinylestradiol), internal standard method

[2] PLC method with UV detection at wavelength of 242 nm (for levonorgestrel) and fluorescence detection at 310 nm (excitation at 285 nm) (for ethinylestradiol), external standard method

Table 3. Precision, comparative data between two methods

	UV detection[1]		UV / fluorescence detection[2]	
	EED (ì g/tabl.)	% of label claim	EED (ì g/tabl.)	% of label claim
$\overline{X}$	28.7372	95.79	28.9262	96.42
SD	0.4643	1.5477	0.2588	0.8626
RSD (%)		1.62		0.89
Confidence interval (95%)	28.250 – 29.225 ì g/tabl. 94.17 % – 97.42 %		28.654 – 29.198 ì g/tabl. 95.51 % – 97.33 %	
	LNG (ì g/tabl.)	% of label claim	LNG (ì g/tabl.)	% of label claim
$\overline{X}$	143.2109	95.47	141.3786	94.25
SD	1.1562	0.7708	1.2835	0.8556
RSD (%)		0.81		0.91
Confidence interval (95%)	142.000 – 144.420 ì g/tabl. 94.67 % – 96.28 %		140.030 – 142.73 ì g/tabl. 93.35 % – 95.15 %	

[1] HPLC method with UV detection at wavelength of 215 nm (for both levonorgestrel and ethinylestradiol)

[2] HPLC method with UV detection at wavelength of 242 nm (for levonorgestrel) and fluorescence detection at 310 nm (excitation at 285 nm) (for ethinylestradiol)

Table 4. Accuracy, comparative data between two methods

		UV detection[1]		UV / fluorescence detection[2]		
	Added amount (μg/ml)	Found amount[3] (μg/ml)	Recovery (%)	Added amount (μg/ml)	Found amount[3] (μg/ml)	Recovery (%)
EED	1.84	1.79	97.37	0.308	0.307	99.93
	3.69	3.73	101.19	0.615	0.608	98.82
	5.53	5.60	101.25	0.923	0.925	100.20
	7.37	7.38	100.10	1.231	1.237	100.53
	9.21	9.13	99.08	1.539	1.536	99.85
	11.06	10.88	98.43	1.846	1.842	99.78
$\overline{X}$ ± SD			99.57 ± 1.55			99.85 ± 0.57
RSD (%)			1.56			0.58
LNG	9.54	9.21	97.14	1.522	1.576	103.52
	19.08	19.43	100.48	3.044	2.989	98.19
	28.61	28.67	99.01	4.566	4.556	99.77
	38.15	38.00	98.68	6.088	6.058	99.51
	47.69	47.99	98.98	7.610	7.641	100.41
	57.23	56.97	99.96	9.132	9.138	100.06
$\overline{X}$ ± SD			98.86 ± 1.19			100.24 ± 1.78
RSD (%)			1.20			1.77

1 HPLC method with UV detection at wavelength of 215 nm (for both levonorgestrel and ethinylestradiol)

2 HPLC method with UV detection at wavelength of 242 nm (for levonorgestrel) and fluorescence detection at 310 nm (excitation at 285 nm) (for ethinylestradiol)

3 Average of three determinations

EED was 0.1629 μg/ml. LOD for LNG was 0.0784 μg/ml, and LOQ for LNG was 0.2378 μg/ml (Table 2.).

The precision of the analytical method was assessed using 6 determinations at 100% of test concentration that were done on the same day, by the same analyst and using the same equipment. Intermediate precision was established by repeating the procedure in two different days by the same analyst. The relative standard deviations (< 2%) confirmed precision of the method. The statistical data are shown in Table 3.

The recovery tests were performed according to the recommendation of ICH Guideline (17). Satisfactory recoveries were observed for both EED and LNG (99.57% ± 1.55%, and 98.86 % ± 1.19%, for EED and LNG, respectively). The results obtained are shown in Table 5 and they confirmed the accuracy of the method.

The proposed method was applied to analyze the parameter *Uniformity of Dosage Units* in the commercially available samples (coated tablets containing 30 μg of ETE and 150 μg of LNG). The obtained results were in good agreement with the certified values and were in accordance with European Pharmacopoeia requirements. The results obtained are shown in Table 5.

HPLC method with UV / fluorescence detection, external standard method

During the development of the analytical method for quantification of the active compound in Levonorgestrel and Ethinylestradiol tablet we have been faced with two inherent problems. They were: a) the low ultraviolet molar absorptivity of EED; and b) the low proportion of EED compared to LNG in the pharmaceutical formulation. Fortunately, the molecule of EED has ability to fluoresce (emit higher wavelength radiation) after excitation by shorter wavelength energy, which allowed us to measure the concentration of EED with fluorescence detector. On the contrary, levonorgestrel has no natural fluorescence. Because of that, we have chosen to measure the UV absorbance of levonorgestrel at 242 nm and the fluorescence of EED at 310 nm (excitation at 285 nm) using a DAD detector connected in series with a fluorescence detector.

As the fluorescence detector is much more sensitive than UV detector (10-1000 times more sensitive, depending on the compound being measured), we had to dilute the sample solution to obtain the optimal test concentration. Preliminary tests were performed in order to define the concentration interval in which the intensity of the detector response is proportional to the concentration of the analyzed substance. Standard solu-

tions of EED concentration ranging from 0.12 μg/ml-12.0 μg/ml were measured and the linearity was proven through the range 0.12 μg/ml – 4.8 μg/ml. Therefore, the concentration of 1.2 μg/ml was chosen as optimal test concentration.

A chromatogram that represents the separation of EED and LNG in mixed standard solution and sample with UV/ fluorescence detection is shown in Fig. 4. and Fig. 5., respectively.

System repeatability was estimated by 10 repeated injections of mixed standard solution at 100% of test concentration (1.2 μg/ml EED, 6.0 μg/ml LNG). The variation in retention times among 10 replicate injections was very low with RSD values: 0.37% for EED and 0.41% for LNG. The variation in peak areas among 10 replicate injections was also low with RSD values: 0.25% for EED and 0.23% for LNG. These results are in accordance with European Pharmacopoeia (2). The data obtained from system suitability test are presented in Table 1.

An excellent linearity was observed for both analyzed compounds (r^2 = 1 for EED and 0.9998 for LNG). The limit of detection (LOD) for EED was 0.00065 μg/ml and the limit of quantification (LOQ) for EED was 0.00197 μg/ml. LOD for LNG was 0.0381 μg/ml (Table 2.).

It is obvious that HPLC method with fluorescence detection, external standard method, is about 83 times more sensitive for EED determination than HPLC method with UV detection, internal standard method (LOD_{FLUO} = 0.00065 g/ml vs. LOD_{UV} = 0.0538 g/ml). Moreover, the use of wavelength of maximum absorbance for LNG detection (242nm) in the HPLC method with UV/fluorescence detection, external standard method, also enhances the sensitivity for LNG determination in comparison to the HPLC method with UV detection, internal standard method, where a wavelength of 215 nm is used (LOD_{242}nm = 0.0381 μg/ml vs. LOD_{215} nm = 0.0785 μg/ml).

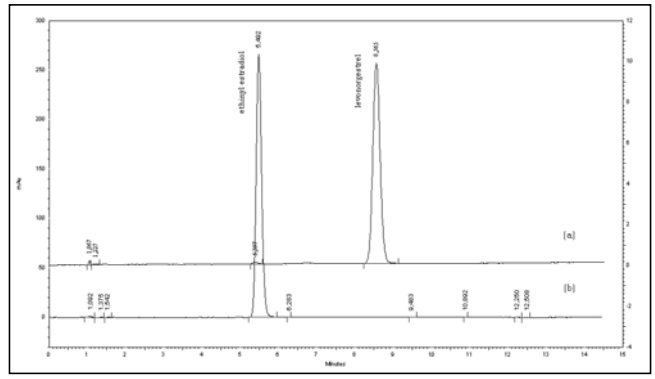


Fig. 5. A typical chromatogram of mixed standard solution (1.2 mg/ml EED and 6.0 9 ptg/ml LNG) detected by UV detector at a wavelength of 242 nm (for LNG) and fluorescence detector at a wavelength of 310 nm (excitation at 285 nm) (for EED)

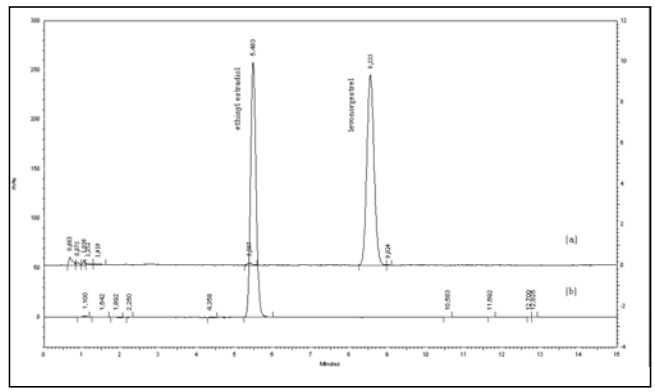


Fig. 6. A typical chromatogram of a sample solution detected by UV detector at a wavelength of 242 nm (for LNG) and fluorescence detector at a wavelength of 310 nm (excitation at 285 nm) (for EED)

The precision of the method was validated by performing 6 determinations at 100% of test concentration that were done on the same day, by the same analyst and using the same equipment. Intermediate precision was established by repe-

Table 5. Uniformity of dosage units, comparative data between two methods

	UV detection[1]		UV / fluorescence detection[2]	
	EED (ì g/tabl.)	% of label claim	EED (ì g/tabl.)	% of label claim
$\overline{X}$	28.5813	95.27	28.9087	96.36
SD		2.29		1.94
AV		8.73		6.78
	LNG (ì g/tabl.)	% of label claim	LNG (ì g/tabl.)	% of label claim
$\overline{X}$	145.2815	96.85	145.7140	97.14
SD		1.38		2.39
AV		6.78		7.10

1 HPLC method with UV detection at wavelength of 215 nm (for both levonorgestrel and ethinylestradiol)
2 HPLC method with UV detection at wavelength of 242 nm (for levonorgestrel) and fluorescence detection at 310 nm (excitation at 285 nm) (for ethinylestradiol)
3 Average of three determinations

ating the procedure in two different days by the same analyst. The variation in results obtained among 6 determinations was very low (< 2%), which confirmed precision of the method. The statistical data are shown in Table 3.

Satisfactory recoveries were observed for both EED and LNG (99.85% ± 0.57% and 100.24% ± 1.78%, for EED and LNG, respectively). The results are shown in Table 5.

The HPLC method with UV/ fluorescence detection, external standard method, was applied to analyze the parameter *Uniformity of Dosage Units* in the commercially available samples (coated tablets containing 30 μg of ETE and 150 μg of LNG). The results were in good agreement with the declared values and in accordance with European Pharmacopoeia requirements. The results obtained are shown in Table 5.

Conclusion

Both of the proposed HPLC method enables simple, accurate, precise and rapid determination of EED and LNG in pharmaceutical dosage forms without interference from excipients and could, therefore, be easily adopted in routine quality control analysis. The methods' performances were fully validated by determination of linearity, reproducibility, accuracy and sensitivity. The methods were applied for determination of *Uniformity of Dosage Units*. The results obtained with both proposed methods were highly comparable. However, in the case of sensitivity, the HPLC method with UV/ fluorescence detection, external standard method, showed superior sensitivity, which was indicated by lower detection limit for EED and LNG. By applying fluorescence detection at 310 nm (excitation at 285 nm) LOD for EED was about 83 times lower than with UV detection at 215 nm (LOD_{FLUO} = 0.00065 μg/ml / LOD_{UV} = 0.0538 μg/ml). Furthermore, we have also obtained a better sensitivity for LNG using a wavelength of maximum absorbance for LNG (242 nm) instead of a wavelength of 215 nm (LOD_{242}nm = 0.0381 μg/ml / LOD_{215} nm = 0.0785 μg/ml).

The sensitivity of HPLC method with UV/ fluorescence detection is its main advantage and it could be recommended as the method of choice for determination of ethinylestradiol, present at a very low dosage level in low-dose oral contraceptives.

References

1. T.M. Dando and M.P. Curran, *Drugs.* **65,** 2299-2306, (2005)
2. European Pharmacopoeia, 5th Edition 2004, Council of Europe, Strasbourg, 2004, pp 1550-1551, 1911-1912
3. The Merck Index, Thirteenth Edition, Merck Co Inc, 2001, pp 666, 609.
4. J.J. Berzas, J.J. Rodriguez and G. Castaneda, *Analyst.* **122,** 41-44 (1997)
5. R. Gatti, R. Gotti, M. G. Gioia and V. Cavrini, *J Pharm Biomed Anal.* **17,** 337-347 (1998)
6. X.Y. Xiao, D.V. McCalley and J. McEvoy, *J Chromatogr A.* **923,** 195-204 (2001)
7. S. Nakamura, T.H. Sian and S. Daishima, *J Chromatogr A.* **919,** 275-282 (2001)
8. T.A. Ternes, M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R.D. Wilken and M. Servos, *Sci Total Environ.* **225,** 81-90 (1999)
9. L. Nygaard, H. Drohse Kilde, S.G. Andersen, L. Henriksen and V. Overby, *J Pharm Biomed Anal.* **34,** 265-276, (2004)
10. T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki and M. Morita, *J Chromatogr A.* **984,** 195-202 (2003)
11. C. Tozzi, L. Anfossi, G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Baggiani and A. Vanni, *J Chromatogr A.* **966,** 71-79, (2002)
12. S. H. Strusiak, J.G. Hoogerheide and M.S. Gardner, *J Pharm Sci.* **71,** 636-640, (1982)
13. P.A. Lane, D.O. Mayberry and R.W.Young, *J Pharm Sci.* **76,** 44-47, (1987)
14. M.J. Lopezde Alda and D. Barcelo, *J Chromatogr A.* **938,** 145-153 (2001)
15. British Pharmacopoeia. London, UK: Constable & Co Ltd., 2003, p. 2067-8, 2198-9
16. L. Havlikova, L. Novakova, L. Matysova, J. Sicha and P. Solich, *J Chromatogr A.* 143-149, (2006)
17. L. Novakova, L. Matysova, D. Solichova, M.A. Koupparis and P. Solich, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **813,** 191-197, (2004)
18. International Conference on Harmonisation of Technical Requrements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R2) (2005)

Резиме

Определување на етинилестрадиол и левоноргестрел во перорални контрацептивни таблети со HPLC методи со UV и UV/флуоресцентна детекција

Клучни зборови: етинилестрадиол, левоноргестрел, HPLC, перорални контрацептиви

Нискодозираните перорални контрацептиви содржат две активни компоненти: естроген хормон (присутен во многу мала количина) и синтетски прогестоген (присутен во 5-30 пати поголема количина). Заради ваквиот сооднос, потребен е сензитивен, точен и брз метод за истовремено определување на двете активни компоненти.

Развиени се HPLC методи за определување на етинилестрадиол (ЕЕД) и левонорегестрел (ЛНГ) во контрацептивни таблети. Раздојувањето на компонентите во двете методи беше изведено на реверзно фазна колона Purospher® STAR RP-18e (150 X 4.0 mm I.D.; 5 μm), со мобилна фаза составена од 47% ацетонитрил и 53% вода *(V/V)*, изократно, со брзина на проток – 1,50 ml /мин. Во HPLC методот со UV детекција (метод на внатрешен стандард) детекцијата на двете компоненти беше изведена на 215 nm. Како интерен стандард беше употребен дроспиренон. Во HPLC методот со UV/флуоресцентна детекција (метод на надворешен стандард), ЛНГ се детектира на 242 nm, а ЕЕД со флуоресцентен детектор на 310 nm (ексцитација на 285 nm).

Методите беа комплетно валидирани преку определување на линеарност, репродуцибилност, точност и сензитивност. Двата метода беа применети за определување на параметарот "воедначеност на дозирани единици", при што се добиени споредливи резултати. Но, HPLC методот со UV/флуоресцентна детекција е многу посензитивен за определување на ЕЕД, што се потврдува со 83 пати пониската вредност на лимит на детекција за ЕЕД.

На HPLC методот со UV/флуоресцентна детекција му се дава предност како метод од избор при контрола на квалитетот на нискодозирани перорални контрацептиви со ЕЕД во комбинација со прогестогени активни компоненти, присутни во повисоки концентрации.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 17-24 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 615.324

Original scientific paper

Viability of *L. casei* during fermentation in soymilk and freeze-dried soymilk; effect of cryoprotectant, rehydration and storage temperature

Lela Acevska[1], Kristina Mladenovska[2], Tanja Petreska Ivanovska[1], Maja Jurhar Pavlova[3], Milena Petrovska[3], Angela Delova[4], Lidija Petrusevska Tozi[1]*

[1]*Department of Food and Nutrition and* [2]*Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000, Skopje;*
[3]*Institute of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Vodnjanska 19, 1000 Skopje,*
University "Ss. Cyril and Methodious", Skopje, Macedonia,
[4]*Health Care Institute, Partizanska bb, 7000 Bitola, Macedonia*

Received September 2005, accepted December 2005

Abstract

The aim of the work was to investigate the behaviour of *L. casei* and the effect of sorbitol on its viability during fermentation in soymilk drink. Values for pH, ranging from 6.82 to 3.42 in the soymilk drink without sorbitol and from 6.74 to 3.41 in the drink with sorbitol were noted during 72 h of fermentation at 25^{o}C. The corresponding values for titratable acidity ranged from 0.071% to 0.758% and from 0.073% to 0.761%, respectively. Soymilk was found to support the growth of *L. casei* with improvement in viability for 0.24 log at the end of fermentation when sorbitol was added. Survival of *L. casei* and the effectiveness of sorbitol in improving viability during freeze-drying, subsequent rehydration and during a 5-week period of storage under different temperatures were also investigated. After freeze-drying, *L. casei* exhibited a survival percent of approximately 46%. Sorbitol improved the viability of *L. casei* by 0.51 log immediately after freeze-drying and by 1.30 log and 0.47 log during five weeks of storage at 25^{o}C and 4^{o}C, respectively. Further study revealed that the freeze-dried fermented soymilk rehydrated at 45^{o}C was optimum for the recovery of *L. casei* with improvement in recovery for 0.68 log when sorbitol was added. A higher percent of survival was noted when the dried soymilk was stored at 4^{o}C than at 25^{o}C with improved viability at the end of 5 weeks storage for approximately 6 log for drinks with and without sorbitol. Fermented dried soymilk with sorbitol afforded significant tolerance of *L. casei* to acid stress. Generally, a stable probiotic diary product was prepared in which the concentration of *L. casei* remained above therapeutic level of 10^7 cfu/ml.

Keywords: *L. casei*, fermented soymilk, freeze-drying, sorbitol, viability

Introduction

Soybean is one of the most important oilseeds in the world. Besides the extra protein and fibre, the biggest benefit in soybean are the isoflavones connected to a whole host of health issues, the most important being prevention of many cancers, heart diseases, osteoporosis and more (1-5). In addition, soybean contains powerful antioxidants that help fight disease and aging, thus strengthening the immune system (6-7). Soy fibre, in a healthy diet, may help control diabetes by making the body more sensitive to insulin in the bloodstream, while slowing the release of glucose into the bloodstream to a more manageable rate (8). Also, soybean could be effective in the protection of neuropathy induced by diabetes mellitus (9). Soy's ability to lower LDL cholesterol in the blood (10) also helps to prevent kidney damage (11-12).

However, the oligosaccharide constituents in soybean, such as raffinose and stachyose are not digested by human beings and thus may cause flatulence. This along with the disagreeable beany flavour has limited the consumption of soybean as the raw food material. In order to increase both acceptability and nutritional value, fermentation of soybean products with lactic acid bacteria has been studied extensively to develop more digestible and palatable foods

*Lidija Petrusevska Tozi
e-mail: lito@ff.ukim.edu.mk
tel: 00389 2 3126 032; fax: 00389 2 3123 054

such as fermented soybean cheese, sour milk beverage and soybean yogurt (13-15). Soymilk as a water extract of soybean has long been a popular alternative for people who are unable to drink cow's milk (usually due to lactose intolerance). But rather than drink soymilk because you have to, more and more people are deliberately choosing soymilk because of the added health benefits.

Lactic acid has been widely used as an acidulant and many reports have shown the usefulness of lactic acid bacteria as probiotics for humans and animals (16-19). Probiotic culture, known to be (+)-lactic acid producer exhibiting promising therapeutic potential, is *Lactobacillus casei*. The action of this probiotic on intestinal flora results in vital benefits, including prevention and treatment of gastrointestinal disorders, such as colon irritation, constipation, paediatric and travellers' diarrhoea (20-22), ulcerative colitis and Crohn's disease (23-24). Other important properties include liver improvement function (25), prevention of cancer and cardiovascular diseases (anticholesterolaemic effect) (26), antimicrobial activity (27-28) and reduction of food intolerance (29). The beneficial effect is proposed to be due, at least in part, to interference with the innate immune system and possibly the orientation of adaptive immunity (30).

The homofermentative *L. casei* is acidotolerant with an optimum pH of 5.5 and is relatively insensitive to product inhibition by lactic acid (31). In order to exert any beneficial health effect, the concentration in a product that serves as a delivery system needs to be in a therapeutic level ranging from 10^6 to over 10^7 cfu/ml or gram product (32-34). The main obstacle for achieving and maintaining required levels is the strain-dependence and poor survival due to increased acidity and oxygen tension (35).

Probiotics usually have limited shelf-life in conventional yoghurt as well as in the product itself. Freeze-drying is a process that not only preserves the yoghurt, but also helps to maintain a sufficient quantity of viable probiotics. Previous research (36) has found that certain *L. casei* strains are able to survive the freeze drying process with the percent of survival ranging from 41% to 75% depending significantly on the bacterial strain. During the processing and storage of freeze-dried yoghurt, oxygen content, high temperature, low pH, water activity and elevated solution concentration may all affect the viability of probiotic organisms (36-37). Compatible cryoprotectants may be added to media or into the yoghurt mix prior to fermentation to assists in the adaptation of probiotic to the environment and maintain the viability during freeze-drying (38-40). As compatible cryoprotectants accumulate within the cells, the osmotic difference with their external environment is reduced. The extent to which cryoprotection is provided by any given cryoprotectant varies between cultures (39; 41-45).

Considering the above-mentioned, the behaviour of *L. casei* in soymilk drink during fermentation was studied and the effect of sorbitol as a sugar derivative present in the growth medium was evaluated. In this study, an attempt was made to dehydrate fermented soymilk with freeze-drying, which is commonly employed in food industry. Survival of *L. casei* during the drying process and the effect of sorbitol in preserving probiotic's viability were investigated. In addition, chemical properties and the viability of *L. casei* in the dried soymilk after rehydration, acid challenge and storage under different temperature conditions during 5 weeks were compared.

Materials and methods

2.1. Microorganism and chemicals

L. casei (FD-DVE/L. casei-01-nu-trish was kindly provided by Chr. Hansen (Copenhagen, Denmark). For fermented milk preparation whole sterile pasteurized soymilk (SoVita, Vitalia, Skopje, Macedonia) was used. As a cryoprotectant, sorbitol was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). For bacterial enumeration, MRS Agar (CM0361, de man, Rogosa, Sharpe, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) and peptone water (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) were used.

2.2. Preparation of fermented probiotic soymilk

In this study, a strain of *L. casei* was used as a single culture for production of fermented soymilk. For the preparation, whole sterile soymilk inoculated with *L. casei* (0.05 g/L) was used. Samples with and without cryoprotectant were prepared. As a cryoprotectant, sorbitol was used in concentration of 25 g/L. Sorbitol was added to the soymilk during phase of fermentation. According to the preliminary results related to the microbial and chemical characterisation, which were in accordance with those of probiotic producer, inoculated soymilk fermented for 3 days without shaking at temperature of 25ºC until a pH of 3.42 was reached in both samples with and without sorbitol. The initial population of L. casei was 2.98×10^8 cfu/ml and at the end of fermentation the maximum population of 9.7×10^{19} cfu/ml was obtained in the samples without sorbitol, while in the samples with sorbitol, the corresponding values were 2.7×10^8 and 1.68×10^{20} cfu/ml, respectively.

2.3. Drying of fermented probiotic soymilk

In this study, the fermented probiotic soymilk was subjected to drying with freeze-drying. The samples were stored in tightly sealed sterile bottles and frozen at -20ºC. Then, frozen samples were than lyophilized with a freeze-dryer (Freeze Dry System, Labconco, USA) at a condenser temperature of -45ºC and 0.180 mBar vacuum for about 50 h (13-14).

2.4. Storage of the dried fermented probiotic soymilk

Each of the freeze-dried products of fermented probiotic soymilk (10 g) was placed in a 100 ml glass bottle and vacuum sealed before storage. Then, were stored at either 25ºC or 4ºC for a period of 5 weeks. The chemical characterization, viability of probiotic organism and moisture content of the samples were measured at predetermined time intervals. Moisture content of the samples was determined according to the AOAC method (46).

2.5. Rehydration study

When the rehydration phase was performed, the dried fermented samples were mixed with peptone water (0.1 g/ml; Peptone water, Oxoid LTD, Hampshire, England), which was pretempered at 25ºC, 45ºC and/or 90ºC. The constituted samples were then serially diluted with peptone water and spread-plated on the appropriate medium to enumerate the test organisms.

2.6. Acid challenge

One gram of fermented whole and freeze-dried probiotic soymilk was homogenized in 9.0 ml 0.025 N HCl, leading to final pH 2.0 prior to a 60 min incubation. After 60 min of acid challenge, samples were quickly diluted in peptone water and surviving cells counted (47). Acid challenge test was applied to samples with and without sorbitol, and for the freeze dried samples the test was applied after 1 week storage at 4ºC and 25ºC, respectively.

2.7. Chemical analyses

2.7.1. Titratable acidity (TA) and pH

TA was determined using the method (number 16.023) of AOAC (46) by titration with 0.01 N NaOH solution and expressed as percent lactic acid, while the pH of the samples was measured using a pH meter (Jenway ltd., Felsted, UK).

2.8. Microbial analyses

2.8.1. Enumeration of probiotic L. casei

For the enumeration of *L. casei*, de man Rogosa Sharpe (MRS) agar, as described by Otieno et al. (2), Minelli et al. (15) and Ha et al. (48) was used.

When the enumeration of bacteria was performed, 1 g of the dried fermented soymilk or 1 ml of the fermented soymilk sample was mixed with 9.0 ml of peptone water, vortexed for 15 s and serially diluted with peptone water. Serially diluted sample (0.1 ml) was spread-plated onto the appropriate medium mentioned above. After 72 h of incubation at 37ºC, the colonies that appeared on the plates were counted (cell counter, Esko, Yugo Lek, Belgrade, Serbia) and the cfu per ml was calculated.

2.9. Statistical analysis

The mean values and the standard deviation were calculated from the data obtained with triplicate trials. These data were compared with the Student,s *t*-test and two-factorial analysis of variance with a confidence interval of 95% (49).

Results and discussion

3.1. Moisture content of the fermented soymilk after drying

Water content is an important parameter for the stability of dried cultures. In general, microorganisms survive better in low-water activity. However, over drying may diminish the viability and stability of microorganisms (50). Besides, it is reported that the optimum residual moisture content varies with the composition of the fluid in which the microorganisms are dried, with the storage atmosphere and with the species of organisms (51). The moisture content in the samples of freeze-dried fermented probiotic soymilk, with and without sorbitol, was determined immediately after freeze-drying and it was approximately 5%. No significant difference in moisture content was observed among the samples with and without sorbitol. According to literature data (51), freeze-dried samples may be considered as stable.

3.2. Changes in pH and titratable acidity in soymilk during the fermentation and storage of freeze-dried fermented soymilk with L. casei

In general, pH value determines the processes, such as milk fermentation, enzyme activity, bacterial growth and it is an indicator for the taste of the product. The growth of lactobacilli is usually associated with production of acids, such as lactic and acetic acid. In order to detect measurable increase in acidity, the number of microorganism has to increase for several millions per millilitre. During fermentation in the food product, the content of acids increases, that of carbohydrates decreases and consequently pH value too. This process of acidification is one of the most desirable side effects of bacterial growth. pH value may decrease below 4.0, which is low enough to inhibit the bacterial growth of many other microorganisms, including most of the human pathogens, by which the storage time of the product is prolonged. Acidity may change the texture of the food product due to the protein precipitation, while biochemical changes resulting from the bacterial growth may change the odour and taste of the product. Fermentation is self-limited due to the sensitivity of lactobacilli to low pH.

During the study, changes in acidity have been followed in non-freeze-dried probiotic samples of whole soymilk with and without sorbitol and in freeze-dried samples stored at 25ºC and 4ºC during 5 weeks. pH value for the whole soymilk in the beginning of the study (without probiotic

and cryoprotectant) was 6.95, while for titratable acidity, 0.061% of lactic acid was determined. During the fermentation (3 days), pH values in non-freeze-dried samples without sorbitol decreased from 6.82 to 3.42 in milk stored at 25ºC and to 6.28 in milk stored at 4ºC (fig. 1). In the samples in which sorbitol was added during the fermentation phase, the pH values ranged from 6.74 to 3.41 and to 5.74 (Fig. 1), accordingly. Non-significant difference in the acidity among samples with and without sorbitol at the beginning of the study can be explained by the presence of sorbitol. Namely, the pH of whole soymilk without sorbitol was 6.95, and for samples with sorbitol pH of 6.87 was measured.

In the next step of the study, the acidity of the samples stored at 25ºC did not change significantly (pH 3.49 in the samples with probiotic only and pH 3.16 in the samples with probiotic and sorbitol after 5 weeks; Fig. 1). These data, along with the most significant changes in pH during 3 days, sensory properties and microbial growth (presented bellow) have pointed to the optimal period of fermentation and freeze-drying by that, also. It is important to emphasize that at the time of freezing, the samples possessed acceptable sensory properties and for freeze-drying, samples fermented at 25ºC were used due to the faster and quantitatively more significant bacterial growth (presented bellow).

Acidity, expressed with pH values was determined in freeze-dried samples also immediately after freeze-drying and during the examined period of 5 weeks. It ranged from 3.25 to 3.44 in samples with probiotic stored at 25ºC (Fig. 2) and from 3.25 to 2.74 in samples stored at 4ºC (Fig. 3). In the samples with sorbitol, these values ranged from 3.21 to 3.32 at 25ºC (Fig. 2) and from 3.21 to 2.68 at 4ºC (Fig. 3). These data, besides water content, havered point also to the product with acceptable stability. In all freeze-dried samples sensory properties of the fermented soymilk were preserved, including light yellow colour and pleasant odour and taste.

Considering the changes in pH value in freeze-dried soymilk samples with *L. casei*, with and without sorbitol, stored at 25ºC, decrease in pH was observed during the first 2 weeks from 3.25 to 3.03 in samples without sorbitol and from 3.21 to 3.02 in samples with sorbitol (Fig. 2). Afterwards, the pH values began to increase to 3.44 and 3.32, respectively, showing decrease in survival rate, which was further confirmed by microbial studies (presented bellow). In all freeze-dried samples, with and without sorbitol, stored at 4ºC, the acidity was continuously decreasing during the whole period of the study, indicating higher survival rate of *L. casei* when product was stored at 4ºC, which was also confirmed by the microbial studies (Fig. 3). In addition, comparison of pH values between the samples with and without sorbitol has shown higher viability when sorbitol is added during the fermentation, which was more pronounced in the samples stored at 4ºC.

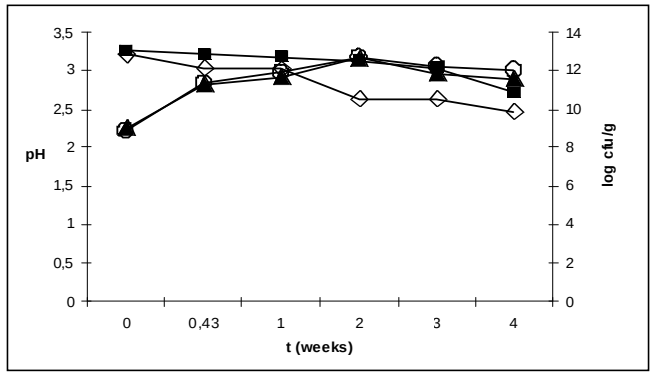


Fig. 1. Changes of pH in soymilk during the growth of *L. casei* in wohole fermented soymilk; samples without (■) and with (◊) sorbiol stored at 25^0C; samples without (▲) and with (○) sorbiol stored at 4^0 C.

As was previously mentioned, the acidity was determined by the values of TA, also. In general, decrease in pH was followed by increase in TA. TA in non-freeze-dried soymilk without sorbitol stored at 25ºC during 5 weeks ranged from 0.071 to 0.857% *vs.* TA of the same sample stored at 4ºC, where TA ranged from 0.071 to 0.504% (Fig. 4). Considering the samples with sorbitol, the values for TA ranged from 0.073 to 0.945% and to 0.738%, respectively (Fig. 4). In addition, the whole soymilk without probiotic and sorbitol had TA of 0.061%, while for samples with sorbitol only, TA of 0.070% was determined. During the fermentation period, TA values increased to 0.758% and 0.137% in the samples without sorbitol stored at 25ºC and 4ºC, respectively, while for the samples with sorbitol, the corresponding values were 0.761% and 0.246%, respectively.

When freeze-dried samples analyzed, the values for TA in the samples without sorbitol ranged from 0.612% immediately after freeze-drying to 0.630% when stored at 25ºC (Fig. 5) and to 0.759 when stored at 4ºC (Fig. 6). From these data, one can notice that when product was stored at 4ºC, higher percent of lactic acid is obtained, pointing to the higher viability of *L. casei* at this storage temperature, which was confirmed by the microbial growth also (Fig. 5-6). These differences can be explained by the phases of microbial growth i.e. the factors influencing the microbial growth, including the medium and the temperature, for which the comment is given further in this paper. The same observations were confirmed for the values of TA obtained in the samples with sorbitol in which TA ranged from 0.846% to 0.792 and to 1.094% when stored at 25ºC (Fig. 5) and 4ºC (Fig. 6), respectively.

When comparing the values for TA between samples with and without sorbitol at constant storage temperature, one can observe that at 25ºC, the values for TA were continuously increasing and they were higher in samples with sorbitol during the entire examined period. The difference was more significant ($p<0.05$) when samples were stored at 4ºC.

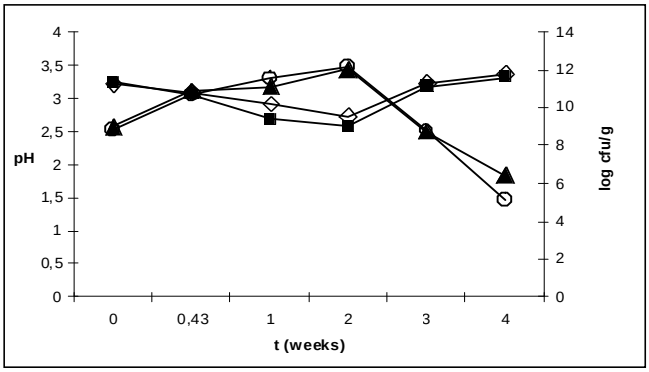


Fig. 2. pH (■, ◊) and growth (▲, ○) of L. casei in freeze-dried fermented soymilk stored at 25^{0}C; (■, ▲) samples without sorbitol; (◊, ○) samples with sorbitol.

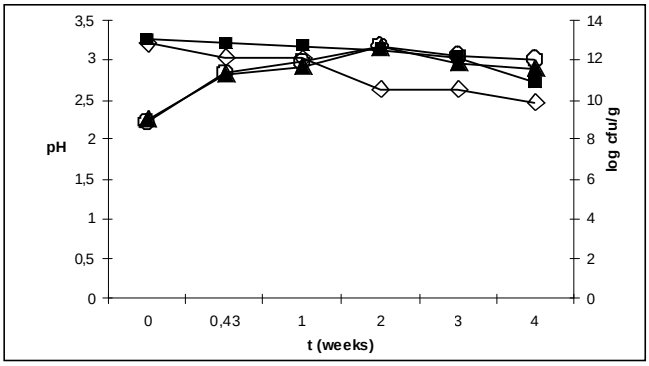


Fig. 3. pH (■, ◊) and growth (▲, ○) of L. casei in freeze-dried fermented soymilk stored at 4^{0}C; (■, ▲) samples without sorbitol; (◊, ○) samples with sorbitol.

3.3. Microbial analyses

3.3.1. Survival of L. casei after freeze-drying and during storage in the fermented dried soymilk

The growth and survival of *L. casei* in the fermented soymilk was monitored during the fermentation, freeze-drying and storage at different temperatures. The presence of *L. casei* in the medium was confirmed microscopically (Nikon, E-800, Japan) and by culture preparation (Fig. 7).

Initially, the population of *L. casei* in the soymilk after 1 h of inoculation and during the three-day fermentation in the samples with and without sorbitol was determined. Also, the initial population of *L. casei* immediately after freeze-drying was determined in the samples with and without sorbitol. In the samples without sorbitol stored at 25ºC, the number of cfu/ml was 2.98 x 10^8 in the beginning of the fermentation and it increased up to 9.7 x 10^{19} cfu/ml by the end of the fermentation (the 3rd day). In the samples with sorbitol fermented at the same temperature, the number of cfu/ml was 2.7 x 10^8 and 1.68 x 10^{20} cfu/ml, respectively. The number of cfu/ml determined immediately after freeze-drying did not differ significantly when comparing freeze-dried samples with and without sorbitol. Thus, in the samples without sorbitol, the population level was 9.7 x 10^8 cfu /ml (≈ 45% of survival), while in the samples with sorbitol, it was 3.1 x 10^9 cfu/ml (≈ 47% of survival).

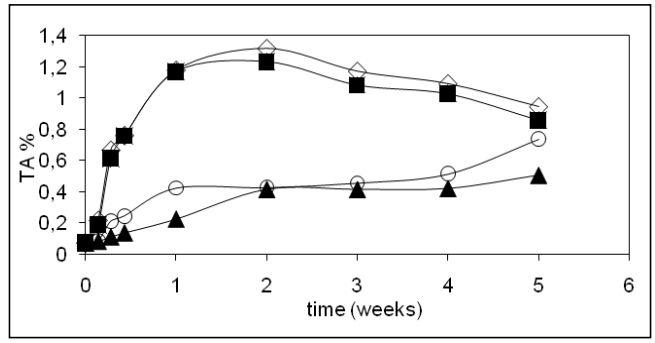


Fig. 4. Changes of TA in soymilk during the growth of L. casei in whole fermented soymilk; samples without (■) and with (◊) sorbitol stored at 25^{0}C; samples without (▲) and with (○) sorbitol stored at 4^{0}C.

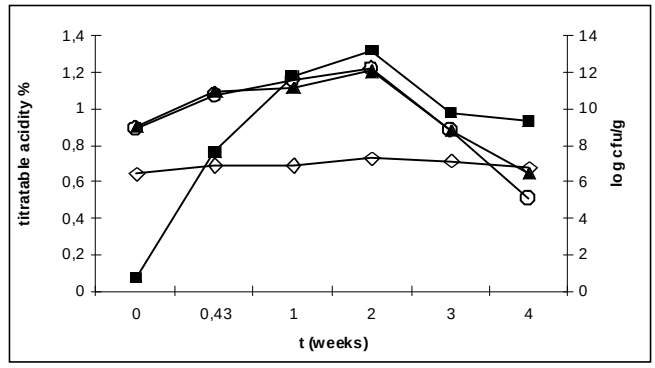


Fig. 5. TA (■, ◊) and growth (▲, ○) of L. casei in freeze-dried fermented soymilk stored at 25^{0}C; (■, ▲) samples without sorbitol; (◊, ○) samples with sorbitol.

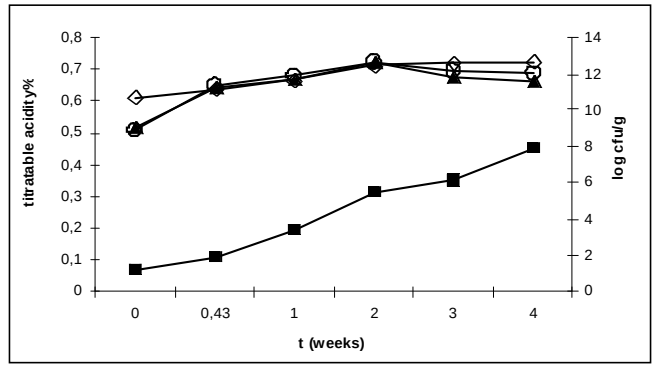


Fig. 6. TA (■, ◊) and growth (▲, ○) of L. casei in freeze-dried fermented soymilk stored at 4^{0}C; (■, ▲) samples without sorbitol; (◊, ○) samples with sorbitol.

Literature data (37) point out the factors affecting bacterial growth, including intrinsic factors, drying medium, storage and rehydration conditions, emphasizing the storage and rehydration temperature the most important. At low temperatures, bacterial metabolism is expected to decrease, including toxins' synthesis and resulting in increased viability. In order to determine the influence of drying medium, including sor-

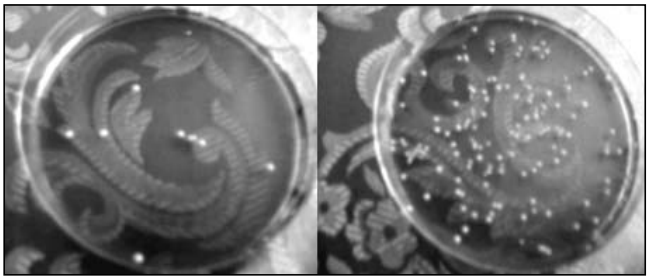


Fig. 7. Cell populations of *L. casei* in fermented dried soymilk estimated by the plate dilution method using MRS agar; (a) stored at 25^0C and (b) stored at 4^0C.

bitol and storage temperature on probiotic growth, bacterial enumeration was performed in regular time intervals (the 1st and the 3rd day and once weekly during 5 weeks).

The presence of sorbitol increased viability of *L. casei* during freeze-drying and storage at both storage temperatures applied in the study. The maximum population was reached the second week, which can be considered as a period of exponential bacterial growth (52). During this period, the number of cfu/ml in the freeze-dried fermented soymilk with sorbitol increased to 1.57×10^{12} cfu/ml when stored at 25ºC and to 4.83×10^{12} cfu/ml when stored at 4ºC, while in the samples without sorbitol the population number increased to 1.08×10^{12} cfu/ml and 4.5×10^{12} cfu/ml, respectively (Fig. 2-3; 5-6). In the next step of the study, no stationary phase of probiotic growth was observed in the samples stored at 25ºC with and without sorbitol. Namely, constant decrease in the population level was observed; thus, at the end of the study the population level was 1.35×10^5 and 2.7×10^6 cfu/ml in the samples without and with sorbitol, respectively. Considering the probiotic growth in the samples stored at 4ºC, a prolonged stationary phase was observed by the end of the study when the population number was 3.82×10^{11} cfu/ml and 1.12×10^{12} cfu/ml in the samples without and with sorbitol, respectively.

In order to determine the dominant factor affecting probiotic growth, two-factorial analysis of variance was applied to analyse data obtained from the viability examination studies. The statistical analysis confirmed that storage temperature dominantly influenced on the viability of *L. casei* in both samples with and without sorbitol ($p < 0,05$). The critical value of F for testing the dominant influence was 4.35, while the test statistic values of the variance ratio were 5.76, 0.81 and 0.10, respectively for the temperature, sorbitol and the interaction between process variables.

3.3.2. Rehydration studies

Rehydration is an important step in the recovery of probiotic from dried diary products. An organism which survives various steps, such as freezing, drying and storage may lose its viability during rehydration. Poor recovery of cells may be attributed to inadequate rehydration procedure. Yuksekdag et al. (53) indicated that rehydration temperatures between 15ºC and 50ºC were the best for *L. casei*, with the temperature of 37ºC as the most convenient, while in the study of Prasad et al. (54), temperature of 45ºC and exposure of 30 min was evaluated as the best for *L. rhamnosus* HN001 (subtype of *L. casei*). On the other hand, several investigators have reported that rehydration at the refrigeration temperature may cause leakage of intracellular substances from the cells, thereby resulting in low viability (51).

Table 1. shows the effect of rehydration temperature on the recovery of *L. casei* from the dried fermented soymilk. The studies were performed in the second week when maximal probiotic growth was observed in the samples stored at 25ºC.

According to the results obtained one can conclude that there was higher recovery rate in the samples rehydrated at 45ºC, which can be considered as optimum rehydration temperature. These results confirm the positive effect of sorbitol on bacterial growth. Namely, at all rehydration temperatures studied, recovery was greater in the samples with sorbitol. The possible mechanisms underlying sorbitol protection of probiotic cells would be prevention of damage to the membrane via interaction therewith, prevention of lipid oxidation owing to its antioxidant properties, stabilisation of the protein structure, and hence preservation of functionality associated with formation of sorbitol-protein complexes (37).

3.3.3. Acid challenge

Results obtained for acid tolerance of *L. casei* in fermented soymilk are presented in Table 2. As one can see, the survival of *L. casei* was between 43.52 and 47.53% and it was higher in the samples with the sugar substrate in the growth medium with improvement in viability of approximately 1 log.

Results obtained for acid tolerance of *L. casei* in the freeze-dried soymilk after 1 week storage at 25ºC and 4ºC (Fig. 8) have revealed higher percents of survival in comparison with those in non-freeze dried soymilk samples with and without sorbitol. Namely, more than 65% of them survived this challenge with improvement in viability when sorbitol was added between 0.3 and 0.5 log depending on the storage temperature.

Conclusion

In conclusion, a stable probiotic diary product of dried fermented soymilk with *L. casei* was prepared in which the concentration of *L. casei* remained above therapeutic level of 10^7 during the investigated storage period of 5 weeks and after acid challenge. Adding sorbitol in the growth medium

Table 1. Effect of rehydration temperature on the recovery of *L. casei* from dried fermented soymilk.

Rehydration (°C)	Population of *L. casei* in dried fermented soymilk without sorbitol (cfu/ml)	Population of *L. casei* in dried fermented soymilk with sorbitol (cfu/ml)
25°C	1.08×10^{12}	1.57×10^{12}
45°C	6.07×10^{12}	7.56×10^{12}
90°C	9.00×10^{5}	1.73×10^{6}

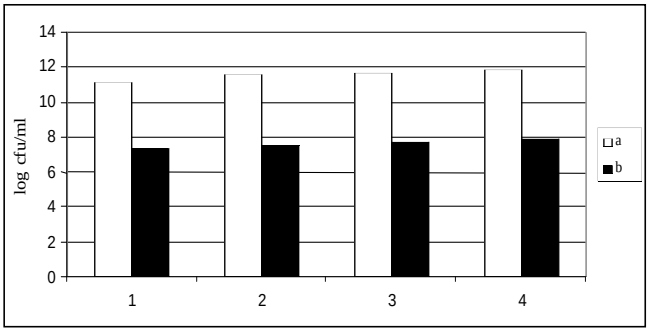


Fig. 8. Viability of L. casei in fermented freeze-dried soymilk after 1 week storage at 25^0C (1: without and 2: with sorbitol) and 4^0C (3: without and 4: with sorbitol); a: no acid challenged and b: acid challenged samples.

increased survival rate of *L. casei* during fermentation, freeze-drying, rehydration and storage, and it significantly improved the protection of bacterial cells from acid stress injury. A higher percent of survival was also noted for *L. casei* when the dried fermented soymilk was stored at 4°C than at 25°C. In order to administer higher therapeutic level of probiotic cells to, a rehydration temperature of 45°C is recommended.

Table 2. Acid tolerance of *L. casei* in fermented soymilk.

Sample	Viability of *L. casei* in acid non-challenged sample (cfu/ml)	Viability of *L. casei* in acid challenged sample (cfu/ml)
Fermented soymilk	9.7×10^{19}	5.0×10^{8}
Fermented soymilk with sorbitol	1.7×10^{20}	4.1×10^{9}

References

1. P. McCue and K. Shetty, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **44**, 361-367 (2004).
2. D. O. Otieno, H. Rose and N. P. Shah, *Food Chem.*, **105**, 1642-1651 (2006).
3. D. O. Otieno, J. F. Ashton and N. P. Shah, *Int. J. Food Microbiol.*, **115**, 79-88 (2007).
4. G. Rimbach, C. Boesch-Saadatmandi, J. Frank, D. Fuchs, U. Weenzel, H. Daqniel, W. L. Hall and P. D. Weinberg, *Food and Chem. Toxicol.*, in press, (2007).
5. T. L. Dog, *Am. J. Med.*, **118**, 98-108 (2005) .
6. K. L. Fritz, C. M. Seppanen, M. S. Kurzer and A. S. Csallany, *Nutr. Res.*, **23**, 479-487 (2003).
7. Y-C. Wang, R. C. Yu and C. C. Chou, *Food Microbiol.*, **23**, 128-135 (2006).
8. J-S. Lee, *Life Sci.*, **79**, 1578-1584 (2006).
9. J. Cho, S. Ahn, J. Lee, W. Lee and K. Park, *Eur. J. Pain*, **10**, S60 (2006).
10. F-H. Liao, M-J. Shieh, S-C. Yang, S-H. Lin and Y-W. Chien, *Nutrition*, **23**, 551-556 (2007).
11. M. F. McCarty, *Med. Hypotheses*, **66**, 1093-1114 (2006).
12. R. H. Knopp, R. Superko, M. Davidson, W. Insull, C. A. Dujovne, P. O. Kwiterovich, J.H. Zavoral, K. Graham, R. R. O`Connor and D. A. Edelman, *Am. J Prev. Med.* **17**, 18-23 (1999).
13. Y-C. Wang, R. C. Yu and C. C. Chou, *Food Microbiol.*, **19**, 501-508 (2002).
14. Y-C. Wang, R. C. Yu, H. Y. Yang and C. C. Chou, *Food Microbiol.*, **20**, 333-338 (2003).
15. M. M. Brashears, D. Jaroni and J. Trimble, *J. Food. Prot.*, **66**, 355-363 (2003).
16. E. B. Minelli, A. Benini, M. Marzotto, A. Sbarbati, O. Ruzzenente, R. Ferrario, H. Hendriks and F. Dellaglio, *Int. Diary J.*, **14**, 723-736 (2004).
17. J. M. T. Hamilton-Miller, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **22**, 360-366 (2003).
18. W-H. Lin, C-F. Hwang, L-W. Chen and H-Y. Tsen, *Food Microbiol.*, 23, 74-81 (2006).
19. O. N. Donkor, A. Henriksson, T. K. Singh, T. Vasiljevic and N. P. Shah, *Int. Diary J., in press*, (2007).
20. G. E. Perdigon, E. Vintini, S. Alvarez, M. Medina and M. Medici, *J. Diary Sci.*, **82**, 1108-1114 (1999).
21. C. A. Pedone, E. P. Arnaud, E. R. Postaire, C. F. Bouley and P. Reinert, *Int. J. Clin. Prot.*, **54**, 568-571 (2000).
22. H. Szajewska, M. Kotovska, J. Z. Mrukwicz, M. Armanska and W. Mikolajczyk, *J. Pediatr.*, **138**, 361-365 (2001).
23. R. Oozer, N. G. Fenillerat, A. Alpert, M. van de Guchte, J. Auba, J. Mengand and G. Gorthier, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3570-3574 (2002).
24. A. Sullivan and C. E. Nord. *J. Int. Med.*, **257**, 78-92 (2005).
25. V. O. Oyetayo, F. C. Adetuyi and F. A. Akinyosoye, *Af. J. Biotechnol.*, **2**, 448-452 (2003).
26. N. M. de Roos and M. B. Katan, *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 405-411 (2000).
27. T. Asahara, *Antimicr. Agents Chemother.*, **45**, 1751-1760 (2001).
28. D. Sgouras, P. Maragkoudakis, K. Petraki, B. Martinez-Gonzales, E. Erioton, S. Michopoulos, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidon and A. Mentis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 518-526 (2004).
29. C. Dunne, L. O`Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O`Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O`Sullivan, F. Shanahan and J. K. Collins, *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 386-392 (2001).
30. B. Barcena, A. L. Ragout and P. R. Cordoba, *Appl. Microbiol. Biotehnol.*, **51**, 316-324 (1999).
31. M-T. Tien, S. E. Girardin, B. Regnault, L. Le Bourhis, M-A. Dillies, J-Y. Coppee, R-B. Sicard, P. J. Sansonetti and T. Pedron, *J. Immunol.*, **176,** 1228-1237 (2006).
32. K. Adhikari, A. Mustapha, J. U. Grun and L. Fernando, *J. Diary Sci.*, **83**, 1946-1951 (2000).

33. A. Lorens-Hattingh and C. B. Viljeon, *Int. Diary J.*, **11**, 1-17 (2001).
34. N. P. Shah, in Encyclopedia of Diary Science, Academic press, London, 2002, pp 147-151.
35. A. Talwalkar and K. Kailasapathy, *Compreh. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **3**, 117-124 (2004).
36. P. Capela, T. K. C. Hay and N. P. Shah, *Food Res. Int.*, **39**, 203-211 (2006)
37. A. S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata and P. Gibbs, *Int. Diary J.*, **14**, 835-847 (2004).
38. T. D. Klingberg and B. B. Budde, *Int. J. Food. Microbiol.*, **109**, 157-159 (2006).
39. A. K. Anal and H. Singh, *Trends Food Sci & Technol.*, **18**, 240-251 (2007).
40. G. Zarate and M. A. Nader-Macias, *Proc. Biochem.*, **41**, 1779-1785 (2006).
41. A. S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata and P. Gibbs, *Biotechnol. Lett.*, **24**, 1587-1591 (2002).
42. A. S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata and P. Gibbs, *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 947-952 (2003a).
43. A. S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata and P. Gibbs, *Int. Diary J.*, **13**, 463-468 (2003b).
44. A. S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata and P. Gibbs, *Le Lait*, **83**, 203-210 (2003c).
45. G. De Castro, H. Bredholt, A. R. Strom and A. Tunnacliffe, Appl. Environ. Microbiol., 66, 4142-4144 (2000).
46. AOAC. Official Methods of Analysis 14th Ed. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists, 1984.
47. Leverrier, Y. Fremont, A. Rouault, P. Boyaval and G. Jan, *Food Microbiol.*, **22**, 11-18 (2005).
48. M-Y. Ha, S-W. Kim, Y-W. Lee and S-J. Kim, *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 134-140 (2003).
49. W. D. Wayne, Biostatistics: A foundation for analysis in the health sciences, 5th Ed., John Wiley&Sons, Inc, 1987, pp 310-327.
50. G. F. de Valdez, G. S. De Giori, A. P. De Ruiz Holgado and G. Oliver, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 413-415 (1985).
51. Y-C. Wang, R. C. Yu and C. C. Chou, *Int. J. Food Microbiol.*, **93**, 209-217 (2004).
52. K. Todar, Growth of bacterial population, Todar's Online Textbook of Bacteriology, (2002).
53. Z. N. Yuksekdag, Y. Beyath and B. Aslim, *Nahrung/Food*, **48**, 218-220 (2004).
54. J. Prasad, P. McJarrow and P. Gopal, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 917-925 (2003).

Резиме

Виталност на *L. casei* при ферментација во млеко од соја и во млеко од соја во прав; влијание на крипротектантот, рехидратацијата и температурата на чување

Лела Ацевска[1], Кристина Младеновска[2], Тања Петреска Ивановска[1], Маја Јурхар Павлова[3], Милена Петровска[3], Ангела Делова[4], Лидија Петрушевска Този[1*]

[1]Катедра за храна и исхрана и [2]Катедра за биофармација, Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000, Скопје;
[3]Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Водњанска 19, 1000 Скопје, Универзитет "Св. Кирил и Методи", Скопје; Македонија;
[4]Институт за здравствена заштита, Партизанска бб., 7000 Битола, Македонија

***Клучни зборови**: L. casei*, ферментирано соја млеко, лиофилизација, сорбитол, виталност

Подготвен е стабилен пробиотски прехрамбен производ на соја млеко во прав со *L. casei* во кој терапевтската концентрација на пробиотикот опстојува над терапевтското ниво од 10^7 cfu/ml. Испитувана е виталноста на *L. casei* и ефектот на сорбитол при ферментација на млекото од соја. На крајот од ферментацијата која се одвиваше 72 часа на температура од 25°C одредени се pH вредноста и титрациската киселост на млекото од соја и тие изнесуваа приближно 3.41 и 0.760%. Млекото од соја го поддржува растот на *L. casei* со подобрување на виталноста од 0.24 log на крајот од ферментацијата кога во медиумот е додаден сорбитол. Испитуван е и ефектот на сорбитол врз подобрувањето на виталноста во текот на сушењето со лиофилизација, рехидратацијата и при чувањето во период од 5 недели под различни температурни услови. По сушењето, процентот на преживување на *L. casei* изнесува 46%. Сорбитолот ја подобрува виталноста на *L. casei* за 0.51 log веднаш по сушењето и за 1.30 log, односно 0.47 log на крајот од 5-неделниот период кога се чува на 25°C, односно 4°C. Млекото од соја во прав, рехидрирано на 45°C, е оптимално за размножување на *L. casei* со подобрување во виталноста од 0.68 log кога во млекото е додаден сорбитол. Забележан е повисок процент на преживување на *L. casei* кога млекото од соја во прав се чува на температура од 4°C во однос на 25°C, со подобрување на виталноста од 6 log на крајот од 5 неделниот период на чување на примероците со и без сорбитол. Ферментираното млеко од соја во прав со сорбитол обезбедува висока толерантност на *L. casei* во симулирани услови на желудник со одржување на терапевтската концентрација над 10^7 cfu/ml.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 25-32 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 615.27:616.61-097.3

Стручен труд

Ефекти на амифостин во превенција на нефротоксичност индуцирана со цисплатин кај стаорци

Димче Зафиров[1], Јасмина Тројачанец[1], Маја Сланинка Мицеска[1], Круме Јаќовски[1], Драгица Зенделовска[1], Валентина Коловска[2], Петар Милошевски[1], Стојмир Петров[1]

[1]*Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Р. Македонија*
[2]*Институт за Клиничка Биохемија, Клинички Центар, Медицински Факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Р. Македонија*

Примен април 2006, прифатен јуни 2006

Апстаркт

Амифостин е релативно нов органски цитопротективен лек, кој всушност претставува пролек, наменет за намалување на кумулативната ренална токсичност индуцирана од повторувана администрација на цисплатин. Механизмот на нефропротективното дејство на амифостин не е комплетно разјаснет, но се смета дека лекот поседува директно цитопротективно дејство на бубрежните тубули.

Основната цел на оваа студија беше да се утврди ефектот на амифостин во превенцијата на нефротоксичност експериментално индуцирана со долготрајна администрација на цисплатин во доза од 2 mg/kg/t.t./недела во тек на 8 недели.

Добиените резултати од оваа студија покажуваат дека амифостин, иако не комплетно, во голема мера ја редуцира нефротоксичноста индуцирана со долготрајна администрација на цисплатин.

Клучни зборови: амифостин, цисплатин, нефротоксичност, стаорци.

Вовед

Нефротоксичноста е едно од најчестите несакани дејства на одредени антинеопластични лекови и лимитирачки фактор за нивна употреба. Клиничката манифестација на нефротоксичноста на поедини анти неопластични лекови се разликува во зависност од тоа со кои антинеопластични лекови (или групи на лекови) е индуцирана, поради што и пристапот и изборот на лекови кои се користат во превенција и терапија на нефротоксичноста е различен (1, 2).

Досегашната клиничка пракса и големиот број на изведени претклинички и клинички студии покажуваат дека од посебно значење (лимитирачки фактор за манифестација на комплетен тераписки ефект) е нефротоксичноста која се јавува кај антинеопластичните лекови на база на платина, кои се карактеризираат со висок нефротоксичен потенцијал. Како прототип на препарат на база на платина се смета цисплатин, кој воедно е и прв лек од оваа група на лекови кој е откриен и воведен во клиничката пракса. За нив е карактеристична појавата на дозно-зависна ренална дисфункција со појава на зголемно серумско ниво на креатинин и уремија, електролитни абнормалности како што се хипомагнеземија и хипокалиемија, а поретко е регистрирана и појава на хемолитички уремичен синдром (3, 4).

Со оглед на терапиското значење на препаратите на платина како антинеопластични лекови (а особено на цисплатин), последните десетина

*Димче Зафиров
e-mail: pharma@mt.net.mk
Тел. 02 11 18 28; 02 16 59 66; Факс. 02 11 18 28

години претставуваат години на барање и изнаоѓање на стратегии и лекови или супстанции кои би делувале нефропротективно, односно би ги заштитиле бубрезите од нефротоксичното дејство на цисплатин, а воедно не би ја намалиле неговата антитуморска активност. Податокот што за оваа намена се испитувани голем број лекови и супстанции, јасно покажува дека за сега не е пронајден "идеален" нефропротектив, кој комплетно или во голема мера би ги заштитил бубрезите од нефротоксичните ефекти на цисплатин (толеранција на полни тераписки дози без ренални компликации и толеранција на пократки интервали на дозирање), а истовремено да не ја намали неговата цитотоксична активност во однос на малигните клетки.

Генерално, постојат три групи на лекови и супстанци кои би можеле да бидат ефикасни во превенцијата на нефротоксичност индуцирана од препарати на база на платина, а особено индуцирана од цисплатин. Од нив некои се веќе воведени во клиничката пракса, некои се наоѓаат во фаза на интензивни испитувања, а некои се на самиот почеток на истражување или се уште не е започнато со нивно истражување.

Првата група на лекови е претставена со антиоксидансите, втората група на лекови е групата на цитопротективни лекови, а третата група на препарати е групата лекови и супстанци кои може да делуваат инхибиторно на апоптозата која е индуцирана од цисплатин и да делуваат како фактори на раст, односно да ја стимулираат регенерацијата на оштетените клетки.

Амифостин е релативно нов органски цитопротективен лек, кој всушност претставува пролек, кој во ткивата под дејство на алкалната фосфатаза се дефосфорилира во неговиот фармаколошки активен сулфхидрилен метаболит. Наменет е за намалување на реналната токсичност индуцирана од цисплатин (5, 6, 7).

Механизмот на нефропротективното дејство на амифостин не е комплетно разјаснет, но се смета дека лекот поседува директно цитопротективно дејство на бубрежните тубули и дека селективно ги заштитува нормалните ткива од антинеопластичната токсичност на цисплатин (8, 9, 10).

Резултатите од претклиничките експериментални студии спроведени кај разни животински видови, како и до сега изведените клинички студии, покажуваат дека амифостин во голема мера истата ја намалува.

Во акутните студии, во кои е евалуирана ефикасноста на амифостин во превенцијата на нефротоксичност индуцирана од цисплатин, амифостин главно е применуван парентерално, во доза од 25 mg/kg/t.t која е приближно еднакви на препорачаната хумана тераписка доза на амифостин (910 mg/m^2 телесна површина) или во повисока доза од 200 mg /kg, и тоа обично 30 минути пред апликацијата на цисплатин (8, 10, 11, 12).

Во достапната литература се среќаваат само оскудни податоци за неговата ефикасност како нефропротектор при хронична администрација на цисплатин, односно има малку податоци за неговата ефикасност при хронична експозиција на цисплатин. Основните цели на оваа студија беа да се утврдат ефектите на амифостин во превенцијата на нефротоксичноста експериментално индуцирана со долготрајна администрација на цисплатин во доза од 2 mg/kg/t.t./недела во тек на 8 недели.

Експериментален дел

Лекови: Во текот на студијата беа користени следните лекови: Cisplatin (CP) - Bristol Myers Squib и Amifostine (ETHYOL®)- Schering-Plough.

Експериментални животни: За изведување на експериментите кои беа предвидиени во ова испитување беа користени 75 машки и женски нормотензивни стаорци од сојот Wistar, на возраст од 9-11 недели, со телесна тежина од 200-300 g. Стаорците се добиени по пат на размножување во штала на Институтот за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија.

Експериментални протоколи: За да се одговори на поставените цели, стаорците беа поделени во 3 групи од по 25 животни. За да се евалуира нефротоксичното дејство на цисплатин (CP) при негова долготрајна администрација, кај првата група стаорци интраперитонеално беше администриран Cisplatin во доза од 2 mg/kg/t.t., еднаш неделно, во тек на 8 недели. За да се евалуираат ефектите на Amifostine во превенцијата на нефротоксичност индуцирана од хемотерапија во која е вклучен препарат на платина, кај втората група стаорци истовремено со почетокот на третманот со Cisplatin (во истата доза како и во претходниот протокол) се започна со превентивна апликација на Amifostine (AMI) во доза од 200 mg/kg/t.t., после негова реконституција во физиолошки раствор, 30 минути пред секоја администрацијата на цисплатин. Третата група, која исто така броеше 25 ста-

орци, претставуваше контролна група и експерименталните животни од оваа група примаа физиолошки раствор во исти количини и временски интервали како и групите животни кои ги примаа испитуваните лекови.

Мерења и анализи: во текот на испитувањето беа извршени следните мерења и анализи: биохемиска анализа на крвта од стаорците, која вклучуваше одредување на концентрацијата на серумски креатинин и уреа и плазматски концентрации на MDA (Malondialdehyde); анализи на урина кои вклучуваа одредување на диурезата, вкупни протеини во урина; како и следење на телесната тежина и општата сотојба на животните. Сите овие мерења и анализи кај испитуваните животни се изведуваа пред почетокот на испитувањето (0-ден), после 2, 4, 6 и 8 недели од почетокот на испитувањето.

За одредување на плазматските концентрации на MDA беше користена HPLC метода по Fukunaga K. (13) со тиобарбитурна киселина со флуоресцентна детекција.

Земање на примероци на крв: крвта од стаорците беше земана од орбиталниот синус на стаорците, во лесна етерска анестезија, со венепункција, при што беа земани примероци на крв (по 400 ml) за издвојување на 200 ml серум/плазма, потребен за биохемиски анализи.

Собирање на урина: за анализа на уринатa беа користени примероци од 24-часовна урина кај стаорците, со користење на метаболни кафези.

Статистичка обработка: од дескриптивна статистика беа користени мерките на централна тенденција и варијабилитет (средна вредност, стандардна девијација). Разликите помеѓу одредени временски точки, како и разликите помеѓу групите беа анализирани со Sudent-ov “t test” за зависни односно независни примероци и непараметриските тестови Mann-Whitney U-test, Wilcoxon-ов тест и Kruskal-Wallis ANOVA. Како сигнификантно значајни беа земени разликите за $p < 0.05$.

Резултати и дискусија

Во нашата студија долготрајната администрација на цисплатин резултираше со јасно изразени функционални бубрежни пореметувања и лоша општа состојба. Првите знаци и симптоми на функционали бубрежни пореметувања беа регистрирани после 4 неделен третман со цисплатин, односно вкупна кумулативна доза на цисплатин од 8 mg/kg/t.t. Во понатамошниот тек од испитувањето, со зголемувањето на вкупна кумулативна доза на цисплатин до максимални 16 mg/kg/t.t., овие симптоми, како и параметрите за процена на општата состојба на испитуваните животни беа уште поизразени, со тенденција на понатамошно влошување. Претретманот со амифостин во доза од 200 mg/kg/t.t., применет 30 минути пред секоја администрација на цисплатин во голема мера ги намали симптомите и знаците за функционални бубрежни пореметувања и ги одржуваше животните во релативно добра општа состојба.

Во однос на морталитетот, во групата која примаше само цисплатин (CP), истиот изнесуваше 12% (3/25), додека во групата животни кои покрај цисплатин примаа и амифостин (CP+Ami), ниту едно животно не егзитираше.

Диуреза

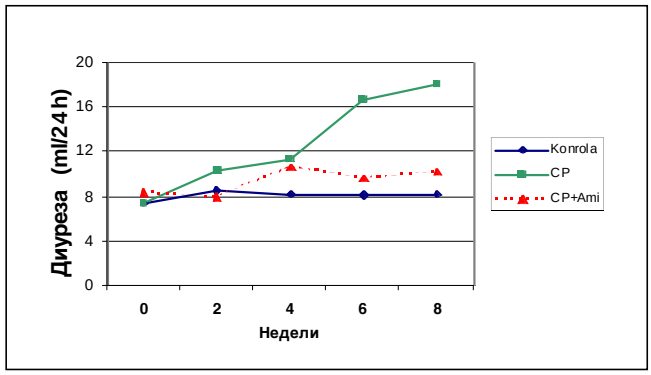
Диурезата, односно вкупната мокрача за 24 часа се користеше како еден од показателите на бубрежната функција и евентуалните оштетувања предизивкани од цисплатин кај експерименталните животни.

Во CD групата, сигнификантно ($p<0.05$) зголемување на вредностите на диурезата во однос на базалните вредности и контролната група, беше регистрирано после 4 недели третман со цисплатин, при што просечните вредности на диурезата од почетните 7.41 ml/24 h се зголемија на 11.29 ± 2.21 ml/24 h. Во понатамошниот тек од испитувањето, со зголемувањето на вкупната кумулативна доза на цисплатин, вредностите на диурезата уште повеќе се зголемија, при што на крајот од испитувањето истите изнесуваа 18.00 ± 3.51 ml/24 h (Сл. 1). Ваквите резултати несомнено укажуваат на пореметена бубрежна функција, како резултат на нефротоксичното дејство на цисплатин, кое е особено изразено во кортикомедуларната регија.

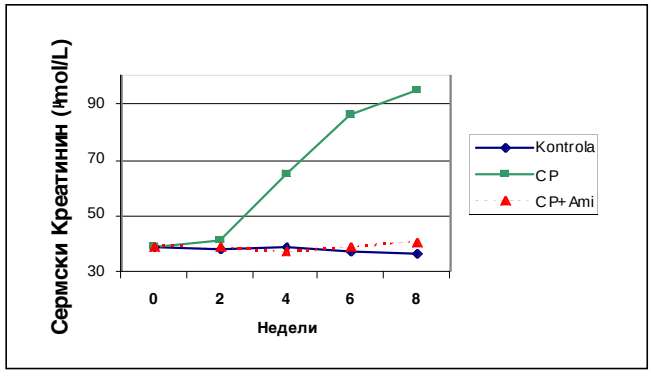
За разлика од тоа, кај групата животни кои покрај цисплатин примаа и амифостин (CP + Ami), беше регистрирано само лесно зголемување на просечните вредности на диурезата во однос на базалните вредности, при што на крајот од испитувањето истите изнесуваа 10.14 ± 1.35 ml/24 h, што е сигнификантно пониско во однос на CP групата (Сл. 1).

Серумски креатинин и уреа

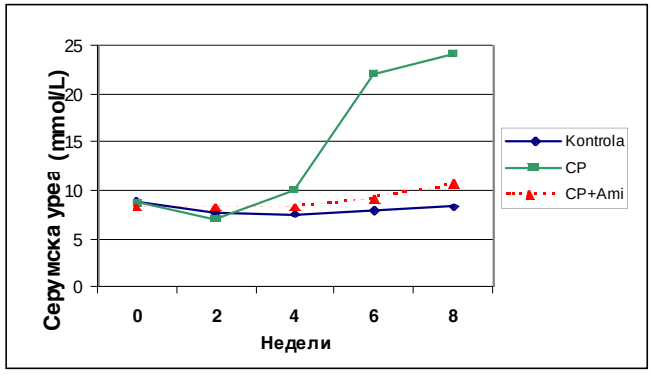
Вредностите на креатинин и уреа во серум се користеа како рутински маркери за процена на бубрежната функција кај стаорците.



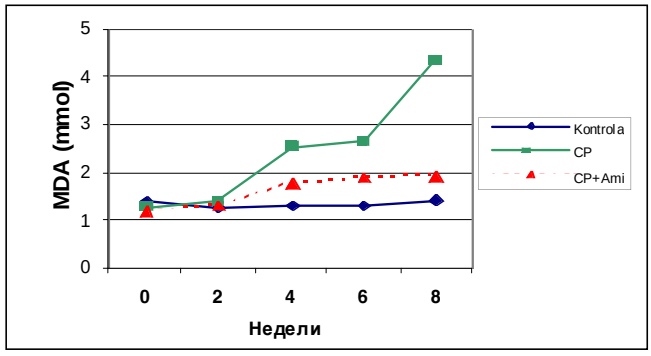
Сл. 1. Вредноста на диуреза (24-часовна урина) во текот на испитувањето кај стаорците (ml/24h)



Сл. 2. Вредности на креатинин во серум концентрации на креатинин (mmol/L)



Сл. 3. Вредности на уреа во серум кај стаорците во текот на испитувањето (mmol/L



Сл. 4. Вредности на MDA во плазма кај стаорците во текот на испитувањето (nmol/L

Долготрајната администрација на цисплатин кај CP групата предизвика зголемување на нивото на креатинин и серум, кое на крајот од испитувањето беше повеќе од два пати повисоко во однос на базалните вредности и контролната група. Првото зголемување на вредностите на серумски креатинин и уреа беше регистрирано после 4 недели третман со цисплатин, при што истите изнесуваа 64.75 ± 8.88 mmol/L (креатинин), односно 10.04 ± 1.53 mmol/L (уреа), што е сигнификантно ($p<0.05$) повисоко во однос на контролната група (креатинин = 38.55 ± 2.68 mmol/L; уреа = 7.58 ± 1.39 mmol/L) и базалните вредности. На крајот од испитувањето вредностите на овие 2 рутински параметри за процена на бубрежната функција уште повеќе се зголемија, при што истите изнесуваа 95.0 ± 23.15 mmol/L (креатинин), односно 24.26 ± 10.72 mmol/L (уреа) (Сл. 2 и 3).

Претретманот со амифостин, (како резултат на неговите нефропротекивни совојства) се покажа ефикасен, превенирајќи клинички значајно зголемување на вредностите на овие два параметри. Во текот на целото испитување, вредностите на серумски креатинин останаа во рамките на нормалните вредности, без сигнификантни разлики во однос на базалните вредности и контролната група, при што на крајот од испитувањето изнесуваа 40.33 ± 4.67 mmol/L. Во однос пак на вредностите на уреа во серум, единствено на крајот од испитувањето беше регистрирано нивно благо зголемување, при што истите изнесуваа 10.65 ± 3.15 mmol/L, што е сигнификантно ($p<0.01$) пониско во однос на групата која примаше само цисплатин (CP) (Сл. 2 и 3).

Плазматски концентрации на MDA (Malondialdehyde)

Одредувањето на плазматските концентрации на MDA се користеше како специфичен маркер за процена на бубрежни оштетувања.

Добиените резултати покажуваат дека цисплатин доведува до значајно зголемување на плазматските вредности на MDA. Од почетните 1.26 ± 0.28 nmol/L, плазматските вредности на MDA после 4 недели сигнификантно ($p<0.05$) се зголемија за приближно два пати и изнесуваа 2.55 nmol/L. Во понатамошниот тек од испитувањето вредностите на MDA уште повеќе се зголемија, при што на крајот од испитувањето изнесуваа 4.33 ± 1.19 nmol/ L ($p<0.01$).

Кај CP+Ami групата, исто така беше регистрирано сигнификантно ($P<0.05$) зголемување на вредностите на MDA во плазма после четири (1.77 ± 0.75 nmol/L),

односно осум (1.193 ± 0.33 nmol/L) недели, но беше многу помалку изразено во однос на групата која примаше само цисплатин ($p<0.01$) (Сл. 4).

Процентуално изразено, во групата животни кои беа третирани само со цисплатин (CP) на крајот од испитувањето плазматските вредности на MDA во однос на базалните вредности беа зголемени за 243.6%, а во групата која примаше цисплатин и амифостин ова зголемување изнесуваше 59.5% ($p<0.01$) (Сл. 5).

Вкупни протеини во урина

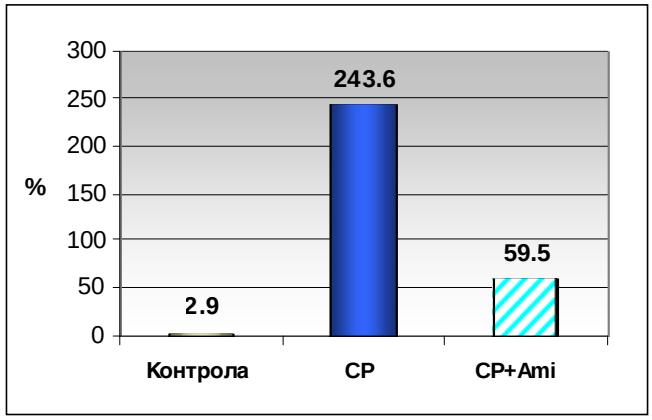
Одредувањето на вкупните протеини во урина е последниот параметар кој го користевме во оваа студија за процена бубрежната функција кај испитуваните животни. Како и во однос на останатите, претходно опишани параметри за процена на бубрежната функција и во однос на овој параметар цисплатин кај CP групата манифестираше јасно изразени бубрежни пореметувања. Кај оваа група на животни евидентна беше протеинуријата, односно зголемени вредности на вкупни протеини во мокрача за 24 часа после 4 недели (12.0 ± 2.03 mg/24 h), уште по изразена по 6 недели (16.24 ± 3.20 mg/24 h), а максимално изразена на крајот од испитувањето по 8 недели, кога вредностите на вкупни протеини во мокрача за 24 часа беа за приближно два пати поголеми од базалните вредности и изнесуваа 18.45 ± 3.21 mg/24 h (Сл. 6).

Како и во однос на останатите параметри, така и во однос на овој параметар амифостин се покажа ефикасен, превенирајќи тешка протеинурија кај стаорците, при што лесно зголемување на вредностите на вкупни протеини во мокрачата беа регистрирани само на крајот од испитувањето, кога просечните врености изнесуваа 10.90 ± 1.42 mg/24 h, што е сигнификанто пониско ($p<0.01$) во однос на групата која примаше само цисплатин (Сл. 6).

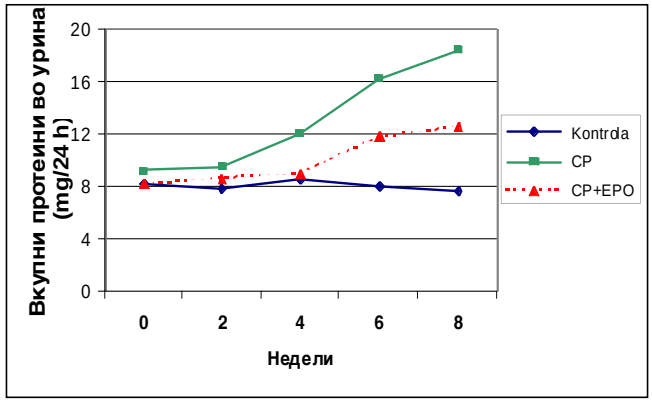
Параметри за процена на општата состојба

Кај групата стаорци кои примаа само цисплатин евидентна беше лоша општа состојба, особено изразена преку стагнацијата во растот првите 4 недели и прогресивен губиток во телесната тежина во наредните 4 недели. На крајот од испитувањето, телесната тежина кај оваа група на животни беше намалена за 8% во однос на базалните вредности (Сл. 7).

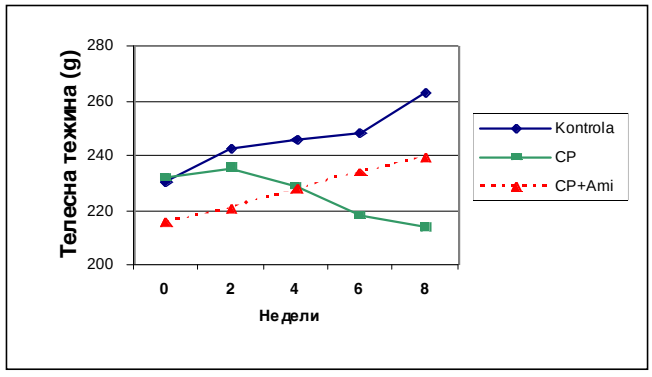
Спротивно на тоа, во групата животни кои покрај цисплатин примаа и амифостин, стагнацијата во растот на животните беше многу помалку изразена, при што на крајот од испитувањето кај оваа



Сл. 5. Процентуално зголемување на плазматските вредности на MDA кај стаорците на крајот од испитувањето во однос на базалните вредности



Сл. 6. Вкупни протеини во урина за 24 часа кај стаорците во текот на испитувањето (mg/24h)



Сл. 7. Вредности на телесна тежина кај стаорците во текот на испитувањето (g)

група на животни беше регистрирано зголемување на телесната тежина за 11.01% во однос на базалните вредности, што е помалку во однос на контролната група (14.0%), но сигнификано повеќе во однос на групата која примаше само цисплатин ($p<0.05$) (Сл. 7).

Во однос на останатите субјективни параметри за процена на општата состојба на испитуваните животни, во групата која примаше само цисплатин евидентна беше намалената моторна активност, намален внес на храна и седација кај животните веќе после втората недела од почетокот на испитувањето. Сите овие симптоми и знаци уште повеќе прогредираа во текот на испитувањето, со влошување на општата состојба на испитуваните животни.

Спротивно на ова, во групата животни кои покрај цисплатин примаа и амифостин сите овие симтоми беа многу помалку изразени или воопшто не беа присутни, што најверојатно се должи на превенцијата на токсичните ефекти на цисплатин од страна на амифостин.

Добиените резултати од оваа студија несомнено го потврдуваат токсичниот потенцијал на цисплатин, особено нефротоксичноста, која претставува дозно-лимитирачки фактор за клиничка употреба на овој мошне значаен антинеопластичен лек, поради високата инциденца на јавување и влијанието на морбидитетот и морталитетот на пациентите (14).

Како и во голем број на други студии (15) и во нашата студија се потврди податокот дека нефротоксичноста на цисплатин има кумулативен карактер, при што првите знаци за нефротоксичност беа регистрирани после 4 недели, односно при употреба на вкупна кумулативна доза на цисплатин од 8 mg/kg/t.t.

Механизмот на нефротоксичното дејство на цисплатин не е потполно разјаснет и е доста комплексен, во кој се вклучени како факторите од страна на самиот лек, пред се неговите фармаколошко-токсиколошки карактеристики (цитотоксичен и нефротоксичен потенцијал), фармакокинетски каркатеристики (особено дистрибуцијата и елиминацијата), така и факторите од страна бубрезите, како што е нивната вулнерабилност и сензитивност кон ефектите на цисплатин. Во последно време се поголем акцент се става и на активацијата на цисплатин во нефротоскин и на индукцијата на апоптозата од страна на цисплатин, како можни механизми на нефротоксично дејство на цисплатин.

Во оваа студија, употребата на амифостин како нефропротектив се покажа ефикасна и во превенцијата на нефротоксичност при долготрајна експозиција на цисплатин. Претретманот со амифостин во доза од 200 mg/kg/t.t. пред секоја администрација на цисплатин, иако комплетно не ја превенираше неговата нефротоксичност, доведе до сигнификантно намалување на нејзината тежина, изразена преку подобрување на сите параметри кои се користеа како показатели за процена на бубрежната функцијата (серумски креатинин и уреа, диуреза, вкупни протеини во мокрача). Освен тоа, амифостин имаше и значајно влијание и на преживувањето на животните, сигнификантно намалувајќи го морталитетот на испитуваните животни. Со тоа се зголеми толерабилноста на експерименталните животни кон повисока вкупна кумулативна доза на цисплатин, што е значајно за клиничката пракса, каде е потребна примена на цисплатин во повеќекратни циклуси.

Механизмот на нефропротективното дејство на амифостин не е комплетно разјаснет, но се смета дека лекот поседува директно цитопротективно дејство на бубрежните тубули и дека селективно ги заштитува нормалните ткива од антинеопластичната токсичност на цисплатин преку отстранување на слободните радикали, доставување на водородни јони на слободните радикали, намалувањето на оксигенацијата и врзувањето на дериватите на антинеопластичните лекови (7, 8, 9).

Одредувањето на плазматските концентрации на MDA се користеше како специфичен маркер за процена на бубрежни оштетувања, преку одредување на степенот на липидната пероксидација, односно евентуалното дејство на испитуваните лекови на инхибицијата на слободните радикали.

Добиените резултати во однос на плазматските вредности на MDA и во оваа студија несомнено покажуваат дека дека амифостин го превенира зголемувањето на плазматските вредности на MDA, односно го намалува степенот на липидна пероксидација, што всушност претставува и еден од неговите механизми на дејство. Ваквите наоди се во согласност со резултатите од повеќе студии во кои е најдено дека цисплатин предизвикува разни токсични ефекти на реналните антиоксиданси и липидната пероксидација (MDA), преку зголемување на продукцијата на хидроксилни радикали, што резултира со деплеција на глутатионот (GSH) и оштетување на активноста на супероксид дизмутазата (SOD), каталазата (CAT) и глутатион пероксидазата (GSH-Px) (10, 16).

Заклучок

Добиените резултати од оваа студија несомнено го потврдуваат токсичниот потенцијал на цисплатин, особено нефротоксичноста, која претставува дозно-лимитирачки фактор за клиничка употреба на овој мошне значаен антинеопластичен лек, поради високата инциденца на јавување и влијанието на морбидитетот и морталитетот на пациентите.

Примената на амифостин како нефропротектив се покажа ефикасна и во превенцијата на нефротоксичност при долготрајна експозиција на цисплатин. Амифостин иако комплетно не ја превенираше нефротоксичност на цисплатин, доведе до сигнификантно намалување на нејзината тежина, изразена преку подобрување на сите параметри кои се користеа како показатели за процена на бубрежната функција. Освен тоа, амифостин имаше и значајно влијание и на преживувањето на животните, сигнификантно намалувајќи го морталитетот на испитуваните животни. Како резултат на цитопротективното дејство на амифостин се зголеми толерабилноста на експерименталните животни кон повисока вкупна кумулативна доза на цисплатин, што е значајно за клиничката пракса, каде е потребна примена на цисплатин во повеќекратни циклуси.

Литература

1. K.B. Meyer, N.E. Madias, *Miner Electrolyte Metab*., **20** (4),201-13 (1994)
2. P.E. Kintzel, *Drug Saf*., **24** (1),19-38 (2001).
3. G. Daugaard, *Dan Med Bull*., **37** (1),1-12 (1990).
4. M. Lynn, M.D. Schuchter, *Oncology*., **11**, No 4 (1997)
5. C. Nieder, N.H. Andratschke, N. Wiedenmann, M. Molls, *Anticancer Res*., **24** (6),3803-9 (2004).
6. M.I. Koukourakis, *Anticancer Drugs*., B(3),181-209 (2002).
7. J.A. Foster-Nora, R. Siden, *Am J Health Syst Pharm*., **54** (7),787-800 (1997).
8. K.J. Weichert-Jacobsen, A. Bannowski, F. Kuppers, T. Loch, M. Stockle, *Cancer Res*., B (14),3451-3. 1999.
9. B. Brenner, L. Wasserman, E. Beery, J. Nordenberg, J. Schechter, H. Gutman, E. Fenig, *Oncol Rep*., **10** (5),1609-13 (2003).
10. Z. Bolaman, M.H. Koseoglu, S. Demir, H. Atalay, N. Akalin, I. Hatip, D. Aslan, *J Chemother*., **13** (3),337-9 (2001).
11. P. Bergstrom, A. Johnsson, T. Bergenheim, R. Henriksson, *J Neurooncol*., **42** (1),13-21 (1999).
12. R.L. Capizzi, W. Oster, *Int J Hematol*., **72** (4),425-35 (2000).
13. K. Fukunaga, M. Yoshida, N. Nakazono, *Biomed Chromatogr.,* **12** (5),300-3 (1998)
14. P.J. O'Dwyer, J. P. Stevenson, S.W. Johnson. In: Lippert B (ed) Cisplatin: *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. Wiley-VCH, Zurich, pp 29-70 (1999)
15. J.D. Blachley, J. B. Hill, Ann Intern Med., **95**,628-632 (1981)
16. K. Husain, C. Morris, C. Whitworth, G.L. Trammell, L.P. Rybak, S.M. Somani, *Mol Cell Biochem*,**178**,127–133 (1998).

Summary

Effects of amifostin in prevention of cisplatin induced nephrotoxicity in rats

Dimce Zafirov[1], Jasmina Trojacanec[1], Maja Slaninka-Miceska[1], Krume Jakovski[1], Dragica Zendelovska[1], Valentina Kolovska[2], Petar Milosevski[1], Stojmir Petrov[1]

[1]Department of preclinical and clinical pharmacology and toxicology, Medical faculty; "Ss Cyril and Methodius", 50 Divizija b.b., 1000 Skopje, Macedonia.
[2]Department of Clinical Biochemistry Clinical Centre, Medical faculty; "Ss Cyril and Methodius", 50 Divizija b.b., 1000 Skopje, Macedonia.

Key words: amifostine, cisplatin, nephrotoxicity, rats.

Amifostine is a relatively new organic cytoprotective drug that is actually a prodrug aimed at reduction of cumulative renal toxicity induced by cisplatin repeated administration. The mechanism of amifostin nephroprotective effects has still not been clarified, but it is considered that this medicine has direct cytoprotective effect on kidney tubuli.

The main aim of this study was to reveal the effect of amifostin in prevention of nephrotoxicity induced experimentally with long-term administration of cysplatin at dose of 2 mg/kg/b.w./per week during a period of 8 weeks.

The results obtained have shown that amifostin, although not completely, but largely reduces nephrotoxicity induced with long-term administration of cisplatin.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 33-40 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 615.22:[616.379-008.64-06:616.61

Стручен труд

Ефектите на простациклин во третманот на дијабетичната нефропатија кај стаорци

Јасмина Тројачанец[1], Димче Зафиров[1], Никола Лабачевски[1], Трајан Балканов[1], Игор Кикерков[1], Валентина Коловска[2], Светлана Цековска[3], Стојмир Петров[1]

[1]Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј„
[2]Институт за Клиничка биохемија, Клинички Центар, ЈЗУ УКЦ - Скопје
[3]Институт за Медицинска и експериментална биохемија, Медицински Факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј„

Примен март 2006, прифатен јуни 2006,

Апстракт

Микроваскуларните компликации, а пред се дијабетичната нефропатија, се едни од најтешките компликации на дијабетот, од кои во голема мера зависи и прогнозата на дијабетот кај овие пациенти. Етиопатогенезата на оваа компликација е мултифакторијална и за сега се уште не комплетно расветлена, а вклучува морфолошки, патолошко-анатомски и биохемиски метаболни нарушувања. Се смета дека нарушувањето на модуларната функција на ендотелиумот може да биде критичен и иницијален фактор во развојот на дијабетичните васкуларни компликации. Врз основа на фармакодинамските ефекти кои што ги поседува простациклинот (PGI_2) и неговите аналози, се смета дека истите може да бидат корисни во третманот на дијабетичната нефропатија.

Основна цел на оваа студија беше да се проценат ефектите на простациклин (PGI_2) во третманот на дијабетичната нефропатија, експериментално предизвикана со стрептозоцин.

Кај нормотензивни стаорци од сојот Wistar, експериментално беше индуциран најпрвин дијабет со еднократна i.p. администрација на стрептозоцин (STZ), а како компликација на дијабетот и јасни знаци и симптоми на дијабетична нефропатија (протеинурија, зголемено серумско ниво на уреа и креатинин, полиурија, зголемена активност на NAG во мочката). Третман со простациклин (p.o.) во доза од 0.1 mg/kg /t.t./ден, во текот на 4 недели, доведе до сигнификантно намалување на симптомите и знаците на бубрежните оштетувања, во однос на групата животни кои не примаа простациклин.

Врз основа на добиените резултати може да се заклучи дека простациклинот може да има значајна улога во третманот на дијабетичната нефропатија, експериментално индуцирана со стрептозоцин.

Клучни зборови: стрептозоцин, простациклин, дијабетична нефропатија, стаорци.

Вовед

Микроваскуларните компликации, а пред се дијабетичната нефропатија и ретинопатија се едни од најтешките компликации на дијабетот, од кои во голема мера зависи и прогнозата на дијабетот кај овие пациенти. Етиопатогенезата на оваа компликација е мултифакторијална и за сега се уште не комплетно расветлена, а вклучува морфолошки, патолошко-анатомски и биохемиски метаболни пореметувања. Се смета дека пореметувањето на модуларната функција на ендотелиумот може да биде клучен и иницијален фактор во развојот на дијабетичните васкуларни компликации (1). Ендотелијалната дисфункција се карактеризира со редукција на факторите на релаксација, као што се прос-

*Јасмина Тројачанец
e-mail: pharma@mt.net.mk
Тел. 02 11 18 28; 02 16 59 66; Факс. 02 11 18 28

тациклинот, азотниот оксид и ендотелните деривирани хиперполаризирачките фактори и зголемување на факторите на контракција, како што се ендотелин-1, простагландин PGH_2 и тромбоксан TXA_2, кои претставуваат главни фактори во развојот на васкуларните заболувања (2). Специфична терапија за диајабетичната нефропатија не постои. Познавајќи го патофизиолошкиот механизам на настанување на дијабетична нефропатија се издвојуваат неколку групи на лекови кои веќе се употребуваат или би можеле да се употребуваат во превенцијата и третманот на дијабетичните нефропатии. Посебно се интересни лековите кои делуваат пред се на синтезата на ендотелин-1, инхибиторите на ендотелин-1 како и лекови кои што делуваат поволно на хемодинамските пореметувања кои се присутни кај дијабетичната нефропатија. Прогресот кој бил направен во разбирањето на комплексните патофизиолошки пореметувања на ендотелиумот кај дијабетот, допринел за интензивни понатамошни испитувања со цел да се пронајдат нови терапевтски можности за подобрување на васкуларната дисфункција кај пациентите со дијабет. Врз основа на фармакодинамските ефекти кои што ги поседуваат, се смета дека една од медикаментозните опции за превенција на дијабетичната нефропатија како компликација на дијабет може да биде употребата на простациклинот, односно PGI_2 аналозите. Простациклинот е потентна вазоактивна супстанца за која се смета дека може да влијае поволно на компликациите на дијабетот како што се дијабетична нефропатија и ретинопатија, за кои е познато дека се пропратени со абнормална продукција и метаболизам на простагландини (3, 4).

До сега клиничката употреба на анлозите на простацилин е одобрена во третманот на пулмонална хипертензија и некои периферни васкуларни заболувања, како што е интермитентна клаудикација и заболувања кои се проследени со пореметен функција на тромбоцитната агрегација. Меѓутоа, имајќи ги во предвид неговите фармакодинмаски дејства на васкуларниот ендотел, а особено на бубрезите, нивните можности не се исцрпуваат со тоа. Наодите од експерименталните студии сугерираат дека аналозите на простациклин би можеле да бидат ефикасни и во голем број други патолошки состојби и заболувања, од кои се издвојуваат компликациите на дијабетот, како што е дијабетичната ретинопатија, неуропатијата и особено дијабетичната нефропатија.

Главна цел на оваа студија беше да се проценат ефектите на Простациклин (PGI_2) во третманот на дијабетичната нефропатија, експериментално предизвикана со стрептозоцин.

Експериментален дел

Експериментални животни: За изведување на експериментите кои беа предвидиени во ова испитување беа користени 60 машки и женски нормотензивни стаорци од сојот Wistar (од двата пола), на возраст од 9-11 недели, со телесна тежина од 170-300 g. Стаорците се добиени по пат на размножување во шталата на Институтот за предклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија.

Лекови: Во текот на студијата беа користени следните лекови: Streptozocin (STZ) - SIGMA-ALDRICH и Prostaciklin (PGI_2) - SIGMA-ALDRICH.

Експериментални протоколи: За да се предизвика дијабет, кај стаорците еднократно интраперитонеално беше администриран Стрептозоцин во доза од 60 mg/kg/t.t.. Во студијата беа вклучени само стаорците кај кои нивото на глукоза во крвта беше 11 mmol/L, на гладно (наутро). Во наредните 4 недели, за да се развие дијабетична нефропатија, животните беа оставени во дијабетична состојба без никаков третман. За да се одговори на поставените цели, стаорците (n = 40) беа поделени во две групи. Кај првата (STZ) група стаорци (n = 20), со цел да се проценат симптомите и знаците на дијабетичната нефропатија, истите во наредните 4 недели беа оставени без никаков третман. За да се евалуира терапискиот ефект на простациклин (PGI_2) во третманот на експериметално индуцираната дијабетична нефропатија, кај втората (PGI) група стаорци, после 4 недели од администрацијата на Стрептозоцин, се започна со администрација на простациклин перорално (со интрагастрична сонда), растворен во 5% глукоза, во доза од 0.1 mg/kg/t.t./ден, во тек на 4 недели.

Третата група, која истот така броеше 20 страорци, претставуваше контролна група и експерименталните животни од оваа група примаа само физилошки раствор во исти количини и временски интервали како и групите животни кои ги примаа испитуваните лекови (не дијабетични стаорци).

Мерења и анализи: во текот на испитувањето беа извршени следните мерења и анализи: биохемиска анализа на крвта од стаорците, која вклучуваше одредување на нивото на глукоза, серумски креатинин и уреа; уринарни анализи кои вклучу-

ваа: диуреза, вкупни протеини во урина и одредување на уринарната екскреција на NAG (N-Acetyl-β-D-glucosaminidase) и параметри за процена на општиот статус на експерименталните животни кои вклучуваа: телесна тежина, дневен внес на вода и храна, моторна активност. Сите овие мерења и анализи, со исклучок на нивото на глукоза во крвта и телесната тежина, кај испитуваните животни се изведуваа пред почетокот на испитувањето (0-ден), после 4 и 8 недели од почетокот на испитувањето. Нивото на глукоза во крвта се одредуваше пред почетокот на испитувањето, 72 часа после апликацијата на стрептозоцин и после 4 односно после 8 недели, додека телесната тежина на животните се мереше во неделни интервали.

Активноста на NAG во урина беше одредувана со валидизираната методата на Horak E. et al. (5), додека количината на вкупни протеини во урина се одредуваше спектрофотометриски.

Статистичка обработка: од дескриптивна статистика беа користени мерките на централна тенденција и варијабилитет (средна вредност, стандардна девијација). Разликите помеѓу одредени временски точки, како и разликите помеѓу групите беа анализирани со Sudent-ov "t test" за зависни односно независни примероци и непараметриските тестови Mann-Whitney U-test, Wilcoxon-ov тест и Kruskal-Wallis ANOVA. Како сигнификантно значајни беа земени разликите за $p<0.05$.

Земање на примероци на крв за хематолошки анализи: крвта од стаорците беше земана од орбиталниот синус на стаорците, во лесна етерска анестезија, со венепункција, при што беа земани примероци на крв за хематолошки анализи (по 100 μl на кои им беше додаден антикоагуланс EDTA).

Земање на примероци на урина: За да се минимизираат циркардијалните варијации на вредностите на поедини параметри, примероците на урина се земаа од 24-часовната урина (диуреза) на стаорците која се собираше со користење на метаболни кафези. Целокупната урина беше собирана во тек на 24 часа, почнувајќи од 10^{00} h претпладне, па се до истото време наредниот ден.

Резултати и дискусија

За остварување на основната цел на нашата студија (процена на ефектот на простациклин (PGI_2) во третманот на дијабетична нефропатија), поставивме експериментален модел на дијабетична нефропатија кај стоарци. Еднократната администрација на Стрептозоцин во доза од 60 mg/kg//t.t. предизвика тешка хипергликемија веќе после 72 часа од администрацијата на лекот кај најголемиот број од стаорците. Во понатамошниот тек од испитувањето беа вклучени само оние стаорци кај кои нивото на глукоза во крв беше > 11 mmol/L на гладно (n = 40). Просечните вредности на глукоза во крвта кај експерименталните животни кои беа вклучени во испитувањето изнесуваше 26.92 mmol/L.

Бидејќи нашата цел беше развој, а потоа и третман на дијабетична нефропатија, стаорците од двете испитувани групи: стрептозоцин (STZ) и простациклин (PGI_2) во текот на целото испитување не примаа специфична терапија за дијабет, поради што вредностите на глукоза во крвта и после 4, односно 8 недели останаа на приближно исто ниво (STZ = 28.52 mmol/L; PGI2 = 27.75 mmol/L), при што разликата помеѓу двете групи беше несигнификантна ($p>0.05$).

Ваквото високо ниво на глукоза во крвта, по 4 недели од администрацијата на стрептозоцин, како и во голем број други слични експериментални студии (6,7,8), резултираше со јасно изразени симптоми и знаци за дијабетична нефропатија кај двете испитувани групи на животни, вклучувајќи зголемено ниво на серумска уреа и креатинин, изразита полуирија, протеинурија и лоша општа состојба на испитуваните животни. Во групата стаорци кои во текот на испитувањето освен стрептозоцин не примаа друг лек (STZ-група), симптомите на дијабетичната нефропатија прогредираа и уште повеќе се влошија по 8 недели од администрацијата на стрептозоцин. За разлика од тоа, во групата животни кои од 4-тата до 8-та недела примаа терапија со простациклин (PGI_2), евидентно беше изразито намалување и ублажување на симптомите на дијабетичната нефропатија и подобрување на нивната општа состојба.

Серумски креатинин и уреа

Нивоата на креатинин и уреа во серум се користеа како рутински, неспецифични маркери за процена на бубрежната функција кај стаорците.

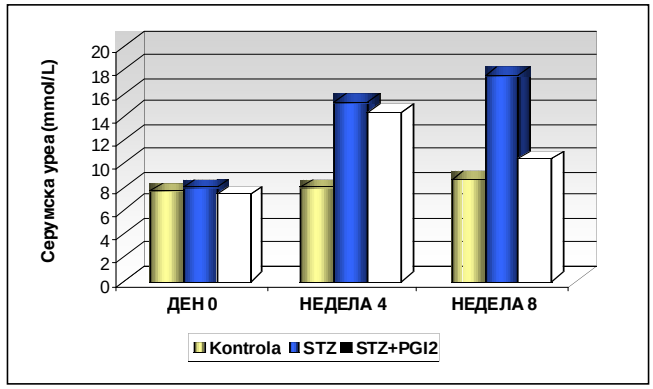
По 4 недели од еднократната администрација на стрептозоцин, евидентно беше зголемено серумско нивоа на уреа и креатинин во однос на базалните вредности и вредностите кај контролната група. Просечните вредности на нивото на уреа и креатинин во серум кај STZ-групата изнесуваа 15.19 ± 3.8 mmol/L (уреа), односно 43.83 ± 6.43 mmol/L (креатинин), а кај PGI_2-групата 14.33 ± 3.98 mmol/L

(уреа), односно 42.94 ± 6.66 mmol/L (креатинин), што е сигнификантно ($p<0.05$) повисоко во однос на контролната група и базалните вредности. На крајот од испитувањето, кај STZ-групата вредностите на уреа беа уште повеќе зголемени и изнесуваа 17.47 ± 6.43 mmol/L, додека вредностите на креатинин останаа зголемени приближно на исто ниво како и после 4 недели и изнесуваа 42.08 ± 5.630 mmol/L. Спротивно на тоа, кај PGI_2-групата, вредностите на уреа и креатинин бележеа сигнификантен пад во однос на вредностите по 4 недели и беа близу до базалните вредности и вредностите кај контролната група (уреа: 10.39 ± 3.69 mmol/L; креатинин: 38.33 ± 9.22 mmol/L (Сл. 1 и 2).

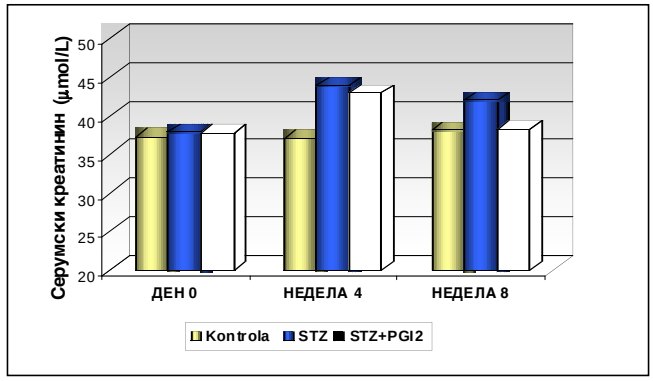
Компаративната статистичка анализа на добиените резултати помеѓу двете групи на животни, како и во однос на базалните вредности и вредностите на овие параметри кај контролната група, покажува сигнификантно пониски ($p<0.05$) ниво на серумска уреа и креатинин кај PGI_2-групата во однос на STZ-групата. Процентуално, на крајот од испитувањето, вредностите на уреа и креатинин кај SZT-групата во однос на базалните вредности беа зголемени за 119.5%, односно 10.73%, додека кај PGI_2-групата ова зголемување беше сигнификантно помало и изнесуваше 41.5%, односно 1.61% ($p<0.05$).

Диуреза

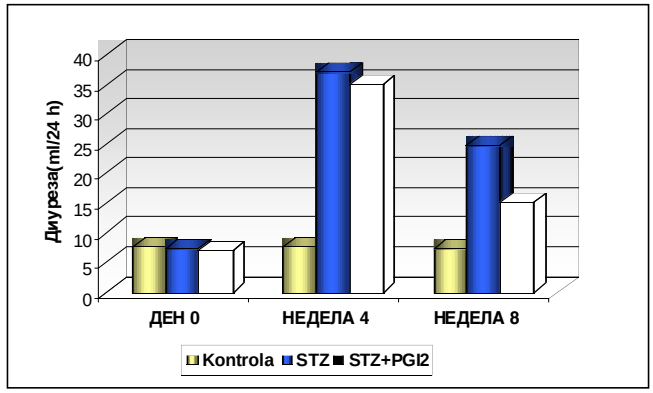
Резултат на експериментално индуцираниот дијабет, а последователно на тоа и на дијабетичната нефропатија беше високо сигнификантно зголемување на диурезата кај двете групи на животни во однос на базалните вредности и контролната група, после 4 недели од администрацијата на Streptozocin. Просечните вредности на диуреза по 4 недели беа за приближно 5 пати повисоки во однос на базалните вредности и изнесуваа: 37.14 ± 8.45 ml/24h (STZ), односно 35.00 ± 10.79 ml/24h (PGI_2), што е сигнификантно ($p<0.01$) повисоко во однос на вредностите кај контролната група 7.71 ± 0.95 ml/24h. На крајот од испитувањето, по 8 недели, во групата која примаше само Стрептозоцин вредностите на диурезата само лесно се намалија и изнесуваа 24.86 ± 4.98 ml/24h, а во групата која покрај стрептозоцин примаше и простациклин истите беа за повеќе од половина намалени во однос на претходните вредности (15.29 ± 7.23 ml/24h), што е сигнификанта ($p<0.05$) разлика во однос на STZ групата (Сл. 3). Ваквите резултати несомнено укажуваат на поволни тераписки ефекти на простациклин на оштетената бубрежна функција со стрептозоцин.



Сл. 1. Вредности на уреа во серум кај стаорците во текот на испитувањето (mmol/L)



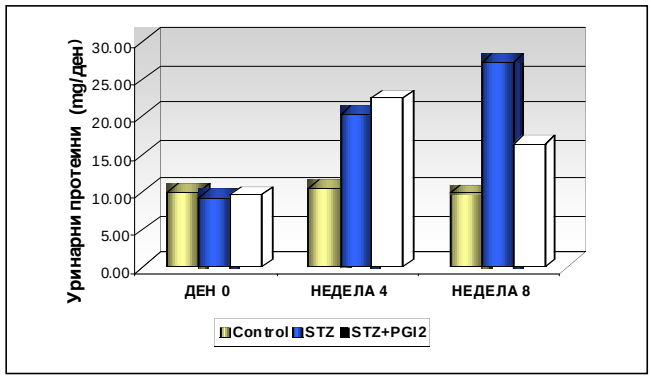
Сл. 2. Вредности на креатинин во серум кај стаорците во текот на испитувањето (µmol/L)



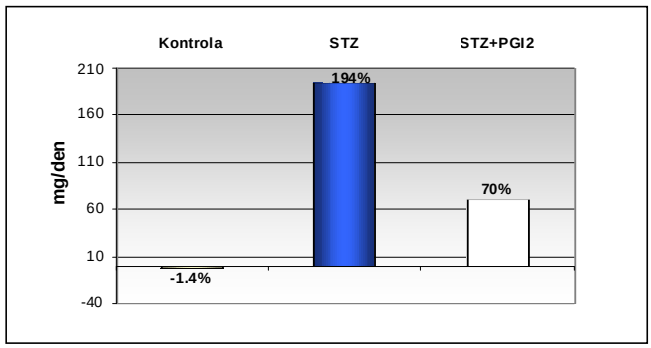
Сл. 3. Вредности на диуреза (24-часовна урина) во текот на испитувањето кај стаорците (ml/24h)

Вкупни протеини во урина

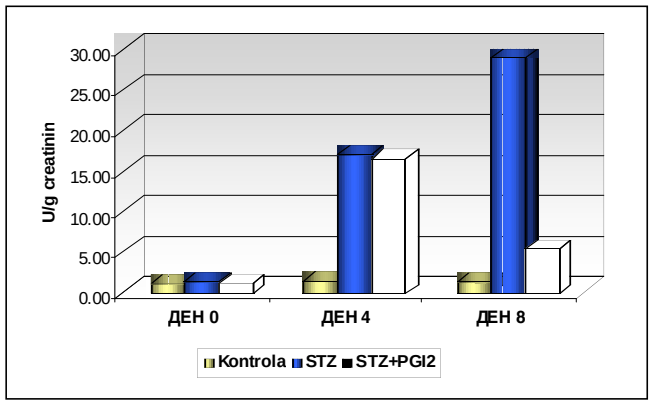
Одрдувањето на вкупните протеини во урина за 24 часа, односно протеинуријата, претставува поспецифичен показателите за процена бубрежната функција и е значаен параметар за потврдување на дијагнозата на дијабетична нефропатија, со оглед на тоа што истата е манифестна во понапредната фаза на болеста. После 4 недели од администрацијата на Стрептозоцин, евидентна беше изразита протеинурија во двете групи на животни, при што просечните



Сл. 4. Вкупни протеини во урина за 24 часа кај стаорците во текот на испитувањето (ml/24h)



Сл. 5. Процентуално зголемување на вредноста на вкупни протеини во урина за 24 часа кај стаорците на крајот од испитувањето во однос на базалните вредности.



Сл. 6. Вредности на NAG во урина кај стаорците во текот на испитувањето (U/g/креатинин)

вредности кај STZ групата изнесуваа 20.45 ± 3.05 mg/24h, а во PGI_2 групата 22.39 ± 3.39 mg/24h. Ваквиот наод несомено укажува на стадиум на болеста во напредната фаза. После 8 недели, во STZ групата вредностите на вкупни протеини во урина за 24 часа уште повеќе беа зголемени (27.37 ± 5.2 mg/24h), што укажува на понатамошна прогресија на болеста. За разлика од тоа, кај PGI_2 групата, иако истите се уште беа сигнификантно повисоки во однос на базалните вредности и контролната група, бележеа тренд на опаѓање (16.49 ± 3.94 mg/24h), што е сигнификанто пониско во односна STZ групата ($p < 0.05$). Ваквите резултати несомнено покажуваат дека простациклин ја стопира прогресијата на болеста и влијае поволно на бубрежната функција (Сл. 4)

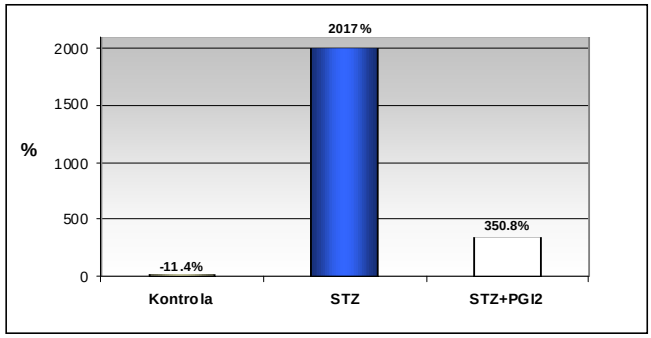
Процентуални изразено, во групата животни кои беа третирани само со стрептозоцин, на крајот од испитувањето вредностите на вкупни протеини во урина за 24 часа во однос на базалните вредности беа зголемени за: 194%, а во групата која покрај Стрептозоцин примаше и простациклин ова зголемување изнесуваше 70%, што претставува сигнификантна разлика во однос на STZ групата (Сл. 5).

Уринарна екскреција на NAG (N-Acetyl-β-D-glucosaminidase):

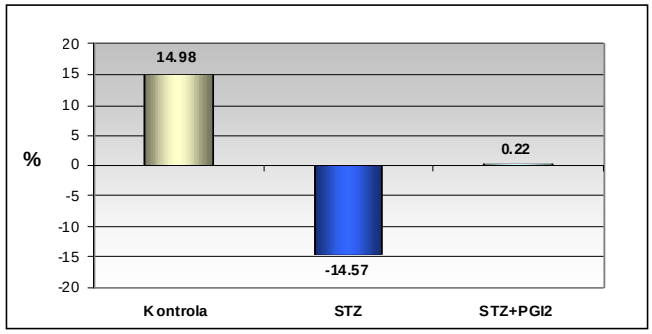
Уринарната екскреција на лизозомалниот ензим NAG се користеше како високо специфичен параметар и индикатор за реналните оштетувања индуцирани од Стрептозоцин, а воедно и за терапискиот ефект на простациклин.

После 4 недели од администрацијата на Стрептозоцин кај испитуваните животни, евидентно беше изразито зголемување на вредностите на NAG во урина, при што просечните вредности во STZ групата изнесуваа 17.13 ± 7.14 U/g/креатинин, односно 16.53 ± 7.85 U/g/креатинин кај PGI_2-групата. Ваквите резултати несомено ги потврдуваат бубрежните оштетувања индуцирани со стрептозоцин, регистрирани со претходно опишаните параметри за процена на бубрежната функција кај испитуваните животни. На крајот од испитувањето, по 8 недели од администрацијата на Стрептозоцин, кај STZ групата вредностите на NAG беа уште повисоки и изнесуваа 29.01 ± 16.34 U/g/креатинин. За разлика од тоа, кај втората група животни, кои во тек на 4 недели примаа простациклин секој ден, беше регистрирано сигнификантно ($p<0.01$) намалување на вредностите на NAG (5.32 ± 1.95 U/g/креатинин), иако истите беа се уште повисоки во однос на базалните вредности и контролната група (Сл. 6).

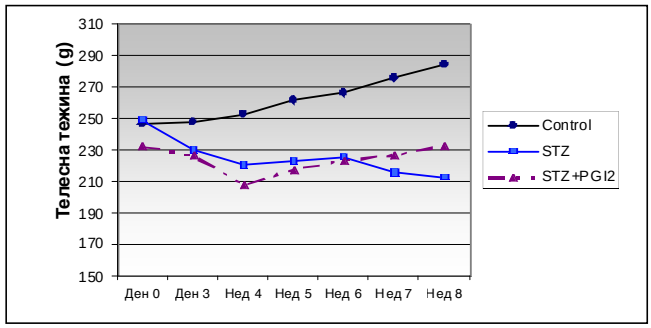
Процентуални изразено, во групата животни кои беа третирани само со стрептозоцин, на крајот од испитувањето вредностите на NAG во урина во однос на базалните вредности беа зголемени за повеќе од 20 пати, а во групата која покрај Стрептозоцин примаше и простациклин ова зголемување изнесуваше приближно 3.5 пати, што претставува високо сигнификантна разлика во однос на СТЗ групата (Сл. 7).



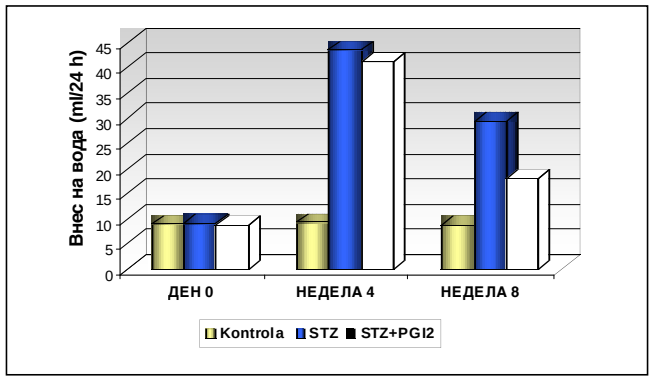
Сл. 7. Процентуално зголемување на вредноста на NAG во урина кај стаорците на крајот од испитувањето во однос на базалните вредности.



Сл. 9. Процентуално намалување/зголемување на телесната тежина по 8 недели во однос на базалните вредности



Сл. 8. Вредности на телесна тежина кај стаорците во текот на испитувањето (g)



Сл. 10. Количина на дневен внес на вода кај стаорците во текот на испитувањето (ml/24h)

Параметри за процена на општата состојба

Една од карактеристиките на третманот со стрептозоцин, беше неговото влијание на општата состојба на испитуваните животни. Кај STZ групата, изразито манифестна беше лошата општа состојба, особено изразена преку прогресивен губиток на телесната тежина во текот на целото испитување.

На крајот од испитувањето кај STZ-групата просечната телесна тежина изнесуваше 212.73 74.44 g, што преставува пад за 14.57% во однос на базалните вредности. За разлика од тоа, кај PGI_2-групата, по периодот на изразит пад на телесната тежина првите 4 недели, кога не примаа терапија со простациклин, по започнувањето на третманот со простациклин, телесната тежина бележеше тренд на раст и постепено опоравување на животните, при што на крајот од испитувањето просечните вредности на телесната тежина изнесуваа 232.5 ± 49.73 g и беа реачиси идентични со базалните вредности, што претставува сигнификантна разлика во однос на STZ-групата (Сл. 8 и 9).

Дневен внес на вода

Експериментално индуцираниот дијабет и дијабетична нефропатија со Стрептозоцин последователно го зголеми и дневниот внес на вода приближно за 4 пати по 4 недели (STZ = 43,71 ± 9.88 ml/24h; PGI2 = 41,14 ± 12.02 ml/24h). Во понатамошниот тек од испитувањето, по 8 недели кај STZ-групата беше регистрирано само лесно намалување на вкупниот внес на вода (29.43 ± 5.80 ml/24h), додека кај PGI_2-групата, поради тераписките ефкти на простациклин и подобрените симптоми на дијабетичка нефропатија, вкупниот внес на вода беше изразито намален и изнесуваше 18.21 ± 8.37 ml/24h, што исто така претставува сигнификантна разлика во однос на STZ-групата (Сл. 10).

Во однос на останатите субјективни параметри за процена на општата состојба на испитуваните животни, кај STZ-групата евидентна беше изразито намалена моторна активност, намален внес на храна и седација кај животните, при што овие симптоми и знаци уште повеќе прогредираа во текот на испитувањето, со влошување на општата состојба на испитуваните животни. За разлика од тоа, кај PGI_2-групата, по започнувањето на третманот со простациклин, евидентно беше подобрувањето на општата состојба на испитуваните животни, изразено преку зголемена моторна активност, зголемен внес на храна и намалена седација.

Севкупните резултати од нашата студија потврдуваат дека простациклинот, иако некомплетно, во голема мера ги редуцира симптомите на дијабетична нефропатија индуцирана со стрептозоцин кај стаорци и дека може да биде една од медикаментозните опции за третман на оваа компликација на дијабетот.

Иако етиопатогенезата на оваа компликација е мултифакторијална и за сега се уште не комплетно расветлена, се смета дека пореметувањето на модуларната функција на ендотелиумот може да бидат еден од клучните и иницијални фактори во развојот на дијабетичните васкуларни компликации (1). Ендотелиалната дисфункција се карактеризира со редукција на факторите на релаксација, како што се простациклинот, азотниот оксид и ендотелните деривирани хиперполаризирачките фактори и зголемување на факторите на контракција, како што се ендотелин-1, простагландин PGH_2 и тромбоксан TXA_2, кои претставуваат главни фактори во развојот на васкуларните заболувања (2).

Простациклинот кој што се синтетизира во бубрезите е потентна вазоактивна супстанца за која се смета дека може да влијае поволно на компликациите на дијабетот како што се дијабетична нефропатија и ретинопатија, кај кои е познато дека се пропратени со абнормална продукција и метаболизам на простагландини (3, 4).

Во испитувањата кај пациенти со дијабетичка нефропатија е најден дисбаланс помеѓу односот на 6-keto-$PGF1_{1a}$ (стабилен метаболит на PGI_2) и TXB_2 (стабилен метаболит на TXA_2) во урината во однос на здравите испитаници. Поради дисбалансот доаѓа до изразено стимулативно дејство на TXA_2 кое што се манифестира со забрзана тромбоцитна агрегација и вазоконстрикторно дејство што во бубрезите предизвикува намалување на крвниот проток и хиперагрегација во гломерулите што резултира со прогресија на дијабетичната нефропатија (9).

Простациклинот го зголемува реналниот проток на крв и ја стимулира диурезата, натриурезата и калиурезата, а има мало влијание на гломеруларната филтрација.

Во нашата студија евидентни и сигнификанти беа подобрувањата на симптомите и знаците на бубрежните оштетувања односно дијабетичната нефропатија во групата стаорци кои примаа простагландин. Простациклин (PGI_2), сигнификанто ги намали претходно зголемените вредности на вкупните протеини во урина за 24 часа, како и вредностите на NAG во урина во споредба со групата која примаше само стрептозоцин. Како можен претпоставен механизам на дејство на простагландинот во однос на овие подобрувања може да се сметаат: неговите ефекти во однос на подобрувањето на хиперагрегацијата во реналната васкуларна мрежа, инхибицијата на создавање на микротромби во гломерулите, забрзувањето на реналниот проток и подобрување на хипоксијата во бубрежното ткиво преку инхибиција на тромбоцитната агрегација, индуцираната вазодилатација и подобрувањата во однос на деформираните еритроцити (10,11,12,13).

Како еден од можните механизми на дејство преку кој простациклин делува поволно кај дијабетичната нефропатија во последно време се повеќе се истакнува неговото дејство во однос на ендотелин-1. Мошне интересни се наодите од неколку експериментални студии во однос на дејствата на PGI_2 на нивото на ендотелин-1, за кој се знае дека има значајна улога во прогресијата на дијабетичната нефропатија, со оглед на тоа дека кај дијабетичните пациенти со микроангиопатија е регистрирано сигнификантно зголемена продукција на нивото на ЕТ-1. Во Ин витро студијата на Bruce (14) е покажано дека простациклинот сигнификанто ја инхибира продукцијата и секрецијата на ендотелин на култура од ендотелни клекти. Инхибиција на базалната секреција на ендотелин-1 за приближно 40% односно за 50% на серумски стимулираната секреција на ендотели-1 со PGI_2 и PGE_2 најдена е и во студијата на Prins (15). Ваквите наоди сугерираат дека намалувањето на нивото на ендотелин-1 од страна на простациклин може да биде еден од неговите главни механизми на дејство преку кој ја успорува прогресијата на дијабетичната нефропатија.

Заклучок

Микроваскуларните компликации, а пред се дијабетичната нефропатија, се едни од најтешките компликации на дијабетот, за кои се уште не постои специфична и доволно ефикасна терапија, а од кои во голема мера зависи и прогнозата на дијабетот кај овие пациенти.

Добиените резултати од нашата студија потврдуваат дека простагландините, односно PGI_2, може да претставуваат медикаметозна опција за третман на дијабетична нефропатија. Примената на простагландин, иако не комплетно, во голема мера ги ублажи симптомите и ја успори прогресијата на дијабетична нефропатија експериментално индуцирана со стрептозоцин.

Литература:

1. F. Cosentino, M. Eto, P. De Paolis, B. van der Loo et al., *Circulation,* **107** (7), 1017-23 (2003)
2. J.R.Sowers, *Arch Intern Med.,* **158** (6), 617-21 (1998)
3. P.A. Craven, M.A. Caines, F.R. DeRubertis, *Metabolism*., **36** (1), 95-103 (1987)
4. H. Masumura, S. Kunitada, K. Irie, S. Ashida, Y. Abe, *Eur J Pharmacol.*, **210** (2), 163-72 (1992)
5. E. Horak, S.M. Hopfer, F.W. Jr Sunderman, *Clin Chem.*, **27** (7), 1180-5 (1981)
6. A.K. Banes, S. Shaw, J. Jenkins, H. Redd et al., *Am J Physiol Renal Physiol.*, **286** (4), F653-9 (2004)
7. J. Klisic, V. Nief, L. Reyes, P.M. Ambuhl, *Nephron Physiol.*, **102** (2), p27-35 (2006)
8. M.M. Anwar, A.R. Meki, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, **135** (4), 539-47 (2003)
9. Y. Tajiri, T. Inoguchi, F. Umeda, H. Nawata, *Diabetes Res Clin Pract.*, **10** (3), 231-9 (1990)
10. T. Umetsu, T. Murata, S.Nishio, *Arzneimittelforschung.*, **39** (1), 68-73 (1989)
11. T. Akiba, M. Miyazaki, N.Toda, *Br J Pharmacol.*, **89** (4):703-11 (1986)
12. H. Yamaguchi, K. Nagata, T. Shimizu, A. Ishiman, K. Furukawa, *Blood Vessels*, **20**, 147-151 (1989)
13. C. Yokoyama, T. Yabuki, M. Shimonishi, M. Wada et al., *Circulation*, **106,** 2397-2403 (2002)
14. A.P. Bruce, H. Ren-Ming, N, Brunilda, *P. Ali et al., J Biol Chem.*, **269,** 11938-11944 (1995)
15. B.A. Prins, R.M. Hu, B. Nazario, *A. Pedram et al., J Biol Chem.*, **269** (16), 11938-44 (1994)

Summary

Effects of prostacyclin in treatment of diabetic nephropathy in rats

Jasmina Trojachanec[1], Dimche Zafirov[1], Nikola Labachevski[1], Trajan Balkanov[1], Igor Kikerkov[1], Valentina Kolovska[2], Svetlana Cekovska[3], Stojmir Petrov[1]

[1]Department of Preclinical and Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty; "Ss Cyril and Methodius", Skopje, R. Macedonia.
[2]Department of Clinical Biochemistry, Clinical Centre, Skopje, R. Macedonia.
[3]Department of Medical and Experimenthal Biochemistry, Medical Faculty; "Ss Cyril and Methodius", Skopje, R. Macedonia.

Key words: streptozocin, prostacyclin, diabetic nephropathy, rats

Microvascular complications, and primarily diabetic nephropathy, are one of the most severe diabetic complications, which largely influence on prognosis of diabetes in these patients. The etiopathogenesis of this complication is multifactorial one and it has still not been completely elucidated, but includes morphological, pathological-anatomic and biochemical metabolic disorders. It is considered that disorders of endothelial modular function might be critical and initial factor in the development of diabetic vascular complications. Based on pharmacodynamic effects of prostacyclin (PGI_2) and its analogues, it could be said that they may be useful in the treatment of diabetic nephropathy.

The main aim of this study was to assess the effects of prostacyclin (PGI_2) in the treatment of diabetic nephropathy that was experimentally induced with streptozocin.

Diabetes was induced in normotensive Wistar strain rats by single i.p. administration of streptozocin (STZ) and as a complication of diabetes and distinct signs and symptoms of diabetic nephropathy (proteinuria, increased serum level of urea and creatinine, polyuria, increased NAG activity in urine). Treatment with prostacyclin (p.o.) at dose of 0.1 mg/kg/b.w./daily during 4 weeks caused a significant reduction of the signs and symptoms of kidney failure as compared to control group of animals that were not given prostacyclin.

The results obtained have shown that prostacyclin may have an important role in treatment of diabetic nephropathy, experimentally induced with streptozocin.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 41-48 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 615.27:616.61-097.3

Стручен труд

Епоетин алфа ја намалува нефротоксичноста индуцирана со цисплатин кај стаорци

Димче Зафиров[1], Јасмина Тројачанец[1], Никола Лабачевски[1], Петраки Корнети[2], Светлана Цекова[2], Игор Кикерков[1], Емилија Атанасовска[1], Калина Георгиевска[1], Стојмир Петров[1]

[1]*Институт за Претклиничка и Клиничка Фармакологија со Токсикологија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", 50 Дивизија б.б. 1000 Скопје, Република Македонија.*
[2]*Институт за Медицинска и Експериментална Биохемија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", 50 Дивизија б.б. 1000 Скопје, Република Македонија.*

Примен април 2006, прифатен јуни 2006

Апстракт

Клиничката ефикасност на цисплатин како антитуморски лек е несомнена, но дозно-лимитирачки фактор за негова употреба претставува изразитата нефротоксичност. Најновите истражувања покажуваат дека епоетин алфа може да има значајна улога не само во тераписки цели за корекција на разни видови на анемии, туку истиот може да биде ефикасен и како невропротектив, хепатопротектив, кардиопротектив и особено значајно како нефропротектив кај нефротоксичност индуцирана од препарати на база на платина.

Главна цел на оваа студија беше да се утврди ефектот на епоетин алфа во превенцијата на нефротоксичност експериментално индуцирана со долготрајна администрација на цисплатин во доза од 2 mg/kg/t.t./недела во тек на 8 недели, кај Wistar стаорци. Добиените резултати од оваа студија покажуваат дека епоетин алфа сигнификантно ги ублажува функционалните бубрежни пореметувања индуцирани со долготрајна администрација на цисплатин, ја подобрува општата состојба и го намалува морталитетот кај испитуваните животни.

Клучни зборови: епоетин алфа, цисплатин, нефротоксичност, стаорци.

Апстракт

Клиничката ефикасност на цисплатин како антитуморски лек во третманот на разни малигни заболувања е несомнена, но дозно-лимитирачки фактор за негова употреба претставува неговата изразита нефротоксичност. Досегашните повеќегодишни искуства со овој лек покажуваат дека тераписките ефекти на цисплатин имаат дозно зависен карактер, односно сигнификантно се зголемуваат со зголемувањето на неговата доза. Меѓутоа, комплетниот тераписки потенцијал на цисплатин во голема мера е лимитиран од неговите кумулативни токсични ефекти, од кои најзначјни се нефротоксичноста, невротоксичноста, гастроинтестиналната токсичност и миелотоксичноста. Од сите нив, реналната токсичност е најсериозен дозно-лимитирачки фактор за негова клиничка употреба поради нејзината висока инциденца и влијанието на морбидитетот и морталитетот на пациентите (1).

Како клучни фактори во механизмот на нефротоксичното дејство на цисплатин се сметаат неговото цитотоксично дејство, кое е карактеристично за акутната нефротоксичност и индукцијата на апоптоза, односно програмирана клеточна смрт, која е карактеристична за хроничната експозиција на цисплатин. Во однос на молекуларниот механизам на цитотоксичното дејство на цисплатин, особено во однос на токсичноста врз проксимал-

* Димче Зафиров
e-mail: pharma@mt.net.mk
Тел. 02 11 18 28; 02 16 59 66; Факс. 02 11 18 28

ните тубули во бубрезите, постојат повеќе претпоставки, од кои се издвојуваат два прилично јасни механизми преку кои цисплатин ги уништува клетките. Првата, цитотоксичното дејство на цисплатин го објаснува на ист начин како и неговото цитотоксично дејство врз малигните клетки, односно преку негово врзување за DNK и формирање на комплекси d (GpG)-цисплатин, што предизвикува значителни конформациски промени на DNK (дисторзија, искривување на оската), кои се токсични за клетките кои се наоѓаат во фаза на делба (2, 3, 4). Втората теорија се објаснува преку стварање на нефротоксини при метаболизмот на цисплатин (5, 6).

Додека екстензивните акутни оштетувања можат да предизвикаат некротична клеточна смрт, податоците од најновите истражувања покажуваат дека помалку тешките ренални оштетувања, кои и најчесто се среќаваат во модерната клиничка пракса, предоминанто се пропратени со апоптоза (програмирана клеточна смрт) на тубуларните епителни клетки (7, 8). Апоптозата на тубуларните епителијални клетки од пред неколку години се смета дека е најверојатно еден од најзначајните механизми преку кој цисплатин го манифестира своето нефротоксично дејство при негова повторувана администрација, покрај стварањето на метаболни нефротоксини (7, 8).

Во онколошката пракса, кумулативната токсичност на антинеопластичните лекови се настојува да се минимизира со разни стратегии и постапки кои вклучуваат: намалување на вкупната кумулативна доза на цисплатин, хиперхидрација на организмот со примена на диуретици и др. Меѓутоа, овие мерки се покажале како недоволно ефикасни за задоволителна превенција од нефротоксичното дејство на цисплатин.

Најновите стратегии и размислувања за намалување на нефротоксичноста на цисплатин вклучуваат начини за инхибиција на активацијата на цисплатин во нефротоксин, потоа употреба на антиоксиданси за неутрализирање на реактивните оксигени молекули и 'target" инхибиција на апоптотичките механизми кои се активираат под дејство на цисплатин во бубрежните клетки.

Врз основа на до сега познатите механизми на индукција на апоптоза од страна на цисплатин (активација на така наречените Fas-рецептори и активација на митохондрии), во последните неколку години, интензивно се испитуваат разни супстанции кои би можеле да ја инхибираат апоптозата, преку делување на разни нивоа од патиштата на индукција на апоптоза, почнувајќи од супстанции кои отстрануваат реактивните оксигени метаболити, антиоксиданси, потоа супстанци кои делуваат инхибиторно на активацијата на каспазите, супстанци кои превенираат намалување на нивото на АТР и др. Исто така, за превенцијата на нефротоксичноста на цисплатин во последните неколку години посебно интересни се и лековите кои покрај тоа што можат да делуваат антиапоптотички, можат и да ја стимулираат регенерацијата на оштетените ткива, односно да делуваат како фактори на раст. Еден од таквите лекови всушност претставува и рекомбинантниот хуман еритропоетин, односно епоетин алфа како негов прототип, кој всушност предоминантно претставува хематопоетски фактор на раст, но и стимулатор на единствениот за сега познат интраклеточен инхибитор на апоптозата - *bcl-2.* Основните цели на оваа студија беа да се утврдат ефектите на епоетин алфа во превенцијата на нефротоксичноста експериментално индуцирана со долготрајна администрација на цисплатин во доза од 2 mg/kg/t.t./недела во тек на 8 недели.

Експериментален дел

Лекови: Во текот на студијата беа користени следните лекови: Cisplatin (CP) - Bristol Myers Squib и Epoetin alfa (EPO) (Cilag AG).

Експериментални животни: За изведување на експериментите кои беа предвидиени во ова испитување беа користени 75 машки и женски нормотензивни стаорци од сојот Wistar, на возраст од 9-11 недели, со телесна тежина од 200-300 g. Стаорците се добиени по пат на размножување во шталата на Институтот за предклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија.

Експериментални протоколи: За да се одговори на поставените цели, стаорците беа поделени во 3 групи од по 25 животни. За да се евалуира нефротоксичното дејство на цисплатин (CP) при негова долготрајна администрација, кај првата група стаорци интраперитонеално беше администриран Cisplatin во доза од 2 mg/kg/t.t., еднаш неделно, во тек на 8 недели. За да се евалуираат ефектите на Epoetin alfa во превенцијата на нефротоксичност индуцирана од хемотерапија во која е вклучен препарат на платина, кај втората група стаорци истовремено со почетокот на третманот со Cisplatin (во истата доза како и во претходниот протокол) се за-

почна со превентивна субкутана апликација на Epoetin alfa (EPO) во доза од 150 IE/kg/t.t./ 3 пати неделно. Третата група, која исто така броеше 25 стаорци, претставуваше контролна група и експерименталните животни од оваа група примаа физиолшки раствор во исти количини и временски интервали како и групите животни кои ги примаа испитуваните лекови.

Мерења и анализи: во текот на испитувањето беа извршени следните мерења и анализи: биохемиска анализа на крвта од стаорците, која вклучуваше одредување на концентрацијата на серумски креатинин и уреа; анализи на урина кои вклучуваа одредување на диурезата, нивото на NAG (N-Acetyl-b-D-glucosaminidase) во урина и вкупни протеини во урина; како и следење на телесната тежина и општата состојба на животните. Сите овие мерења и анализи кај испитуваните животни се изведуваа пред почетокот на испитувањето (0-ден), после 4 и 8 недели од почетокот на испитувањето.

Екскреција на NAG (N-Acetyl-b-D-glucosaminidase) во урина се одредуваше според валидиранта методата на Horak E. 1981 (9).

Земање на примероци на крв: крвта од стаорците беше земана од орбиталниот синус на стаорците, во лесна етерска анестезија, со венепункција, при што беа земани примероци на крв (по 400 ml) за издвојување на 200 ml серум/плазма, потребен за биохемиски анализи и примероци на крв за хематолошки испитувања (по 100 ml).

Собирање на урина: за анализа на уринатa беа користени примероци од 24-часовна урина кај стаорците, со користење на метаболни кафези.

Статистичка обработка: од дескриптивна стасистика беа користени мерките на централна тенденција и варијабилитет (средна вредност, стандардна девијација). Разликите помеѓу одредени временски точки, како и разликите помеѓу групите беа анализирани со Sudent-ov “t test” за зависни односно независни примероци и непараметриските тестови Mann-Whitney U-test, Wilcoxon-ов тест и Kruskal-Wallis ANOVA. Како сигнификантно значајни беа земени разликите за $p < 0.05$.

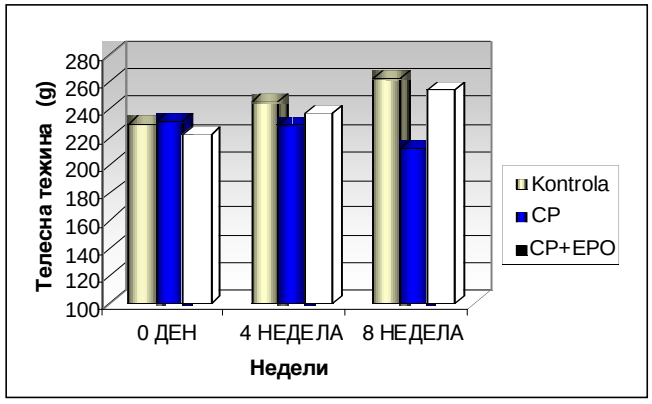
Резултати и дискусија

Добиените резултати од оваа студија ја потврдуваат кумулативната нефротоксичност на цисплатин. Администрацијата на цисплатин во неделна доза од 2 mg/kg/t.t. резултираше со умерено изразени или тешки функционални бубрежни пореметувања кај сите животни од оваа група, а кои беа манифестни и сигнификантни во однос на базалните вредности и контролната група веќе после 4 недели, односно при негова администрација во вкупна кумулативна доза од 8 mg/kg/t.t. Ваквата нефротоксичност се рефлектираше и на општата состојба на испитуваните животни, манифестирана со застој во растот, губиток во телесна тежина, намалена моторна активност, успореност и пасивност на испитуваните животни. Во понатамошниот тек од испитувањето, со зголемувањето на вкупната кумулативна доза на цисплатин, кај испитуваните животни од оваа група (CP- група) симптомите на нефротоксичност, анемија и општа лоша состојба беа уште по изразени. На крајот од испитувањето, како резултат на токсичното дејство на цисплатин, од вкупно 25 стаорци, 3 егзитираа (12%).

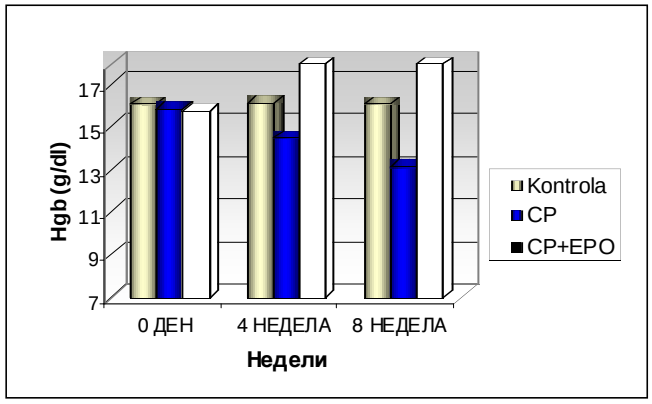
За разлика од тоа, во втората група на животни, кои покрај цисплатин примаа и епоетин алфа (EPO), иако симптомите и знаците за нефротоксичност не беа комплетно превенирани, тие беа сигнификантно помалку изразени во однос на CP групата. Од вкупниот број на стаорци во оваа група, само кај 4 стаорци беа присутни лесно до умерено изразени функционални бубрежни пореметувања. Како резултат на добро познатите ефекти на епоетин алфа на анемијата, растот и зголемувањето на оксигениот капацитет, кај оваа група на животни не беше регистрирана анемија и стагнација во растот, односно губиток во телена тежина. Од посебно значење е и податокот што ниту едно животно од оваа група не егзитираше во текот на испитувањето, што укажува на нивната зголемена толерабилност кон повисоки дози на цисплатин.

Телесна тежина

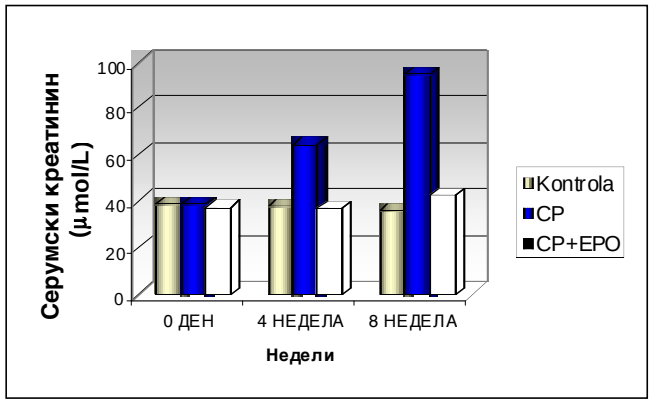
Една од карактеристиките на групата животни кои примаа само цисплатин (CP) беше прогресивниот пад на телесната тежина во текот на целото испитување (Сл. 1.). На крајот од испитувањето, по 8 недели, телесната тежина кај оваа група на животни беше намалена за 8% во однос на базалните вредности. За разлика од тоа, во групата животни кои покрај цисплатин примаа превентивно и епоетин алфа, не само што не беше регистриран застој во растот и пад во телесната тежина во текот на испитувањето, туку беше евидентно континуираното зголемување на телесната тежина и релативно добра општа состојба во текот на целото испитување (Сл. 1).



Сл. 1. Вредности на телесна тежина кај стаорците во текот на испитувањето (g)



Сл. 2. Ниво на хемоглобин кај стаорците во текот на испитувањето (g/dl.)



Сл. 3. Вредности на креатинин во серум кај стаорците во текот на испитувањето (mmol/L

Хемоглобин

Во групата животни кои примаа само цисплатин, сигнификантно ($p<0.05$) намалување на вредностите на хемоглобинот, кои се користеа за евалуација на степенот на хематолошката токсичност, во однос на базалните вредности (15.93 ± 0.76 g/dl) беше регистрирано после 4 недели од апликацијата на лекот, при што тие изнесуваа: 14.55 ± 0.48 g/dl. На крајот од испитувањето, по 8 недели администрација на вкупна кумулативна доза на цисплатин од 16 mg/kg/t.t., истите беа високо сигнификантно ($p<0.01$) пониски во однос на базалните вредности и контролната група и изнесуваа: 13.16 ± 0.5 g/dl.

За разлика од тоа, во групата животни кои ја примаа истата доза на цисплатин, но истовремено превентивно примаа и Epoetin alfa во доза од 150 IE/kg/t.t. три пати неделно, не само што не беше регистрирано намалување на вредностите на хемоглобинот, туку истите беа и сигнификантно повисоки во однос на базалните вредности и вредностите одредени кај контролната група. На крајот од испитувањето вредностите на хемоглобинот беа високо сигнификантно ($p<0.01$) повисоки во однос на базалните вредности и контролната група и изнесуваа: 20.74 ± 1.5 g/dl. (Сл. 2.)

Процентуални изразено, во групата животни кои беа третирани само со цисплатин, на крајот од испитувањето вредностите на испитуваните хематокинетски параметри во однос на базалните вредности беа намалени за 17.39%. Спротивно на тоа, во групата животни кои покрај цисплатин примаа и епоетин алфа, на крајот од испитувањето вредностите на хемоглобинот во однос на базалните вредности беа зголемени за 31.35%

Серумски креатинин и уреа

Како рутински параметри за процена на бубрежната функција се користеа серумските концентрации на креатинин и уреа кај стаорците.

Администрацијата на цисплатин во неделна доза од 2 mg/kg/t.t. предизвика зголемување на нивото на креатинин и серум после 4 недели, при што просечните вредности на овие параметри изнесуваа 64.75 ± 8.88 mmol/L (креатинин), односно 10.04 ± 1.53 mmol/L (уреа), што е сигнификантно ($p<0.05$) повисоко во однос на контроланата група (креатинин = 38.55 ± 2.68 mmol/L; уреа = 7.58 ± 1.39 mmol/L) и базалните вредности. На крајот од испитувањето вредностите на овие 2 рутински параметри за процена на бубрежната функција уште повеќе се зголемија, при што истите изнесуваа 95.0 ± 23.15 mmol/L (креатинин), односно 24.26 ± 10.72 mmol/L (уреа) (Сл. 3 и 4).

Претретманот со епоетин алфа, како резултат на неговите нефропротекивни својства, се покажа ефикасен, превенирајќи клинички значајно зголемување на вредностите на овие два параметри. Единствено на крајот од испитувањето, по администрација на вкупна кумулативна доза на цисплатин од 16

mg/kg/t.t. беше регистрирано лесно зголемување на овие вредности во однос на базалните вредности (креатинин: 43.07 ± 10.44 mmol/L; уреа: 11.15 ± 3.05 mmol/L) и контролната група. (Сл. 3 и 4).

Диуреза

Одредувањето на волуменот на 24 часовната урина (диуреза) претставува еден од општите показатели за процена на бубрежната функција и евентуалните оштетувања предизвикани од цисплатин кај експерименталните животни.

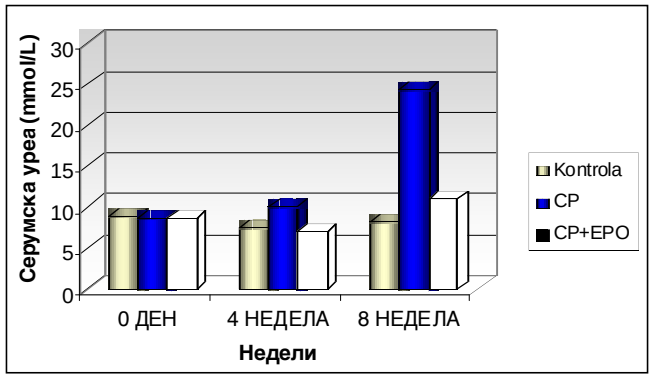
Во групата која примаше само цисплатин, веќе после 4 недели беше манифестна полиуирија, како резултат на нефротоксичното дејство на цисплатин. Просечните вредности на дизурезата од базалните 7.41 ml/24 h се зголемија на 11.29 ± 2.21 ml/24 h. На крајот од испитувањето, по администрација на вкупна кумулативна доза на цисплатин од 16 mg/ kg/t.t., просечните вредности на диурезата уште повеќе се зголемија и изнесуваа 18.00 ± 3.51 ml/24 h.

За разлика од тоа, кај CP + EPO групата, иако и овде имаше сигнификантно зголемување на диурезата во однос на базалните вредности и контролната група, истата беше сигнификантно ($p<0.05$) пониска во однос на групата која примаше само цисплатин. После 4, односно 8 недели, просечните вредности на диурезата кај оваа група на стаорци изнесуваа 10.86 ± 3.39 ml/24 h, односно 12.89 ± 1.69 ml/24 h, што е сигнификантно ($p<0.05$) пониско во однос на CP групата.

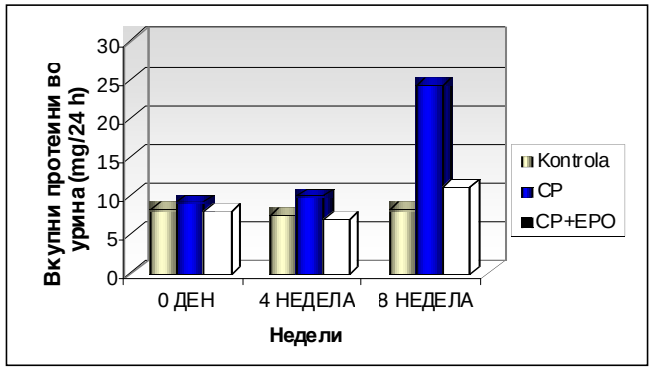
Вкупни протеини во урина

Протеинуријата, односно одредувањето на вкупните протеини во урина го користевме во оваа студија како специфичен параметар за процена бубрежната функција кај испитуваните животни. Цисплатин кај CP групата манифестираше јасно изразена протеинурија, односно зголемени вредности на вкупни протеини во мокрача за 24 часа после 4 недели (12.0 ± 2.03 mg/24 h), која беше уште повеќе изразена на крајот од испитувањето по 8 недели, кога вредностите на вкупни протеини во мокрача за 24 часа беа за приближно два пати поголеми од базалните вредности и изнесуваа 18.45 ± 3.21 mg/24 h (Сл. 5).

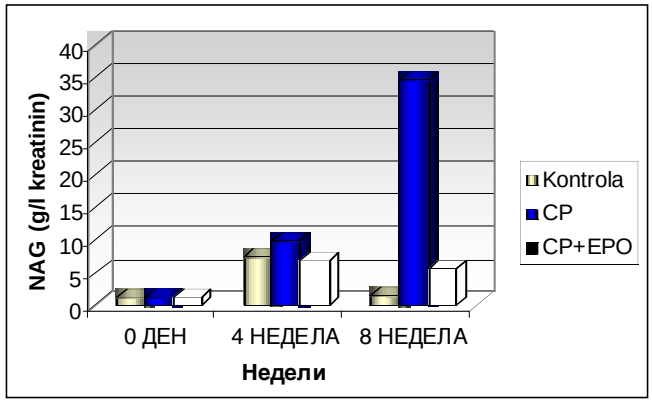
Како и во однос на останатите параметри, така и во однос на овој параметар епоетин алфа се покажа ефикасен, превенирајќи тешка протеинурија кај стаорците, при што лесно зголемување на вредностите на вкупни протеини во мокрача беше регистрирано само на крајот од испитувањето, кога



Сл. 4. Вредности на уреа во серум кај стаорците во текот на испитувањето (mmol/L)



Сл. 5. Вкупни протеини во урина за 24 часа кај стаорците во текот на испитувањето (mg/24h)



Сл. 6. Вредности на НАГ во урина кај стаорците во текот на испитувањето (U/g/креатинин)

просечните вредности изнесуваа 12.54 ± 2.01 mg/24 h, што е сигнификанто пониско ($p<0.01$) во однос на групата која примаше само цисплатин (Сл. 5).

Уринарна екскреција на NAG (N-Acetyl-b-D-glucosaminidase)

Уринарната екскреција на лизозомалниот ензим NAG се користеше како специфичен индикатор за тубуларни клеточни оштетувања. NAG се ка-

рактеризира со ренална тубуларна специфичност и е валиден индикатор за тубуларни оштетувања. Докажано е дека вредностите на NAG корелираат со соодветните морфолошки ренални тубуларни лезии индуцирани со различни механизми.

Кај животните од CP групата, вредностите на NAG во урина после 4 неделен третман со цисплатин, беа за приближно 3 пати зголемени во однос на базалните вредности и изнесуваа 3.49 ± 1.74 U/g creatinin. Во понатамошниот тек од испитувањето, вредностите на NAG во урина изразито се зголемија, при што истите на крајот од испитувањето беа за приближно 28 пати поголеми во однос на базалните вредности и изнесуваа 34.74 ± 23.61 U/g creatinin (Сл. 6).

За разлика од тоа, во CP + EPO групата, иако не беше комплетно превенирано зголемувањето на вредностите на NAG во урина, ова зголемување беше многу послабо изразено, при што просечните вредности на NAG во урина беа сигнификантно зголемени во однос на базалните вредности единствено при контролниот преглед на крајот од испитувањето, односно по 8 недели, кога изнесуваа 5.53 ± 3.97 U/g creatinin. Добиените резултати од оваа студија несомнено го потврдуваат фактот за изразита тубуларна токсичност на цисплатин, поради изразито високите вредности на NAG кај групата животни кои примаа само цисплатин. Истата иако не беше комплетно превенирана, во голема мера беше редуцирана со претретман со епоетин алфа, што укажува на негови тубуларно протективни ефекти.

Во оваа студија, за да се процени ефектот на епоетин алфа во превенцијата на нефротоксичност индуцирана од цисплатин, беше поставен експериментален модел на индуцирана нефротоксичност со цисплатин со негова долготрајна администрација во доза од 2 mg/kg/t.t./недела, во тек на вкупно 8 недели. Ваквиот режим на дозирање на цисплатин резултираше со развој на знаци и симптоми на нефротоксичност од умерен до тежок степен, кои беа манифестни по 4 недели, а уште по изразени на крајот од испитувањето, што укажува на кумулативниот карактер на нефротоксичноста на цисплатин. Механизмот преку кој цисплатин делува нефротоксично е доста комплексен и нерасветлен до крај. Додека екстензивните акутни оштетувања можат да предизвикаат некротична клеточна смрт, податоците од најновите истражувања покажуваат дека помалку тешките ренални оштетувања, кои и најчесто се среќаваат во модерната клиничка пракса, предоминанто се пропратени со апоптоза (програмирана клеточна смрт) на тубуларните епителни клетки (7, 8). Апоптозата на тубуларните епителијални клетки од пред неколку години се смета дека е најверојатно еден од најзначајните механизми преку кој цисплатин го манифестира своето нефротоксично дејство при негова повторувана администрација, покрај стварањето на метаболни нефротоксини (7, 8). Добиените резултати од оваа студија несомнено покажуваат дека еритропоетинот, односно епоетин алфа, иако не комплетно, во голема мера ја намалува и ублажува нефротоксичноста индуцирана со цисплатин и дека влијае исклучително поволно и на целокупната општа состојба на животните, превенирајќи и развој на анемија, која може да претставува додатна компликација и фактор за влошување на општата состојба. Ваквите добиени резултати се во согласност со најновите истражувања кои покажуваат дека епоетин алфа може да има значајна улога не само во тераписки цели, за корекција на разни видови на анемии, туку истиот може да биде ефикасен и како невропротектив (особено кај периферна невротоксичност индуцирана со цисплатин), потоа како хепатопротектив, кардиопротектив и особено значајно како нефропротектив кај нефротоксичност индуцирана од препарати на база на платина.

Нефропротективните ефекти на еритропоетинот, односно епоетин алфа не се комплетно разјаснети. Постојат повеќе хипотези кои сугерираат различни можни механизми за нефропротективните ефекти на еритропоетинот. Познато е дека еритропоетинот е цитокин, кој специфично ја регулира диференцијацијата и пролиферацијата на еритроидните прогениторни клетки. Пролиферативниот ефект на еритропоетинот е документиран и за други клеточни типови, како што се и ендотелните клетки (10). Овој пролиферативен ефект на еритропоетинот најверојатно се должи на фактот што ендотелните клетки исто така поседуваат еритропоетински рецептори (11, 12). По новите објавени податоци сугерираат дека тубуларните и мезангијални клетки покажуваат експресија на автентичен ЕПО-рецептор mRNA (13), поради што еритропоетинот би можел да се смета за ренотропен цитокин.

Влијанието на еритропоетинот на клеточната пролиферација може да се смета како еден од многу веројатните механизми на дејство на еритропоетинот, во превенцијата на нефротоксичност инду-

цирана од цисплатин, особено при употреба на повисоки дози, кога цисплатин го манифестира своето цитотоксично дејство, индуцирајќи некротични промени во проксималните тубули. Со своето стимулаторно дејство на диференцијацијата, пролиферацијата и регенерацијата на тубуларните епителни клетки, еритропоетинот може да влијае поволно на ваквиот вид на нефротоксичност.

Една од алтернативните хипотези која го објаснува поволниот ефект на еритропоетинот на бубрежните оштетувања, ги вклучува и неговите хемодинамски ефекти, иако тие не се јасно покажани. Во литературата, за еритропоетинот е покажано дека ја зголемува брзината на нефронската гломеруларна филтрација во кортикалните нефрони, но без да ја зголеми брзината на вкупната филтрација (14). Во акутните експерименти кај зајаци, еритропоетинот не индуцирал хемодинамски промени (15), но е покажано дека може да ја зголеми реапсорбцијата на натриум преку директно дејство на тубулите (16). Во студијата на Bagnis et al. 2001 (17), епоетин алфа ја зголемил брзината на гломеруларната филтрација, но дури после 9 дена, без притоа да влијае на висината на крвниот притисок.

Слично на акутните студии, и во хроничните студии, еритропоетинот ја зголемил брзината на реналниот крвен проток, но после 5 недели примена на епоетин алфа, иако овој ефект на епоетин алфа се очекувал порано (18). Значењето на овој механизам на дејство на еритропоетинот за сега останува се уште неразјаснет, бидејќи манифестацијата на хемодинамскиот ефект се очекува непосредно по започнувањето на третманот со еритропоетин.

Од друга страна, регистрираното анти-апоптотичко дејство на еритропоетинот на коскената срцевина, односно неговото стимулаторно дејство на единствениот за сега познат интраклеточен инхибитор на апоптозата - *bcl-2,* го прави мошне интересен и атрактивен лек кој може да се користи за инхибиција на апоптозата и во други телесни ткива и органи, особено за превенција на токсичност на лекови, во чиј механизам на токсичност апоптозата има значајно влијание. Знаејќи го механизмот на нефротоксично дејство на цисплатин, за кој се претпоставува дека во голема мера се должи на индукцијата на апоптоза при негова хронична администрација, логично се наметнува претпоставката дека еритропоетинот би можел да биде ефикасен во превенцијата на нефротоксичната и преку инхибиција на апоптозата индуцирана со цисплатин.

Заклучок

Резултати од оваа студија ја потврдуваат кумулативната нефротоксичност на цисплатин. Администрацијата на цисплатин во тек на 8 недели, во вкупна кумулативна доза од 16 mg/kg/t.t., резултираше со умерено изразени или тешки функционални бубрежни пореметувања кај сите стаорци кои примаа само цисплатин.

Епоетин алфа се покажа ефикасен не само во превенцијата на анемијата индуцирана од цисплатин, туку истиот, иако некомплетно, во голема мера ја превенираше и нефротоксичноста на цисплатин. Епоетин алфа сигнификантно ги ублажи функционалните бубрежни пореметувања индуцирани со долготрајната администрација на цисплатин, ја подобри општата состојба и го намалува морталитетот кај испитуваните животни, зголемувајќи ја толерабилноста кон повисоки дози на цисплатин. Потребни се додатни, специфични испитувања за да се утврдат прецизните механизми преку кои епоетин алфа ги остварува своите нефропротективни ефекти.

Литература

1. P.J. O'Dwyer, J.P. Stevenson, S.W. Johnson. In: Lippert B (ed) Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Wiley-VCH, Zurich, pp 29-70 (1999)
2. S. Ishida, J. Lee, D.J. Thiele, I. Herskowitz, *Proc Natl Acad Sci U S A,* **99,** (14298-14302) (2002)
3. X. Lin, T. Okuda, A. Holzer, S.B. Howell, *Mol Pharmacol*., **62,** 1154-1159 (2002)
4. A. Eastman, In: Lippert B (ed) Cisplatin:Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Wiley-VCH, New York, 1999; pp 111-135
5. Y. Sadzuka, Y. Shimizu, Y. Takino, S. Hirota, *Biochem Pharmacol*, **48,** 453-459 (1994)
6. Y. Sadzuka, Y. Shimizu, Y. Takino, *Toxicol Lett*, **70,** 211-222 (1994)
7. N. Ueda, G.P. Kaushal, S.V. Shah, *Am J Med*. **108,** 403-415 (2000)
8. J.S. Levine, W. Lieberthal, In Acute Renal Failure, Molitoris BA and Finn WF (editors), W.B. Saunders, Philadelphia, pp 30-59 (2001)
9. E. Horak, S.M. Hopfer, F.W. Sunderman, *Clin Chem.*, **27** (7), 1180-5 (1981)
10. Nagai T, Akizawa T, Nakashima Y, S. Kohjiro et al. *Nephrol Dial Transplant.*, **10** (10), 1814-9 (1995)
11. A. Anagnostou, E.S. Lee, N. Kessimian, R. Levinson, M. Steiner, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87** (15), 5978-82 (1990)
12. A. Anagnostou, Z. Liu, M. Steiner, K. Chin, E.S. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91** (9), 3974-8 (1994)
13. C. Westenfelder, D.L. Biddle, R.L. Baranowski, *Kidney Int.* **55** (3), 808-20 (1999)

14. A.D. Paixão, A.T. Ferreira, M.E. Oshiro, C.V. Razvickas, M.A. Boim, N. Schor, *Exp Nephrol.*, **6** (3), 245-52 (1998)
15. N. Nushiro, T. Sakamaki, J. Hoshino, T. Nakamura et al., *Hypertens Res.*, 18 (3), 203-7 (1995)
16. N. Nushiro, T. Sakamaki, S. Misawa, M. Seino et al., *Nippon Jinzo Gakkai Shi.*, **35** (2), 125-31 (1993)
17. C. Bagnis, H. Beaufils, C. Jacquiaud, Y. Adabra et al., *Nephrol Dial Transplant*. **16** (5), 932-8 (2001)
18. C.S. Wilcox, X. Deng, A.H. Doll, H. Snellen, W.J. Welch, *Kidney Int.* **44** (2), 430-5 (1993)

Summary

Epoetin alpha reduces cisplatin induced nephrotoxicity in rats

Dimche Zafirov[1], Jasmina Trojachanec[1], Nikola Labachevski[1], Petraki Korneti[2], Svetlana Cekovska[2], Igor Kikerkov[1], Emilija Atanasovska[1], Kalina Georgievska[1], Stojmir Petrov[1]

[1]Department of Preclinical and Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical faculty; "Ss Cyril and Methodius", 50 Divizija b.b., 1000 Skopje, Macedonia.
[2]Department of Medical and Experimenthal Biochemistry, Medical faculty;"Ss Cyril and Methodius", 50 Divizija b.b., 1000 Skopje, Macedonia.

Key words: *epoetin alpha, cisplatin, nephrotoxicity, rats.*

Clinical efficacy of cisplatin as antitumorous drug is indisputable; but its use is dose-limited due to its association with severe nephrotoxicity. The latest researches have demonstrated that epoetin alpha might have an important role not only in therapeutic aims for correction of different types of anemia, but in could also be efficient as neuroprotective, hepatoprotective, cardioprotective and especially as nephroprotective drug in neprhotoxicity induced by agents based on platinum.

The main aim of this study was to determine the effect of epoetin alpha in prevention of nephrotoxicity induced experimentally in Wistar rats by long-term administration of cisplatin at dose of 2 mg/kg/b.w./per week during a period of 8 weeks. The results obtained have shown that epoetin alpha significantly alleviates the functional renal failure induced by long-term administration of cisplatin and improves the general condition as well as reduces the mortality in examined animals.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 49-56 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 615.11 „11“

Professional paper

Pharmaceutical forms in Antidotarium *Nicolai*

Marta Pocuca[1]*, Dragan Stupar[2]

[1]*Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Serbia*
[2]*Faculty of Pharmacy, Univrsity of Belgrade, Vojvode Stepe 450, Beograd, Serbia*

Received November 2005, accepted June 2006,

Abstract

Pharmaceutical forms are equally important as pharmacodynamic effect of drug for expression of therapeutic effect. Antidotarium *Nicolai* was the first pharmacopoeia written in the beginning of the 12th century by Nicolaus Salernitanus. Pharmaceutical forms were not described clearly in terms of type, structure, technological process and application. Salerno's pharmacotherapy, as it can be seen from the Antidotarium, was based on "sugar-honey pharmacy" and the only difference between pharmaceutical forms was viscosity of forms.

The following forms are described in the Antidotarium: *electuaria, morsuli, pillules, trochisci, sirupi, emplastra, unguenta* and *olea.*

Antidotarium *Nicolai* is of unique importance since it is the first attempt of systematisation of pharmaceutical forms. Although today's criteria differ significantly from Nicolaus's, this book still has a great value as it represents the basis for all further pharmacopoeias written many years after Antidotarium *Nicolai*.

Key words: pharmaceutical forms, Antidotarium *Nicolai, electuaria, pillules, emplastra, unguenta*

Introduction

Antidotarium *Nicolai* was the first pharmacopoeia written in the beginning of the 12th century. The book was written by a medical school teacher in Salerno, Nicolaus Salernitanus. A popular legend says that Salerno Medical School was founded by four masters: Latin, Greek, Jewish and Arab (1). Historical evidence of the activity of the Salerno School of Medicine date back to the 10th century, though the most productive period of the Salerno masters was between the 11th-13th centuries (2). The School was much respected already in 904, and its students were welcomed at the French royal castle (3). The students studied medicine and surgery for five years and practiced for one year under a supervision of an experienced physician (4). Salerno made contributions to medical knowledge until 1811, when it was closed by Napoleon (5).

Nicolaus was asked by his students to systematize the curriculum regarding preparation of the pharmaceutical forms. Nicolaus chose 142 prescriptions out of 1000, and introduced regulations concerning the parts of medicinal herbs and quantities used. This made the curriculum clearer by far. He also introduced the new measurement system, which enabled preparation of small quantities of pharmaceutical forms. In Hilandar Medical Codex, the most famous reminded of Serbian medieval medicine science, from the beginning of the 16th century, transcriptions from Antidotarium *Nicolai* (6) as well as from Antidotarium N. Praepositus (7) were clearly recognizable. Prescriptions from Antidotarium *Nicolai* were partly presented even in pharmacopoeias from the 17th and 18th century (8).

Nicolaus classified the pharmaceutical forms by alphabetical order of their names, so that one cannot define which of the pharmaceutical form is in question. The only exceptions are those wearing the form in their names, e.g. *Pillulae aureae*.

The Antidotarium *Nicolai* does not contain clear descriptions of the type and content of pharmaceutical forms, neither the procedure of preparation, or their application. The medicine marked as *electuaria* might be an unguentum, a suppository or a potion, so that all the efforts to systematize the remedies on the basis of pharmaceutical forms turned out to be unsuccessful.

* e-mail: martapocuca@gmail,com
phone: +381 21 472 0612; fax: +381 21 472 0613

The form of a remedy is a term of newer date, and it describes the appearance of the medicine applied to a patient as well as the place and manner of application. As the medicines exist for ages, the pharmaceutical forms have been in use ever since, although under different names. Im the beginning, they were named *"potion"* or *"dish"*, and their preparation and contents included different magic rituals.

The first written texts from the medicine domain, the old Babylon and old Egyptian readings from the 17th to 7th century BC point out to a variety of different medicines: potions, unguenta, cataplasms, bandages, tampons, clysters etc. These forms were also described in the early written forms of "Corpus Hippocraticum" (5th - 4th century BC).

The Salerno pharmacotherapy, as can be concluded from Antidotarium *Nicolai*, was based on the *"sugar-honey pharmacy"*, introducing the spirit of wine in pharmacy, and preserved until the 19th century. If analyzed more thoroughly, the Antidotarium appears to be very monotonous. Apart from a few exceptions, all remedies are mixtures of drugs, honey or sirupus. The only difference among them, technologically, lies in the viscosity of certain medicines. However, this significant distinction cannot be determined, as there is no precise description of ingredients, and the viscosity of used honey or sirupus is not known.

Discussion

There are following pharmaceutical forms found in Antidotarium *Nicolai*: *electuaria, morsuli, pillules, trochisci, srupi, emplastra, unguenta* and *olea.* Some of these pharmaceutical forms have been preserved up to the present time.

Electuaria: The term *electuaria* comes from the Greek noun *ekleikton*, meaning *"something to be licked"*. Regarding the application of this dgug, in "Corpus Hippocraticum" it is says: *"The patient should lick the remedy along with honey"*. Such form of application is very rare and is hardly mentioned in the later Greek documents.

In the 13th century, electuaria was defined in the following way: *"Electuaria is named like that because it is prepared from elected (electis) drugs."* In his work *"Compendium Aromatariorum"*, Saladin from Ascolo explained that the term electuaria signifies *"elected from diverse"*, as *electuaria* is prepared from many different ingredients. Such definition of *electuaria* became relevant in the period when *electuaria* started to be the best-known and most respected pharmaceutical form. They were permitted to wear a label "elected", while the licking remedies were already out of use.

Up to the 4th and 5th century, the *electuaria* distinctive features were: 1. determined indication – lung diseases, 2. honey as vehiculum, and 3. the particular application method – "licking". In the following centuries, two features changed: the indication did not cover lungs and thorax diseases only, but is was indicated for almost all other diseases. The application method, after which the remedy got its name, also changed – *electuaria* could applied in all other application ways, except by licking.

The transformation (change of function) of *electuaria* occurred most probably in the 3rd or 4th century, when it was noticed that the fruits mixed with honey could be preserved for a longer period of time and be used in medical science. The use of *electuaria* was guaranteed once honey, and the whole mass, reached a certain *"densitas"*, in Antidotarium *Nicolai* marked as *"tehnicus viscocitas"*. Honey was taking over the role preservative, it corrected the taste of licking remedies and the medicinal substances were chosen to be applied in cases of all diseases. It seemed that the preparation was so simple, that neither Antidotarium, nor other medical documents paid too much attention to detailed preparation descriptions. However, *electuaria* is the pharmaceutical form most frequently prescribed to patients. In Antidotarium *Nicolai*, there are only 5 *electuaria* listed. According to the meaning of the pharmaceutical form, there are at least 75 *electuaria* out of 142 remedies. There are other proofs showing there were many more *electuaria* – prescription issued later that contained medicines sorted by diagnoses, indications or forms, and not by alphabet.

The difficulties in setting up criteria on *electuaria* preparation rise from the fact that there have been no detailed preparation descriptions, nor their clear definition. The additional obstacle lies in the impossibility to find out the contents of *electuaria* purely from its name. Although *electuaria* were the most frequently used medicines, they have remained mysterious. Approximately 50-60 different drugs were named *electuaria*, which probably were not simply mixed with honey. It is known that with some other remedies, special attention is paid to the sequence of certain drugs. In the preface of Antidotarium *Nicolai*, it is emphasized that in the preparation phase of certain *electuaria*, the drugs should be grinded and sifted, while some other drugs should remain in bigger pieces, which is particularly important for *electuaria* used as a laxative. Instead of describing the preparation proces, the kind and origin of honey are described. In the preface, it is also emphasized that honey should not be too liquid, nor too hard, and that honey is the best preservative. Arnalds from Villanova gave a description of the honey viscosity test. Honey is proper-

ly cooked and ready to use once one drop of it falls on the marble tile and does not spread. Saladin from Ascolo also paid special attention to honey. He described the quantity of drugs goes into 500 g of honey – each 500 g of honey is added to 2 ounces of drugs, and 3 ounces of drugs in laxatives in winter period. Finely, grinded drugs are added to *electuaria*, when removed from fire, so that the drugs would not lose its effect. These explanations are of newer date. In Salerno documents, there was no significant information on preparation of *electuaria*.

In Antidotarium *Nicolai*, *electuaria* have various consistencies, so that they can be grated, cut in small pieces and used as suppository, spread in the form of unguentum or swallowed as tablets. The issue here is not about the unique form of application - it is about the method of preservation.

The last *electuaria*, *"electuaria theriacale"* in DAB 6 become official in 1968, and in DAB 7 it was canceled as remedy.

Morsuli: The term *morsuli* is not used in Antidotarium *Nicolai*. There are, however, four remedies, deserving to wear that title. They is a special kind of *electuaria*, whose mass is so viscous, that it can be cut by knife. The same method of preparation is used for *"Quittenkonfekt"* – quince dessert. Once a certain quantity of drugs is mixed with honey and cooked for some time, the mass is poured onto the marble tile and let cool down; it can be cut by knife in smaller pieces. Two *stomahica* remedies were prepared in such way, using sugar and rose water as vehiculum, instead of honey. The cooked mass used to be poured onto the marble tile, previously lubricated by rose oleum, and then it was made thinner. Once the mass turned cold, it was cut by a knife dipped in rose oleum. In the 17th century, the form of sugar bonbons – confetti was very fashionable. Both *pillules* and *morsuli* are precursors of tablets. They differ from *electuaria* only in viscosity and appearance.

Pillules: *Pillules* used to signify a symbol in pharmacy. Prior to the invention of ttablets was invented in 20th century, *pillules* presented a privileged form of a medicine. Later, the hormones chemistry pays a special attention to *pillules*. In the ancient medical documents, *pillules* were mentioned without any significance. The Babylon term *kupatinnu*, meaning *"mixed, squeezed and rolled up"* does not clearly describe the shape. The criteria defining a *pillule* are missing: the exact contents and dosage, as well as expiry date. These criteria are not important, as the prepared pillules used to be swallowed immediately. The drugs used to be rubbed with flour into *pillules*, and dipped into honey before swallowing.

Among several hundreds of *Corpus Hippocraticum* prescriptions, there are only a dozen for *pillules*. The term *katapoton* marked *"all that is to be swallowed"*. Celsus adopted the Greek word *catapotium* and did not write much about preparation of pillules. He devoted his attention to their effects – he described *painkiller pillules, sleeping pillules, anticoughing pillules*, which were the size of peas or beans. Galen also hardly described *pillules*, but he mentioned them frequently. The doctors of Old Greece wrote about *pillules* quite frequently. There were prescriptions for *pillules anti- diarrhea*, the size of a berry. The drugs used to be chopped up, then mixed with honey and swallowed with warm water. However, there is neither weight nor number of ingredients mentioned in these prescriptions. There is no information on dosage or how long a patient should continue to take them. It is to be supposed that *pillules* were intended for immediate consumption.

The number of *pillules* to be prepared is often described as the quantity the patient should take in one day. One can only presume the dosage for longer period, based on the quantity of drugs and on the indicated size of the *pillule* (size of peas, drachma weight). The drugs were usually mixed with some viscous liquid (plant juices, honey) and out of the mass the *pillules* were made (*facere, conficere*). In several cases, *pillules* were taken sublingually. In some segments of these documents, the remedies having the same form as *pillules* are called *trochisci*. According to Antidotarium *Nicolai*, *trochisci* are not swallowed by a patient, but theywere used for preservation.

In Antidotarium *Nicolai*, the preparation of the first *pillules* is described, and all the others should have been prepared according to the given example. The preparation was quite simple: the drugs were mixed with a large quantity of vehiculum, so that the mass could be formed by hands. To prevent sticking of mass to hands, it was necessary to use oleum spread on hands before the process. The size, i.e. weight of a *pillule* was indicated. *A pillule "sine quibus ess nolo"* weighs 3 ounces, i.e. ca 75 g. The *pillules* were the size of peas and out of such mass one could make 100 – 150 *pillules*. There were 10 *pillules* per dose.

Some more detailed descriptions of *pillules* were written later on, containing also the indication of the expiry date.

Figure 1 shows the original instruction for the *Pillulae auree* preparation – Antidotarium *Nicolai*.

Trochisci: *Trochisci* resemble *pillules*, but their background is quite complex, as the same term was used to denote several things. The early remedies that resemble *trochisci* are mentioned in *Corpus Hippocraticum*. These medicines were made of drugs, in the shape of a dense extract or a moist mass, formed into *"pastille"* and kept until consumption. The pastilles were not for internal use, but presented a method of preservation. Before use, they were supposed to be moistened and put on the sore point. Celsus gave the same explanation of his pastilles *(quos trochiscos Graeci vocant)*. There were regulations for forming the drugs mass without fat that dries off, which can be dipped into vinegar or wine before use. It can be applied to different sore points as fatless cream. There was one exception from this Celsus concept – one regulation describes a pastille to be used internally, when a patient suffers from stone in the bladder. This recipe contains the weight of a pastille as well.

Celsus supposed that *pastilles* were called *trochisci* by Greeks. The Greek name was preserved to the newer date, whereas the Latin word *pastillus* is used today to mark the sucking tablets. Galen used the terms *small circle* or *bun* in his book about *Theriak Andromachus*, which is important for the definition of the term and history of *trochisci*, and contains three forms of pastilles: *pastilles eyelashes, Scilla pastilles and Hedzchroon.*

In Antidotarium *Nicolai*, there are 8 *trochisci* remedies. The *"confection gallies muscatel"* belongs to the same group, according to the form of *trochisci.* These remedies were actually a particular means for preservation, which should be mixed with drugs at certain moment and processed into *confectiones magne*. With *gallie muscate "Que intrat in preciosissimis medicines et electuaris"*, the preparation was pretty clumsy. First, the *trochisci* of mastix, rubber and camphor were made with rose water, the mass was dried in shade, and then grated and mixed with drugs. The mass was then kneaded by hand and again *trochisci* were formed, with a concave part and clearly defined weight of 1.5 drachma. At the end, they were covered with musk deer and rose water.

Other *trochisci* that are precisely described are *trochisci diarodon* and *trochisci de tyro*, and they served probably as an integral part for preparation of other remedies. There are no recipes of other remedies that would reveal their preparation, nor description of indications. There is, however, information on *trochisci anis*, that helps overcome the water disease. The application of all *trochisci* is equal – the drugs were formed into *trochisci* by use of some liquid (wine or plant juice), dried in shade and kept before use. In some recipes, the weight was marked in relation to drachma. There was no particular information on external use.

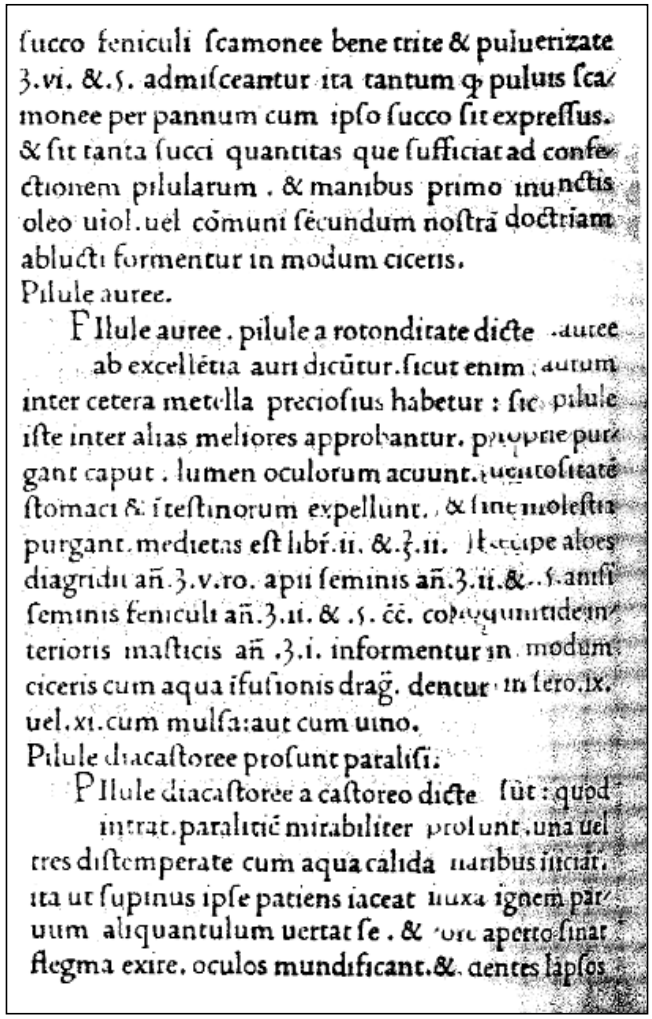

succo feniculi ſcamonee bene trite & puluerizate
3.vi. &.ſ. admiſceantur ita tantum q̄ puluis ſca-
monee per pannum cum ipſo ſucco ſit expreſſus.
& ſit tanta ſucci quantitas que ſufficiat ad confe-
ctionem pilularum . & manibus primo inunctis
oleo uiol. uel cōmuni ſ̄ecundum noſtrā doctriam
ablucti formentur in modum ciceris.
Pilule auree.
PIlule auree . pilule a rotonditate dicte auree
ab excellētia auri dicūtur. ſicut enim aurum
inter cetera metella precioſius habetur : ſic pilule
iſte inter alias meliores approbantur. propriē pur-
gant caput . lumen oculorum acuunt. ſtomachi
ſtomaci & ī teſtinorum expellunt. & ſine moleſtia
purgant. medietas eſt libr. ii. &.ʒ. ii. Recipe aloes
diagridii añ.ʒ.v.ro. apii ſeminis añ.ʒ.ii.&.ſ. anīſi
ſeminis feniculi añ.ʒ.ii. & .ſ. cc. coloquintide in-
terioris maſticis añ .ʒ.i. informentur in modum
ciceris cum aqua iſufionis dr̄ā. dentur in ſero.ix.
uel.xi.cum mulſa:aut cum uino.
Pilule diacaſtoree proſunt paraliſi.
PIlule diacaſtoree a caſtoreo dicte ſūt : quod
intrat. paralitic mirabiliter proſunt. una uel
tres diſtemperate cum aqua calida manibus fiāt.
ita ut ſupinus ipſe patiens iaceat iuxta ignem par-
uum aliquantulum uertat ſe . & ſic aperto ſinat
flegma exire. oculos mundificant.& dentes lapſos

Fig. 1. Copy of the original instruction for the *Pillulae auree* preparation – Antidotarium *Nicolai.*

During the 19th century, the term *trochisci* ceased to exist.

Sirupi: The preparation of *sirupi*, whose main ingredient is sugar, began after sugar started to be used in the Arabic medicine. A part of Sicily and South Italy are considered to be the first region where syrups were used. The term *„sirupus"* comes from the Arabic word *sarab*, meaning *a potion, a drink.* In western medicine, the word *„sirupus"* was used for the first time in medical documents in Salerno. It is not, however, clear, how the word was introduced in Latin.

Today, only *Sirupus simplex* has some significance in pharmaci. The same term was used in middle ages to describe a potion containing a mixture of drugs, the vehiculum consisting of sugar and water. The potion made only of sugar and water was unknown.

In Antidotarium *Nicolai*, there are 10 *sirupi* and 2 *sour sirupi*. The first *sirup* mentioned is *Sirupus rozaceus*, described in details. Its use was supposed to serve as on example for preparation of all other *sirups*: boiling water is poured over fresh roses; the pot is covered with a lid, so that the fragrance would not evaporate. When the content gets cold, it should be squeezed and strained. This water is poured over fresh roses for several times, until it becomes red. Sugar is added - to the quantity of 2 l, is added 1 kg of sugar is begin, and then the mass is cooked to boiling, as the mass is being cooked, the *sirupus* gets very viscous at the end. In the middle ages, the process of cooking was accompanied by clearing (clarification), in the following way: the egg white is beaten and mixed with a little bit of cold water, and then added to the boiling *sirup*. Once the black foam appears on the surface, it is removed by spoon, and the new beaten egg is added. This is repeated, until the foam remains white, and the *sirup* becomes clear. Such process of clearing is described in all Salerno prescriptions, with certain variations. In one of the prescriptions, it is noted that sugar should be mixed with the egg white before it is put into rose water. The drugs were most frequently added in the following manner: then were into linen bags and soaked into hot *sirup*, so that the "power" of drugs would pass into the *sirup*. At the end, the *sirup* was put through rough and then fine filters.

It is important to mention that general remarks regarding *sirup* preparations quote the *Rozen sirupus* by Nicolaus, as the example. *The sirupus is ready once the drop poured on the marble tile does not spread, or it remains hanging from the spoon, or is glued to one's nail*. The same goal is achieved when the *drop of sirupus drags or stretches between two fingers*. In our understanding, this viscosity is imprecise and variable, depending only on the examiner and the manner of examination. However, it is important to note that, *at sirupus preparation, examination and testing were required.* The viscosity examination was significant for preservation, as *sirup* could be preserved only at certain concentration (density). It appears that the clearing processes were strict, but they had a big role – sugar kept the *sirup* usable. In those times, there was no refined sugar, but only the raw sugarcane one. Sugar used to be the substitute for honey. Both sugar and honey were to have equal medicinal effects, but *sirups* with honey were prepared as well. Such *sirups* were supposed to be cooked more of ten thanthose with sugar. This was described by Nicolaus regarding the *Syrupus de papavere*.

If vinegar was used instead of water, the sour honey was produced, *oximel*, and the viscosity was kept within the prescribed limits. The *Oxi* remedy is technically the most difficult one to be prepared in the whole Antidotarium. There are several different operations to be performed to produce the *sour sirupus*. The fresh drugs were also gradually prepared. The systematization of these remedies is complex, so that they could be called *sour electuaria*.

*Emplastra***:** *Emplastra*, which are frequently bought in pharmacies today, are no longer produced in the old way, and differ a lot from the old *"emplastra"*. The significant difference lies in their purpose – today's emplastra mostly offer mechanical protection, and not treatment of the sore point.

In *Corpus Hippocraticum*, one cannot find the term, but there are some mineral substances that contain fat, and are applied externally, by putting them onto the sore point.

According to the descriptions by Celsus, in the 1st century, it was clear that the remedies contained resins, plant rubbers and lead, and oleum and wax were used as vehiculum. The preparation of *emplastra* was complex, as rubber or resin used to separate from vehiculum, and more than one operation was required.

In the 2nd century, Galen gave *emplastra* a significant role. In his register *"Medikamente nach den arte"* (Medicines According to Type), six out of seven books were devoted to *emplastra*. Galen used the Greek word *emplastera*. In many cases, it is clear that *emplastra* are made of mineral substances, oleum or unguentum.

In Antidotarium *Nicolai*, the prescriptions show the extremely difficult mode of preparation of this form. For *Emplastrum apostolocon*, the resin should be dissolved in wine (soaked until it becomes swollen), and then cooked until the wine evaporated. The mass was added sawdust of lead-oxide and lithargium with plenty of oleum. It was heated until the mass became as solid as wax. Then wax was added, as well as drugs, and cooked until the mass became homogeneous. Then the mass was then put into cold water, and kneaded by hands, to squeeze the water out. Magdaleon is formed, by hands lubricated with oleum. It was preserved in such form. Although the prescription is clearly described, only people who know the basic rules of *emplastrum* preparation could make them.

There are only three *emplastra* in Antidotarium *Nicolai*. Compared to the other remedy forms, they were less frequently used.

Until the 20th century, *emplastra* were described in books on medicines due to their chemical contents, i.e. salts of heavy metals and fat acids, along with the resins

and oleum which were also ingredients of an *emplastrum*. Today, *emplastra* are attached to the sore points and indirectly help healing. Therefore, it is not the type of remedy as it was in the past, when lead was one of its ingredients.

Unguenta: In Greek medicine, there was no clear definition on differentiating *unguenta* from other remedies for external application. In Salerno region, *unguentum* was not precisely described too.

In Salerno period, there was a rule saying that *unguentum* consists of oleum, wax and drugs, but it was not described in Antidotarium *Nicolai*. There were also *unguenta* without oleum or wax, but there was no recipe for *unguentum* without fat. To prepare *unguenta*, one could encounter difficulties when adding drugs, wax and fat, as the remedy was supposed to be smooth. The use of wax is justified, considering the climate of Salerno region. The wax kept the *unguenta* firm and preserved for longer period.

Unguentum Citrinum was explained by words: *"hoc modo fit"*: tragakanta was crumbled in a marble mortar by means of iron pestle. Other drugs were also crumbled in the same mortar, one by one, and then sifted through the fine linen sieve. The fat added was white pork fat, pork or goat lard, or chicken fat. The fat was heated in water bath, until it melted. It was then sifted through the linen sieve, and mixed with the drugs powder, except for camphor and borax. The mass should be stirred carefully, until it became homogeneous. It was then poured into a pot made of lemon wood, heated and stirred in water bath. When the water started boiling, the mass should be poured into another pot. Camphor and borax were added. The mass should be stirred until it grew cold. At the end of the recipe, there was a remark: "Remember to add 8 times 500 g for 500 g of drugs".

One of the oldest *unguenta* in Antidotarium *Nicolai* is *Unguentum marciaton*. This *unguentum* was also quite complex for preparation. Some of the plants listed were supposed to be collected in particular days in May, between 3 and 12 o'clock. The crumbled plants were put to soak in the best wine, for seven days. On the 8th day, the mass was heated, until the wine evaporated. Oleum was added and then the mass was cooked, until it significantly decreased in size. The mass was filtered carefully. The filtered oleum was cooked again, and resin (styrax) was added. When the mass was simmering, some butter or fat was added, then drugs and afterwards narden oleum, mastix and thyme, and wax at the end. Once the wax was melted and dissolved, the mass was removed from the fire and stirred until cool. The cold and dense remedy was kept in small pots.

There is a description for an emulsion, i.e. *unguentum* containing some water – *"Pappell" unguentum*. The drugs used to be macerated in oleum for 20 days, then crumbled and formed with fat into a magdaleon, which could be formed on not before 20 days later. Very often, the drugs were macerated in wine, which was later on cooked. There is also a description of a water extract remedy: 500 g of the remedy should be mixed with 2 times 500 g of oleum, and cooked until the juice on the surface evaporates.

In *Unguentum Laxativum*, some type of emulsifier was required. Before the preparation, juice and oleum were cooked, and when the mass was ready, wax and gall of a bull were added.

The first emulsion was *Unguentum alburu*, and oleum and rose water were the basis for the emulsion.

In Antidotarium, each *unguentum* was prepared according to a special recipe, and there were no general rules. The only conclusion about *unguenta* is that each remedy named *unguentum* contained fat and was applied externally.

The majority of *unguenta* contains the mixture of fat, oleum and wax, as a base. At the end, it is to be noted that *electuaria* (remedies for system use) were occasionally used as *unguenta.*

Unguenta and *emplastra* belong to the pharmaceutical forms whose application is described very precisely. For each of the *unguenta*, there is a thorough instruction on its application. Very often, there are several processes of preparation listed, but recipes differ among themselves.

Olea: When talking about *olea*, it becomes clear that there is a thin borderline between the two usages – the one in science/treatment, and the domestic one. Many *olea* are used daily as food products. The medicinal *oleum*, as a remedy, will be discussed hereafter.

In Hypocratic medicine, there were many types of *olea* and oily mixtures in use. There were a few recipes for preparations of *olea*, and terminology varied, so that there was no clear picture on these remedies.

In Latin, there are two different terms: *unguentum* and *oleum*. It seems that Celsus did not pay special attention to *olea*, whereas Marcellus Empiricus named many *olea*, originating from different drugs.

The Greeks used to call the remedies *myra*, and in Salerno literature they used to be called *oleum*. Whatever

their name was, several types of olea were soon distinguished. *Compendium Magister Salernus,* which was written at the same time as Antidotarium *Nicolai,* contains several chapters on *olea*. It has been established that the production of *oleum* from dried drugs differs from that produced from the green plants. The dried drugs are cooked in oleum and then filtered. The fresh drugs are poured in a pot, along with the oleum. The pot is put into another pot with water. The pot with water is heated, paying attention that the water does not come into the pot with drugs and oleum. Magister also lists the *mixed oleum,* called *Oleum laxativum,* according to its indication. It is important to mention that the text describes the first destillation of ethereal oleum. It is a very simple preparation of *Oleum Juniperi*.

Olea listed in Antidotarium *Nicolai* can be classified in two groups: olea produced from only one drug (there are five olea of this kind: *Olea rosatum, sambucinum, violaceum myrtinum and commomellinum*) and the complex medicinal olea (they are *Oleum mandragoratum and Oleum frigidissimum*).

The preparation method for the first group of *olea* is described with *Oleum rosatum.* One liter of clear olive oleum was mixed with 750 g of roses, torn apart a little bit. The pot with such mixture was put into water bath. It was cooked until two thirds of the whole quantity evaporates.

Oleum camomellinum was prepared in a slightly different way. 250 g of chamomile picked in July was put into a glass jar with oleum. The jar was exposed to sun, tightly closed. Forty days later, the oleum was ready for use.

Oleum mandragoratum required drugs with strong effect: mandrake juice, henbane juice, poppy cocoon juice and pomegranate juice. All juices were poured into oleum, exposed to sun for 10 days and occasionally stirred thoroughly. On the 11^{th} day, the mixture was cooked until all the juices were boiled. The mass was then removed from fire and cooled. At the end, other drugs were added, e.g. opium. The last sentence of the monograph gives this *oleum* a different name - *unguentum*.

Oleum frigidissimum (cooled) consisted, besides others, from very strong drugs, which were cooked with oleum, until the juice vanished. After cooling, it was necessary to wait until the drugs settle, and only the light fluid of supernatant was to be used.

Conclusion

For a remedy to demonstrate its therapeutic effect, both its pharmaceutical form and the pharmacodynamic actions are equally important.

Out of all pharmaceutical forms described in Antidotarium *Nicolai*, the following are not in use any longer: *electuaria*, *morsuli* and *trochisci*. These forms are particular for their various methods of application. Today, each pharmaceutical form is used in one determined way only. The consistency of *electuaria* allows them to be grinded, cut in small pieces, to be used as suppository, spread as unguentum or swallowed as a pillule. In essence, it is not the unique form of the remedy to be applied in one way only, but the method of preservation. *Morsuli*, is a special form of *electuaria,* whose mass is so viscous that it can be modeled and cut by knife. *Trochisci* resemble *pillules,* but the term designates a form of preservation, and not a shape of a medicine.

Other pharmaceutical forms presented in Antidotarium *Nicolai,* except for *electuaria, morsuli* and *trochisci,* have been in use up to date.

Antidotarium *Nicolai* is a unique book, being the first effort to systematize the pharmaceutical forms. Although the modern criteria for systematization differ greatly from Nicolaus's, the book is of priceless value and presents the basis for all other pharmacopeias written many years after Antidotarium *Nicolai.*

References

1. L. Glesinger, *Povijest medicine,* Š kolska knjiga, Zagreb 1978, pp 95-102
2. M. Pasca, The Salerno School of Medicine, *Am J Nephrol,* 1994, **14** (4-6), pp 478-482
3. A.S. Lyons and R. J. Petrucelli Medicine, *An Illustrated History,* Harry N. Abrams, New York, 1978, pp 319-321
4. H. Tartalja, *Pravila Salernske medicinske škole, Saopstenja* PLIVA, pp 119-126
5. M.T. Southgate, *Salerno-Something Old, Something New,* JAMA, June 19 1967, Vol 200, No 12, pp
6. R. KatiC, Uvodna studija, Hilandarski medicinski kodeks N.517, Narodna biblioteka Srbije, Beograd 1989, pp 503
7. J. Maksimovic, Farmakoloski spisi stare srpske medicine, Pharmaca Iugoslavica **33**, 1995, pp 55-58
8. D. Goltz, Mittelalterliche Pharmazie und Medizin, Dargestellt an Geschichte und Inhalt des Antidotarium Nicolai, Wissenshcaftlishe Verlagsgeselschaft MBH, Stuttgart, 1976

Резиме

Фармацевтско дозирани форми во Antidotarium *Nicolai*

Марта Почуча[1*], Драган Ступар[2]

[1]*Медицински факултет, Универзитет во Нови Сад, Хајдук Вељкова 3, Нови Сад, Србија*
[2]*Фармацевтски факултет, Универзитет во Белград, Војводе Степе 450, Белград, Србија*

Фармацевтско дозираните форми имаат подеднакво значење како и фармакодинамскиот ефект на лекот за постигнување на бараната терапевтска ефикасност. Antidotarium *Nicolai* е првата фармакопеја, напишана на почетокот на XII век од страна на Nicolaus Salernitanus. Во истата, фармацевтско дозираните форми не се јасно раздвоени по однос на видот, структурата, технолошкиот процес и апликацијата. Салерновата фармакотерапија се базирала на т.н. "шеќер-мед фармација" и единствена разлика меѓу фармацевтско дозираните форми била вискозноста на препаратот.

Во Antidotarium *Nicolai* се опишани следниве фармацевтски форми: *electiaria, morsuli, pillules, sirupi, emplastra, unguenta* и *olea*. Иако денешните критериуми значително се разликуваат од оние опишани во Antidotarium *Nicolai*, оваа книга е од огромно значење бидејќи претставува основа на сите други фармакопеи напишани многу години подоцна по Antidotarium *Nicolai*.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 57-64 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 582.794.1-14

Стручен труд

Морфолошко-анатомски карактеристики на корен и херба од *Eryngium campestre* L. (Apiaceae)

Флурим Небија[1], Ѓоше Стефков[2], Марија Карапанџова[2], Билјана Бауер Петровска[2], Светлана Кулеванова[2]*

[1]*Медицински факултет, Одсек Фармација, Универзитет во Приштина, Косово*
[2]*Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија*

Примен декември 2005, прифатен април 2006,

Апстракт

Извршено е проучување на морфолошко-анатомската градба на коренот и хербата од растението *Eryngium campestre* L., Apiaceae. Дефинирани се елементите што се значајни за идентификацијата на дрогата: кај листовите дебела кутикула, мезофил со изолатерална градба, со палисадно ткиво на горната и долната страна на листот и со многу редуциран сунѓерест паренхим; карактеристичен распоред на механичко колемхинско ткиво, особено во листовите, карактеристични набори на кутикулата на листовите. Во прашокот од хербата се издвојуваат фрагменти од трахеите со специфични прстенести набори, делови од епидермисот со стомите, друзи и коленести механички влакна со специфична форма. Кај коренот и кај стеблото карактеристични се секреторните канали и присуството на големи количини на друзи од калциум оксалат. Дополнително, кај коренот се забележува типичен распоред на ткива што е карактеристичен за секундарна градба на корен, со срцевински зраци во дрвото и во кората, млечни цевки, перидермис на периферија, карактеристичен распоред на спроводни снопчиња и голем број друзи, особено во дрвото. Во прашокот од коренот се издвојуваат фрагменти од трахеи со спирални задебелувања, фрагменти од перидермисот и од плутата, делови од паренхимот на кората со друзи и поединечни друзи.

***Клучни зборови**: Eryngium campestre*, микроскопија, морфолошко-анатомска градба, идентификација.

Вовед

Родот *Eryngium* опфаќа околу 220 вида од кои дел се распространети во Европа, особено во областа на Медитеранот. Најраспространет вид е *Eryngium campestre*, во Македонија познат како ветрогон, волско трње, бел трн или сикавица (1, 2).

Eryngium campestre L. (Apiaceae) е повеќегодишно бодликаво растение, со долг, цилиндричен до вретеновидно-задеблен корен. Има исправено стебло, високо од 30-70 cm, во горниот дел и особено во зоната на соцветието силно пересто разделено. Листовите се кожести со истакнати или бодликаво-назабени делови, при основата со долги дршки, тројно до двојно пересто нарежени. Лисните дршки се куси или листовите се седечки и го опфаќаат стеблото. Цветовите се собрани во збиени, јајцевидно-сферични главички, разместени во сложени штитовидни соцветија. Обвивката на главичките е составена од 5-7 линеарно-ланцетовидни бодликави ливчиња, 2-3 пати подолги од главичките. Прицветните листови се ланцетовидно-шилести и цели. Чашкините ливчиња се ланцетовидни, на врвот шилесто-заострени. Венечните ливчиња се белузлави, покуси од чашкините. Плодовите се елипсовидни, покриени со белузлави лушпи (2, 3).

Растението се среќава по суви, тревести и каменести места, по пасишта и ливади, крај патишта и железнички пруги, по рамнини и висорамнини, до 900 m надморска висина (3, 4).

Во народната медицина кај нас и кај другите народи во Европа се користи коренот, *Eryngii radix* и сув надземен дел, собран во фаза на цветање, *Eryngii*

* svku@ff.ukim.edu.mk

herba. Двете дроги се користат главно за третман на инфекции на уринарниот тракт, за регулирање на нарушена функција на простатата, при воспаленија на горниот респираторен тракт, при бронхитис, настинка, кашлица, за третман на нарушена функција на бубрезите и за зголемно лачење на урината, за исфрлање на камен и песок од бубрезите и од мочниот меур, при бубрежни колики, тешко уринирање, задршка на вода и други состојби (5, 6).

Дрогите *Eryngii radix* и *Eryngii herba* се малку проучени. Во поглед на испитувањата на хемискиот состав, посебно се интересни низа податоци што се однесуваат на проучувањето на сапонинските (7-11) и на флавоноидните компоненти (12-17). Од другите компоненти значајно е присуството на различни кумарини (18), пиранокумарини (19), ацетилени (фалкаринол, фалкаринон и сл.) (20, 21), шеќерни алкохоли (14, 22) и друго. Во поглед на биолошката и фармаколошката активност, во литературата можат да се најдат податоци што се во согласност со употребата во народната медицина, особено во третманот на инфекциите и другите заболувања во урогениталниот тракт (6, 23, 24).

Морфолошко-анатомските карактеристики на коренот и хербата од *Eryngium campestre* се малку проучени (3, 6) и податоците во литературата се недоволни за валидна макроскопска и микроскопска идентификација на дрогите. Целта на овој труд е проучување на морфолошко-анатомската градба на двете дроги и дефинирање на макроскопските и микроскопските карактеристики што би можеле да се користат во фармакодијагностички цели.

Експериментален дел

Растителен материјал

Во испитувањето се вклучени сув надземен дел *(Eryngii herba)* и исушен корен *(Eryngii radix)* од растението *Eryngium campestre* L. *(*Apiaceae*)*. Хербата е собрана од растенија во цвет, преку лето, на три локалитети во Косово, во 2002 и во 2003 година. Коренот е ископуван во рана есен, од растенијата кои биле маркирани во текот на летото, од истите локалитети на кои била собирана и хербата.

Методи

Макроскопските карактеристики на дрогите се утврдени со органолептички преглед на истите (25).

Морфолошко-анатомските карактеристики на дрогите се утврдени со микроскопска анализа на пресек од корен, лист и стебло, како и со микроскопски преглед на дроги во прашок (херба и корен) (25, 26). За документирање на резултатите извршено е фотографирање на микроскопските слики.

Постапка: растителните органи до микроскопските анализи се чувани во 96% алкохол во затворени садови. По изработката на напречниот пресек на коренот, стеблото и листот со помош на рачен микротом, тенките пресеци се префрлени на саатно стакло на кое е додаден заситен раствор од хлорал хидрат. После 24 часа е извршено микроскопирање и фотографирање (26).

За испитување на површината на горниот и долниот епидермис, листовите се сечени во големина од околу 0,5 cm и префрлени во сад во кој се додава концентриран H_2O_2 и неколку капки 5% KOH со намера да се разори хлоропластот. После овој процес (кога парчињата од листот ќе ја изгубат зелената боја), парчињата од листовите се префрлаат во садот на кој има раствор на хлорал хидрат и таму остануваат додека не станат прозирни. На крајот лисните парчиња се ставаат на микроскопско стакло на кое претходно се става капка глицерин, а на крајот се покрива со покровно стакло и се микроскопира (26).

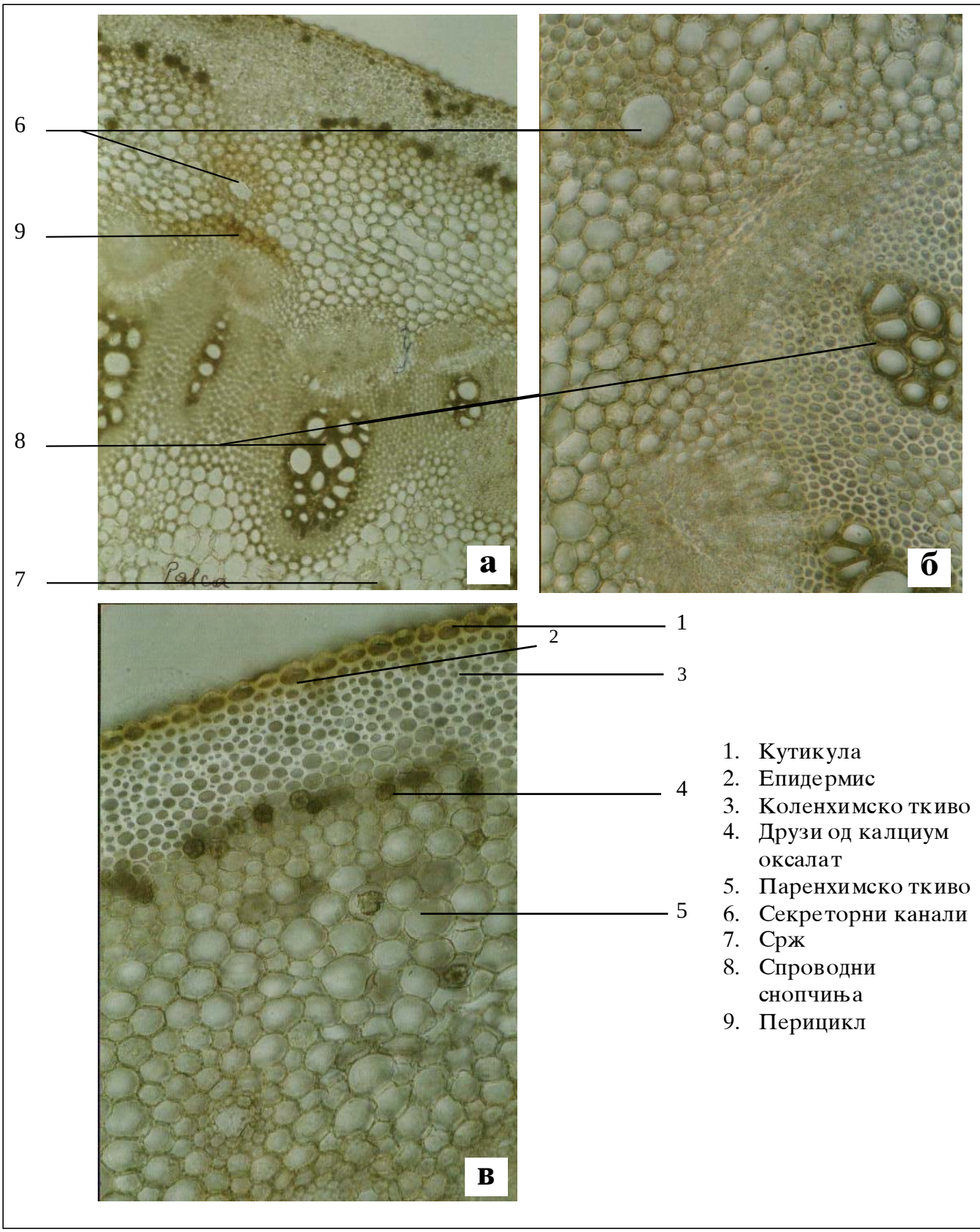
Реагенси: Хлорал хидрат, глицерин, концентриран H_2O_2, KOH.

Апарати: Рачен микротом, OLIMPUS UNIVERSAL RESEARCH MIKROSKOPE модел VANOX, CAMERA 35 mm back with automatic film Advance (C-35A).

Резултати и дискусија

Макроскопски карактеристики на дрогите

Eryngii herba: дрогата се состои од исушени, цели, поретко искршени стебла со соцветија и листови. Стеблените делови се долги 20-30 cm, а 0,5-1,5 cm дебели, во зоната на соцветието мазни или фино надолжни, како цели се забележуваат околу соцветијата, седечки или со куси дршки кои го опфаќаат стеблото. Листовите се најчесто триделно длабоко засечени и силно бодликави. Цветовите се собрани во збиени главички на врвот, со долги дршки, кои излегуваат од пазувата на листот. Главичките во основата се заобиколени од 5-7 ланцетни, линеарни, цели и на врвот бодликави ливчиња, 2-3 пати подолги од соцветието. Прицветните листови се ланцетно-шиловидни, цели и силно збиени. Стеблото е белузникаво, а листовите и соцветијата се сиво-зелени. Дрогата е без мирис и вкус.



Слика1. Микроскопска анализа на пресек од стебло на *E. campestre* (а и б - пресек во зоната на перицикалот, в - пресек во зоната на надворешните ткива).

Eryngii radix: дрогата се состои од исушени, исечени корени, со должина од 10 cm и различна дебелина. Парчињата се цилиндрични, мазни или набраздени, а некои се покриени со влакнести лушпи. Преломот е белузникав и влакнест. Коренот одвнатре е белузникав, а однадвор е кафеав. Дрогата има слаба, карактеристична миризба и лесно горчлив вкус.

Микроскопски карактеристики на дрогите

Eryngii herba (sumitas)

На напречниот пресек на стеблото, на периферијата, се забележува епидермис кој е покриен со ригеста кутикула. Во продолжение се наоѓа коленхимското ткиво кое е со различна дебелина т.е. најдебело е во аглите на стеблото. Во паренхимот на кората се забележуваат секреторни канали и друзи од калциум оксалат. Спроводните снопчиња јасно се забележуваат онаму каде трахеалните снопчиња се силно проширени (Сл. 1).

Eryngii herba (folium)

На напречниот пресек на листот се забележува епидермис, кој е покриен со силно развиена кутикула од двете страни на листот (Сл. 2.а.). Кутикулата е издигната на одредени места. Мезофилот има изолатерална градба со многу друзи од калциум оксалат. Сунѓерестото ткиво е изградено од крупни клетки со речиси сферичен облик, кои имаат ретки хлоропласти. Палисадното ткиво е двослојно, со скоро иста широчина од двете страни на листот, а клетките се кратки и богати со хлоропласти (Сл. 2.б.). Карактеристично за ова растение е силно развиеното механичко ткиво кое се наоѓа на работ на лиската (2.в.). Набљудувани одозгора клетките на епидермисот се полигонални, помалку или повеќе со прави ѕидови и силно збиени. Стомите имаат парацитична градба (Сл. 3).

Eryngii radix

На напречниот пресек на веќе формираниот корен под микроскоп на периферијата се воочува добро развиен слој на перидермис, составен од плочести клетки на плутата, со кафеави ѕидови. Најголем дел од масата на секундарната кора ја сочинуваат паренхимските клетки со различна форма и големина. Во овој дел многу добро се гледаат секреторните канали кои се карактеристични за претставници од оваа фамилија. Во парехимскиот дел исто така се забележуваат друзи од калциум оксалат. Камбиумот го дели дрвото од кората, а срцевинските зраци инкасто се прошируваат до средината на кората. Ксилемските елементи се лесно забележливи, а и во овој дел се наоѓаат многу друзи од калциум оксалат. Во централниот дел се наоѓа срцевината, изградена од паренхимски клетки (Сл. 4).

Eryngii herba pulvis

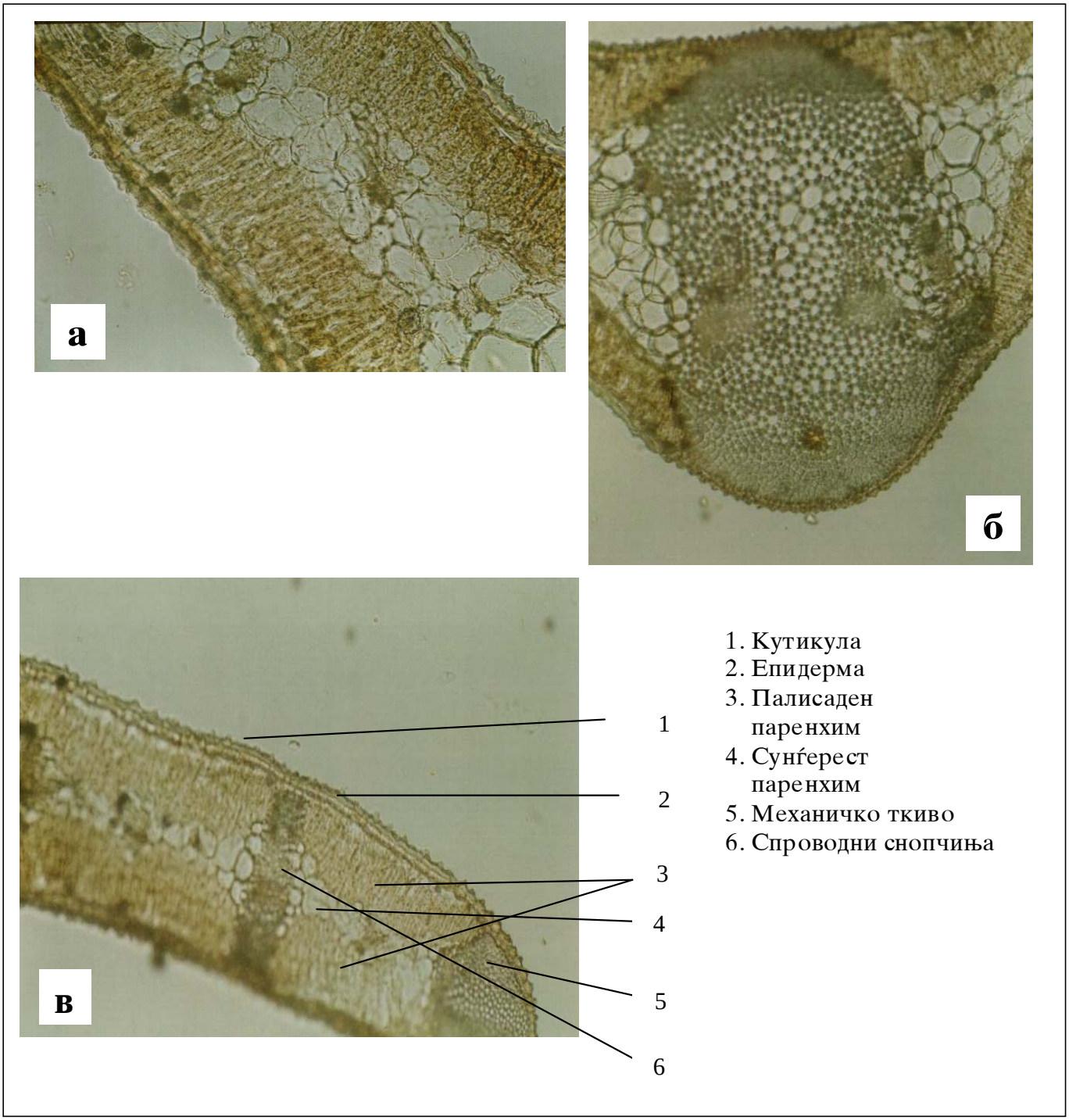
На микроскопскиот препарат на прашок од *Eryngii herba* (Сл. 5) се забележуваат делови од мезофилот со изолатерална градба т.е. тесниот сунѓерест паренхим и палисадното ткиво и од горната и од долната страна. На деловиоте од епидермисот се гледаат дека епидермалните клетки набљудувани одозгора имаат полигонален облик, со парацитична градба на стомите. Други анатомско-дијагностички елементи се ретките едноклеточни брадавичести влакна, механичките елементи и друзите од калциум оксалат.

Eryngii radix pulvis

На микроскопскиот препарат на прашок од *Eryngii radix* (Сл. 6) се забележуваат делови од плутата со дебели жолто-кафеави ѕидови, делови од спроводните снопчиња, како што се трахеите, кои имаат ѕидови со спирална градба и друзи од калциум оксалат, кои се лесно воочливи.

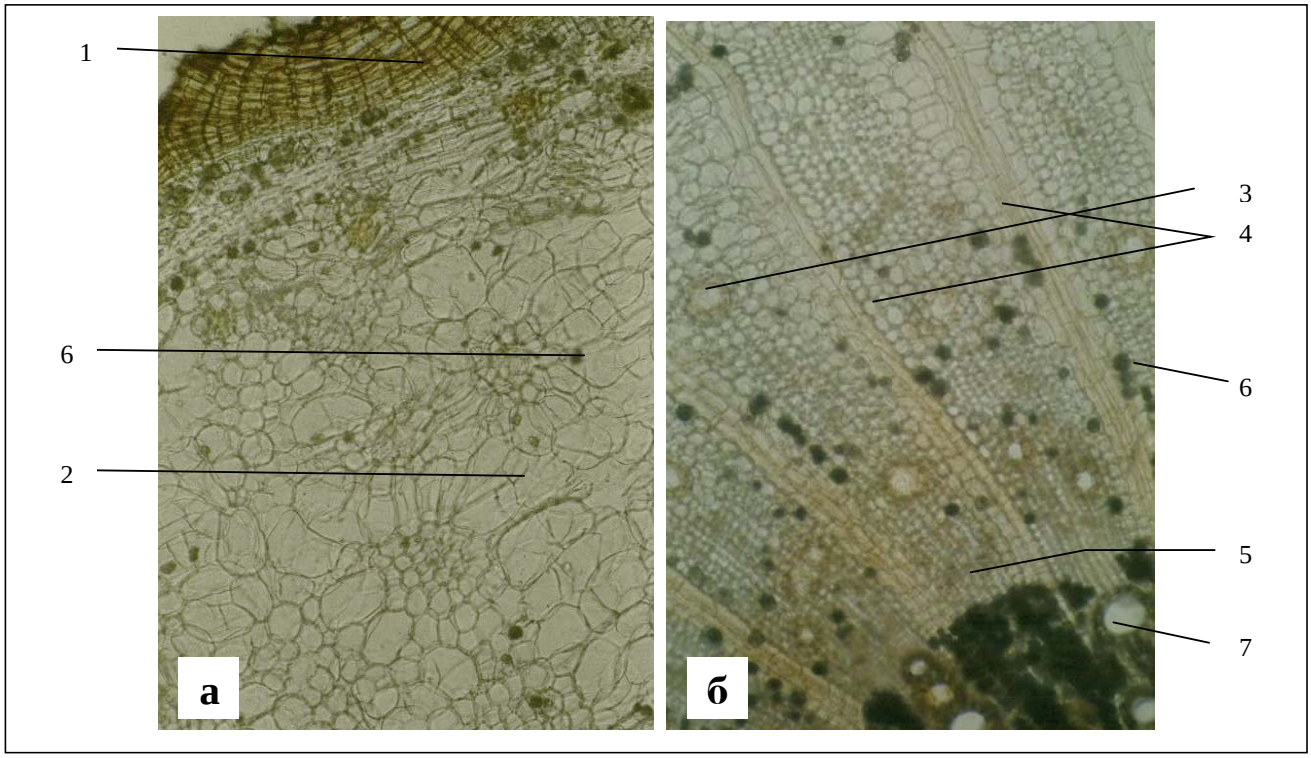
Заклучок

Морфолошко-анатомските карактеристики на растителните органи на *Eryngium campestre* покажуваат изразита ксероморфност на растението, особено кај листовите што се поделени во бодликаво-запчести резни, покриени со дебела кутикула, со мезофил кој има изолатерална градба со палисадно ткиво на горната и долната страна на листот и со многу редуциран сунѓерест паренхим. Карактеристичен распоред на механичко колемхинско ткиво, особено во листовите, во комбинација со изолатералната градба и присутните друзи од калциум оксалат, како и карактеристичните набори на кутикулата се фармакодијагностички маркери за идентификација на дрогата во напречен пресек. Во прашокот од хербата се издвојуваат фрагменти од трахеите со специфични прстенести набори, делови од епидермисот со стомите, друзи и коленести механички влакна со специфична форма како дијагностички елементи битни за идентификацијата. Кај коренот и кај стеблото карактеристични се секреторните канали и присуството



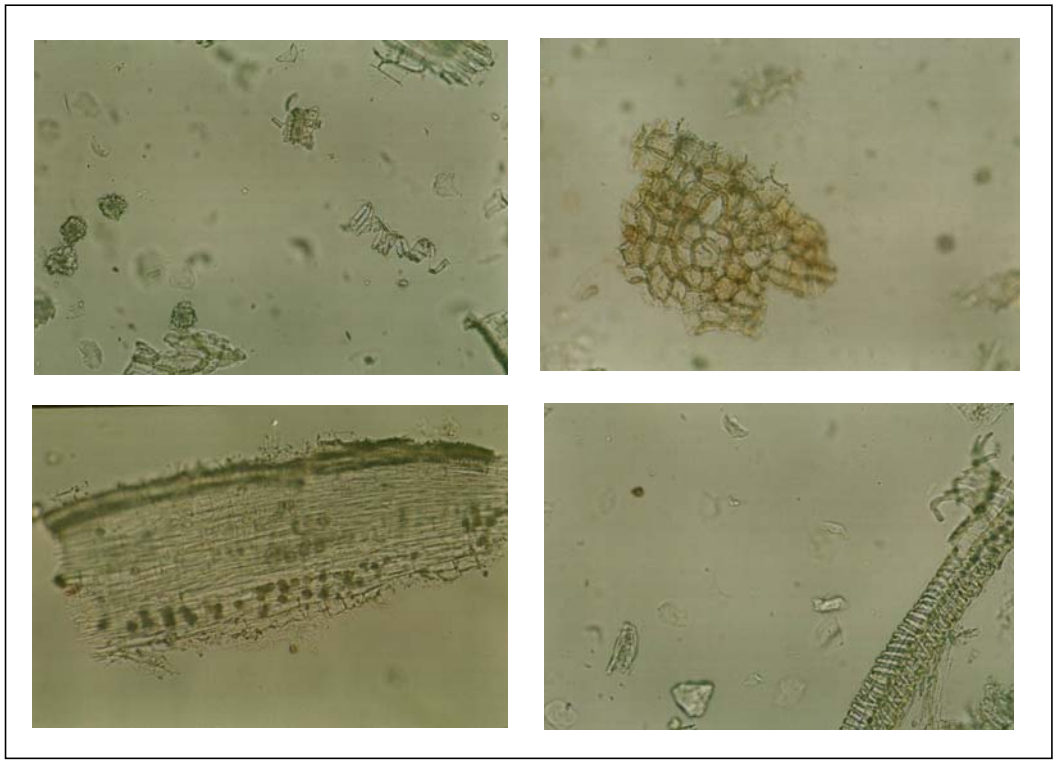
Сл. 2. Микроскопска анализа на пресек од лист од *E. campestre* (а - пресек преку мезофилот, б - пресек преку главниот нерв, в - пресек преку периферните делови од лисната плоча).

на големи количини на друзи од калциум оксалат. Кај коренот се забележува типичен распоред на ткива што е карактеристичен за секундарна градба на корен, со срцевински зраци во дрвото и во кората, млечни цевки, перидермис на периферија, карактеристичен распоред на спроводни снопчиња и голем број друзи, особено во дрвото. Во прашокот од коренот се издвојуваат фрагменти од трахеи со спирални задебелувања, фрагменти од перидермисот и од плутата, делови од паренхимот на кората со друзи и поединечни друзи, како дијагностички елементи битни за идентификацијата.

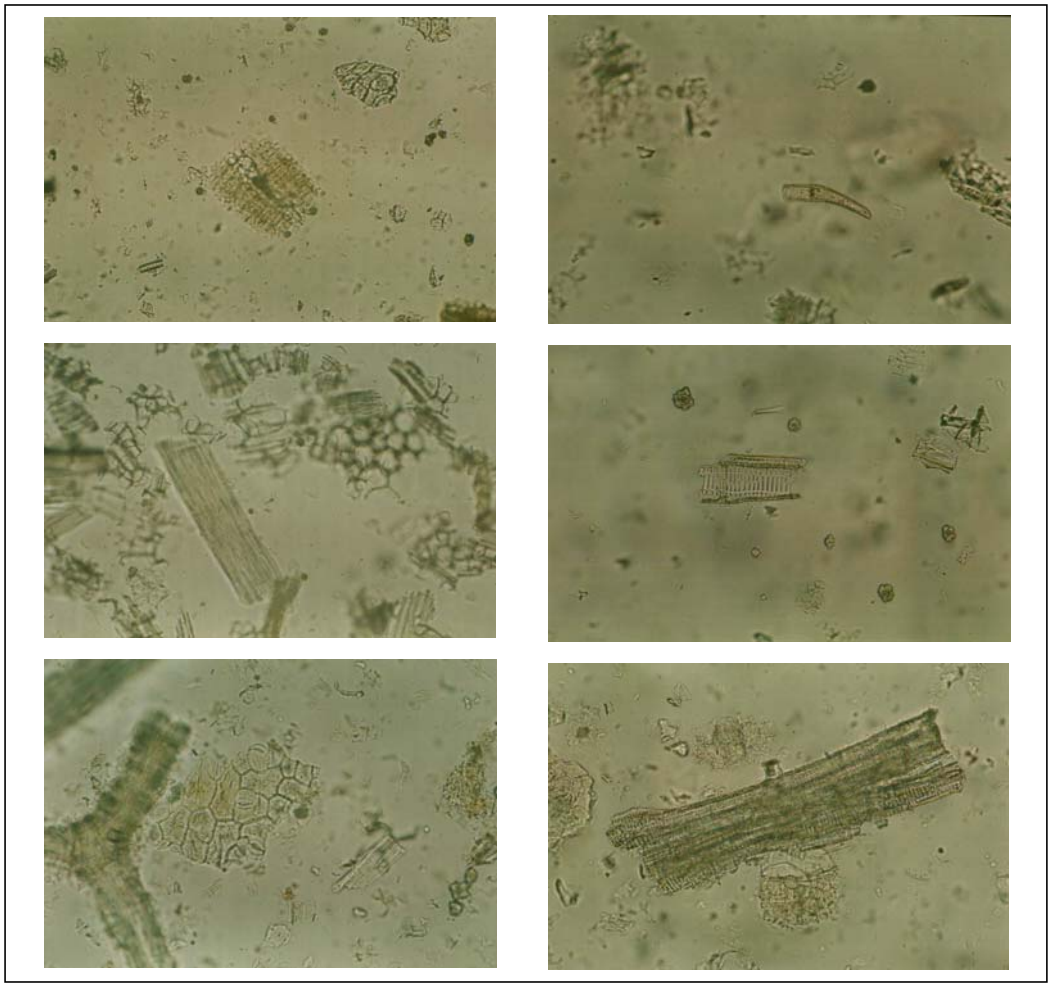


Сл. 3. Микроскопска анализа на пресек од корен од *E. campestre*

а - пресек во зоната на надворешните ткива,
б - пресек преку камбиумот
1 - плута,
2 - паренхимско ткиво на кората,
3 - секреторни канали,
4 - срцевински зраци,
5 - камбиум,
6 - друзи од калциум оксалат,
7 - ксилем.



Сл. 5. Фрагменти добиени од микроскопска анализа на *Eryngii radix pulvis*



Сл. 4. Фрагменти добиени од микроскопска анализа на *Eryngii herba pulvis*

Литература

1. В. Дервенци, *Природни лековити и ароматични сировини, второ издание*, Маринг, Скопје, 1997
2. J. Tucakov, *Lecenje biljem*, RAD, Beograd, 1976
3. P. Riberean-Gayon, *University Reviews in Botany*, 3, Oliver and Boyd, Edinburgh, 1972
4. И. Асенов, С. Николов, *Фармакогнозија*, Медицина и фискултура, Софија, 1988
5. Stojanov N., Kitanov B. (1960): Divi polazni rastenija v Bugarija. Izdavatelstvo na Bulgarskata akademija na naukite; Sofija, 1960
6. И. Асенов, Цх. Гусев, Г. Китанов, С. Николов, Т. Петков, *Билкосбирање*. Издателство билер; Софија, 1998
7. K. Hiller, E. Friedrich, *Isolating antimycotically active saponin mixtures from umbelifers.* Ca 85, 83220[a] , 1975
8. K. Hiller, M. Keipert, S. Pfeifer, *Pharmazie* **27** (5), 341-3 (1972).
9. K. Hiller, K.Q.C. Nguyen, P. Franke, *Pharmazie*, **33** (1), 78-80 (1978).
10. K. Hiller,V.Th. Nguyen, G. Lehman, E. Grundemann, *P harmazie*, **29** (2), 148-9 (1974).
11. K. Hiller, V.M. Mach, P. Franke, *Pharmazie*, **31**(1), 53 (Ger)(1976).
12. K. Hiller K., K.Q.C. Nguyen, P. Franke, R. Hintsche, *Pharmazie*, **31**(13), 891-3(1976).
13. K. Hiller, B. Pohl, P. Franke, *Pharmazie*, **36**(6) 451-2 (1981).
14. S. Al-Khail, *Alexandria J. Pharm. Sci.*, 873-5 (1994).
15. T. Karting, J. Wolf, *Planta Med*., **59** (3), 285 (1993).
16. T. Kartnig, J. Wolf, *Planta medica*, **59** (3) 285 (1993).
17. L. Stecka-Paszkiewez, *Z. Chem.*, **23** (8), 294-5 (1983).
18. M.H.A. El-Gamal, F.K. Ei-Bay, B.A.H. Ei-Tawill, K.Z. Gadalla, *J. Chem.*, **18** (4), 767-72 (1978).
19. C.A.J. Erdelmeier, O. Sticher, *Planta Medica* (No.5) 407-409 (1985).
20. D. Drake, J. Lam, *Phytochemistry*, **11**(8), 2651-2 (1972).
21. J. Lam, L.P. Christensen, T. Thomasen, *Phytocemistry,* **31** (8), 2881-2 (1992).
22. Iv. Assenov, R. Gevrenova, *Farmatsija* – Sofia, **41** (5-6), 26-8 (1991).
23. H. J. Jacker, K. Hiller, *Pharmazie*, **31** (10), 747-8 (1976).
24. J. Okuda, I. Miwa, K. Horie, M. Makayama, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3807-22 (1982).
25. Pharmacopoea Iugoslavica Editio quinta, 2000
26. Ст. Велев, Ив. Асенов, Ст. Димитрова, Г. Ганчев, Б. Стефанова, Раководство за практически упражнениа по ботаника, Медицина и физкултура, Софиа, 1975

Summary

Morphological and anatomical characteristics of the root and herb from *Eryngium campestre* L. (Apiaceae)

Flurim Nebija[1], Gjose Stefkov[2], Marija Karapandzova[2], Biljana Bauer Petrovska[2], Svetlana Kulevanova[2*]

[1]Medical faculty, Section Pharmacy, University in Prishtina, Kosovo
[2]Faculty of Pharmacy, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia

***Key words**: Eryngium campestre*, microscopy, morphological and anatomical constitution, identification.

Research on the morphological and anatomical constitution of the root and herb from the plant *Eryngium campestre* L., Apiaceae has been done in this work. The follow elements important for the identification of drug have been defined: in leafs thick cuticle, isolateral mesophill with palisade tissue on the upper and lower region of the leaf and much reduced spongy parenchyma; characteristic arrangement of the mechanical collenchyma tissue, especially in leafs, characteristic wrinkles in the leaf cuticle. In the herb's powder the follow elements could be found: trachea fragments with specific ring wrinkles, parts from the epiderma with stomata, druses and knee-shaped mechanical hairs. In the root and the stem characteristic are secretory tubes and the presence of calcium oxalate druses in great quantity. Additionally in the root typical arrangement of tissues characteristic for the secondary root construction could be noticed, with: xylem rays in wood and in a bark, laticifers, periderma on the periphery, characteristic arrangement of the vascular bundles and great number of druses, esspecialy in the wood. In the root powder: trachea fragments with spiral thickenings, fragments of periderm and cork, parts from parenchyma of the bark with druses could been put aside.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 65-72 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 615.225:616.61-097.3

Стручен труд

Улогата на ендоетелин-1 во развојот на дијабетична нефропатија индуцирана со стрептозоцин

Јасмина Тројачанец[1]*, Димче Зафиров[1], Маја Сланинка-Мицеска[1], Никола Лабачевски[1], Елена Костова[1], Калина Ѓорѓиевска[1], Петар Милошевски[1], Стојмир Петров[1]

[1]*Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј"*

Примен 2006, прифатен јуни 2006

Апстракт

Дијабетичната нефропатија претставува една од хроничните микроваскуларни компликации на дијабетот, со мултифакторијална и не до крај расветлена етиопатогенеза. Со оглед на тоа што кај пациентите со дијабет, особено кај оние со дијабетична нефропатија, се најдени зголемени вредности на ендотелин-1, се претпоставува дека истиот може да има значајна улога во развојот на дијабетичната нефропатија.

Основна цел на нашата студија беше да се детектираат промените во плазматското ниво на ендотелин-1 по експериментално индуциран дијабет, и дијабетична нефропатија кај стаорци со стрептозоцин. Со оглед на добро познатите ефекти на АКЕ-инхибиторите, во оваа студија го испитувавме и влијанието на еналаприл (АКЕ инхибитор) на плазматските концентрации на ендотелин-1, како и неговите ефекти во третманот на дијабетична нефропатија. Еднократната i.p. администрација на стрептозоцин (STZ) предизвика сигнификантно зголемување на плазматските концентрации на ендотелин-1, пропратени со јасно изразени симптоми и знаци на дијабетична нефропатија (микроалбуминурија, зголемени уринарни вредности на N-acetyl-fl-D-glucosamidase, зголемени серумски концентрации на уреа, полиурија). Четири неделниот третман со еналаприл доведе до сигнификантно намалување на плазматските концентрации на ендотелин-1 и до подобрување на симтомите и знаците на дијабетичната нефропатија. Добиените резултати потврдуваат дека ендотелин-1 може да има значајна улога во развојот и прогресијата на дијабетичната нефропатија, а АКЕ инхибиторите, односно еналаприл, можат да ја ублажат и успорат прогресијата на дијабетичната нефропатија.

Клучни зборови: ендотелин-1, стрептозоцин, еналаприл, дијабетична нефропатија, стаорци.

Вовед

Дијабетичната нефропатија, заедно со дијабетичната ретинопатија, претставуваат едни од најтешките хроничните микроваскуларни компликации на дијабетот, кои се јавуваат во покасниот стадиум на болеста, посебно кај болните со висока и нерегулирана гликемија.

Етиопатогенезата на дијабетичната нефропатија е комплексна, мултифакторијална и за сега се уште не комплетно разјаснета. Основата на ова заболување се базира на високата нерегулирана гликемија која доведува до постепени иреверзибилни промени на малите крвни садови, а хипертензијата додатно може да ги потенцира дијабетичните васкуларни компликации. Во последно време се повеќе се смета дека пореметувањето на модуларната функција на ендотелиумот може да бидат еден од иницијалните фактор за развојот на дијабетичните васкуларни компликации (1). Ендотелијалната дисфункција може да резултира со вазоспазам, вазоконстрикција, прекумерна тромбоза и абнормална васкуларна пролиферација (2), како и со

*Јасмина Тројачанец
e-mail: pharma@mt.net.mk
Тел. 02 11 18 28; 02 16 59 66 Факс. 02 11 18 28

променета вазомоторика и пермеабилнос на ендотелот. Ендотелната дисфункција исто така доведува до леукоцитна адхезија, и инфилтрација на моноцитите, макрофагите и липопротеините во ѕидот на артериите (3). Карактеристично за ендотелната дисфункција е намаленото присуство на факторите на релаксација, као што се простациклинот, азотниот оксид и ендотелните деривирани хиперполаризирачките фактори и зголемување на факторите на вазоконстрикција, како што се ендотелин-1, простагландин PGH_2 и тромбоксан TXA_2, кои претставуваат главни фактори во развојот на васкуларните заболувања (4).

Голем број на испитувања покажале дека нивото на ендотелин-1 се зголемува кај диабетичните пациенти со микроангиопатија, поради што се претпоставува дека истиот може да има значајна улога во развојот на дијабетичната нефропатија (5,6,7). Ендотелинот (ЕТ-1) е 21 аминокиселински пептид, кој се создава во васкуларните ендотелни клетки и претставува најпотентен вазоконстриктор. Постојат три изоформи на ендотелинот, како ET_1, ET_2 и ET_3, од кои само ET_1 се ослободува од хуманите ендотелни клетки (8). Покрај тоа што васкуларниот ендотел претставува главен извор на продукцијата на ендотелин, тој може да се продуцира и од други различни типови на клетки вклучувајќи ги ендотелиумот на реналните тубули, гломеруларниот мезангиум, срцевите миоцити, хипофизарните клетки, макрофагите и други (9). Ендотелин-1 делува локално за покачување на васкуларниот тонус, го регулира крвниот проток, GFR и реапсорпцијата на натриум. Понатаму, ендотелинот може да ја поремети реналната архитектоника поради неговиот ефект врз акумулацијата на екстрацелуларниот матрикс и тубулоинтерстицијална фиброза.

Со оглед на тоа што за сега не постои специфична терапија за третман на дијабетична нефропатија, а имајќи ги во предвид до сега познатите механизми и патофизиологија на настанување на истата, последните десетина години интензивно се испитуваат разни медикаментозни опции за третман на дијабетичната нефропатија. Од нив како посебно интересни се издвојуваат лековите кои делуваат пред се на синтезата на ендотелин-1, инхибиторите на ендотелин-1 како и лекови кои што делуват поволно на хемодинамските пореметувања кои се присутни кај дијабетичната нефропатија, како што се: АКЕ инхибиторите, AT_1 антагонистите, блокатори на ЕТ-1 рецепторите и синтетски аналози на простациклинот.

Примарна цел на нашата студија беше да се проценат улогата на ендотелин-1 во развојот и прогресијата на дијабетичната нефропатија кај стаорци, експериментално предизвикана со стрептозоцин, како и влијанието на еналаприл на плазматските концентрации на ендотелин-1. Како секундарна цел ни беше дефинирана проценатa на ефектите на еналаприл во третманот на дијабетичната нефропатија.

Експериментален дел

Експериментални животни: За изведување на експериментите кои беа предвидиени во ова испитување беа користени 60 машки и женски нормотензивни стаорци од сојот Wistar (од двата пола), на возраст од 9-11 недели, со телесна тежина од 160-300 g. Стаорците се добиени по пат на размножување во шталата на Институтот за предклинička и клиничка фармакологија со токсикологија.

Лекови: Во текот на студијата беа користени следните лекови: Streptozocin (STZ) – SIGMA-ALDRICH и Enalapril Maleat – Krka.

Експериментални протоколи: експерименталниот модел на индуцирана дијабетична нефропатија кај стаорците беше поставен со еднократна интраперитонеална администрација на Streptozocin во доза од 60 mg/kg/t.t.. Во понатамошниот тек од испитувањето беа вклучени само стаорците кај кои нивото на глукоза во крвта беше ≥ 11 mmol/L, на гладно (наутро). Во наредните 4 недели, за да се развие дијабетична нефропатија, животните беа оставени во дијабетична состојба без никаков третман. За да се одговори на поставените цели, стаорците (n = 40) беа поделени во две групи. Кај првата (STZ) група стаорци (n = 20), со цел да се проценат симптомите и знаците на дијабетичната нефропатија и промените во плазматското ниво на ендотелин-1, истите во наредните 4 недели беа оставени без никаков третман. Со цел да се евалуира влијанието на еналаприл на нивото на ендотелин-1, како и неговите тераписки ефекти на експеримeтално индуцираната дијабетична нефропатија, кај втората (ENA) група стаорци, после 4 недели од администрацијата на Streptozocin, се започна со администрација на Enalapril maleat, перорално (со интрагастрична сонда), растворен во 5% глукоза, во доза од 5 mg/kg/t.t. /ден, во тек на 4 недели.

Третата група, која исто така броеше 20 стаорци, претставуваше контролна група и експерименталните животни од оваа група примаа само фи-

зилошки раствор во исти количини и временски интервали како и групите животни кои ги примаа испитуваните лекови (не дијабетични стаорци).

Мерења и анализи: во текот на испитувањето беа извршени следните мерења и анализи: одредување на плазматските концентрации на ендотелин-1 (ET-1), биохемиска анализа на крвта од стаорците, која вклучуваше одредување на нивото на глукоза и серумски креатинин; уринарни анализи кои вклучуваа: диуреза, pH на урина, албуминурија и одредување на уринарната екскреција на NAG (N-Acetyl-b-D-glucosaminidase) и параметри за процена на општиот статус на експерименталните животни кои вклучуваа (телесна тежина, внес на вода и храна, моторна активност). Сите овие мерења и анализи, со исклучок на нивото на глукоза во крвта и телесната тежина, кај испитуваните животни се изведуваа пред почетокот на испитувањето (0-ден), после 4 и 8 недели од почетокот на испитувањето. Нивото на глукоза во крвта се одредуваше пред почетокот на испитувањето, 72 часа после апликацијата на стрептозоцин и после 4 односно после 8 недели, додека телесната тежина на животните се мереше во неделни интервали.

Концентрацијата на ET-1 се одредуваше со користење на комерцијален сет од фирмата Amersham Life Science (Biotrak Endothelin-1- (I 125) high sensitivity assay). Овој кит е погоден за одредување на ендотелин-1 во култура од клетки, серум, плазма и урина. Користи магнетна сепарација (Amerlex-M magnetic separation). Сите примероци претходно беа подложени на пурификација низ Amprep мини колони (Amersham), а потоа отчитувани со RIA техника.

Активноста на NAG во урина беше одредувана со валидизираната методата на Horak E. et al. (10), додека количината на вкупни албумини во урина се одредуваше турбидиметриски.

Статистичка обработка: од дескриптивна статистика беа користени мерките на централна тенденција и варијабилитет (средна вредност, стандардна девијација). Разликите помеѓу одредени временски точки, како и разликите помеѓу групите беа анализирани со Sudent-ov “t test” за зависни односно независни примероци и непараметриските тестови Mann-Whitney U-test, Wilcoxon-ов тест и Kruskal-Wallis ANOVA. Како сигнификантно значајни беа земени разликите за $p < 0.05$.

Земање на примероци на крв за хематолошки анализи: крвта од стаорците беше земана од орбиталниот синус на стаорците, во лесна етерска анестезија, со венепункција, при што беа земани примероци на крв за хематолошки анализи (по 100 ml на кои е им беше додаден антикоагуланс EDTA).

Земање на примероци на урина: За да се минимизираат циркардијалните варијации на вредностите на поедини параметри, примероците на урина се земаа од 24-часовната урина (диуреза) на стаорците која се собираше со користење на метаболни кафези. Целокупната урина беше собирана во тек на 24 часа, почнувајќи од 10^{00} h претпладне, па се до истото време наредниот ден.

Резултати и дискусија

Експериментално поставениот модел на индуциран дијабет кај стаорци со еднократна интраперитонеална администрација на Streptozocin во доза од 60 mg/kg//t.t. резултираше со тешка хипергликемија веќе после 72 часа од администрацијата на лекот кај најголемиот број од стаорците. Во понатамошниот тек од испитувањето беа вклучени само оние стаорци кај кои нивото на глукоза во крв беше ≥ 11 mmol/L на гладно (n = 40). Просечните вредности на глукоза во крвта кај експерименталните животни кои беа вклучени во испитувањето изнесуваше 28.11 mmol/L

Бидејќи нашата цел беше процена на улогата на ендотелин-1 во развојот и прогресијата на дијабетичната нефропатија, а потоа и третман на дијабетична нефропатија, стаорците од двете испитувани групи: стрептозоцин (STZ) и еналаприл (ENA) во текот на целото испитување не примаа специфична терапија за дијабет, поради што вредностите на глукоза во крвта и после 4, односно 8 недели останаа на приближно исто ниво (STZ = 28.52 mmol/L; ENA = 27.67 mmol/L), при што разликата помеѓу двете групи беше несигнификантна ($p>0.05$).

Ваквото високо ниво на глукоза во крвта, по 4 недели од администрацијата на стрептозоцин, како и во голем број други слични експериментални студии (11,12,13), резултираше со јасно изразени симптоми и знаци за дијабетична нефропатија кај двете испитувани групи на животни, вклучувајќи зголемено ниво на серумска уреа, изразита полуирија, микроалбуминурија и лоша општа состојба на испитуваните животни. Во групата стаорци кои во текот на испитувањето освен стрептозоцин не примаа друг лек (STZ-група), симптомите на дијабетичната нефропатија прогредираа и уште повеќе се влошија по 8 недели од администрацијата на стрептозоцин. За разлика од тоа, во групата жи-

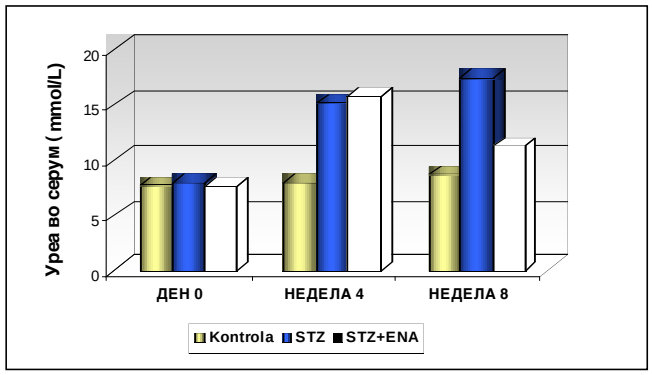
вотни кои од 4-тата до 8-та недела примаа терапија со еналаприл (ENA), евидентно беше изразито намалување и ублажување на симптомите на дијабетичната нефропатија и подобрување на нивната општа состојба.

Ниво на уреа во серум

Од биохемиските параметри за процена на општата бубрежна функција се користеше следењето на концентрациите на уреа во серум кај стаорците во текот на испитувањето. После 4 недели од администрацијата на стрептозоцин беше регистрирано сигнификантно ($p<0.05$) зголемување на вредностите на уреа во серум кај двете испитувани групи во однос на базалните вредности и вредностите кај контролната група (7.91 ± 1.96) mmol/L. Просечните вредности на нивото на уреа кај STZ-групата изнесуваа 15.19 ± 3.8 mmol/L а кај ENA-групата 15.74 ± 5.66 mmol/L. На крајот од испитувањето, кај STZ-групата вредностите на уреа беа уште повеќе зголемени и изнесуваа 17.47 ± 6.43 mmol/L, додека кај ENA-групата, вредностите на уреа беа сигнификантно намалени во однос на вредностите по 4 недели и беа близу до базалните вредности и вредностите кај контролната група (11.31 ± 2.75 mmol/L). (Сл. 1.) Процентуално изразено, на крајот од испитувањето, вредностите на уреа кај SZT-групата во однос на базалните вредности беа зголемени за 119.5%, додека кај ENA-групата ова зголемување беше сигнификантно ($p<0.05$) помало и изнесуваше 50.0%.

Диуреза

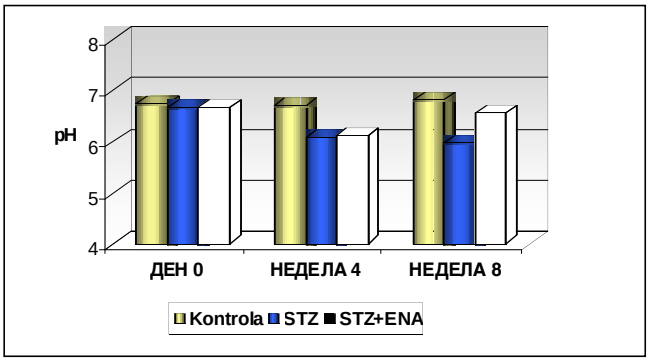
Администрацијата на стрептозоцин кај стаорците предизивка тешка хипергликемија, пропратена со бубрежни оштетувања, кои се манифестираа и во однос на диурезата кај стаорците. После 4 недели од администрацијата на стрептозоцин, кај двете испитувани групи беше изразито манифестирано полиуријата, при што просечните вредности на диурезата изнесуваа: 37.14 ± 8.45 ml/24h (STZ), односно 36.86 ± 6.47 ml/24h (ENA), што изразено процентуално е речиси за 5 пати повисока во однос на базалните вредности и вредностите на диурезата кај контролната група (7.71 ± 0.95 ml/24h). По 8 недели, односно на крајот од испитувањето, вредностите на диурезата кај STZ групата иако беа нешто намалени (24.86 ± 4.98 ml/24h) во однос на вредностите на диурезата по 4 недели, тие се уште беа многу повисоки во однос на базалните вредности и вредностите кај контролната група. За разлика од тоа, кај ENA групата, вредностите на диурезата по 8 недели (17.14 ± 5.11 ml/24h) беа за повеќе од половина намалени во однос на вредностите по 4 недели и бележеа тренд на постепено нормализирање. Ваквите резултати на еналаприл во однос на диурезата, укажува на негови поволни тераписки ефекти на оштетената бубрежна функција индуцирана со стрептозоцин.



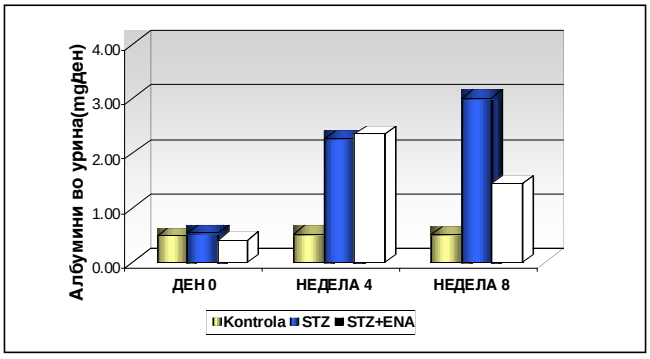
Сл. 1. Вредности на уреа во серум кај стаорците во текот на испитувањето (mmol/L)

pH на урина

Потврда за пореметената бубрежна функција како резултат на администрацијата на стрептозоцин претставуваат и резултатите во поглед на промените на pH на урината што беа регистрирани во текот на испитувањето. Администрацијата на стрептозоцин, која резултираше со развој на дијабет кај стаорците, беше пропратена и со ацидификација, односно пад на вредностите на pH на урината кај двете групи на стаорци после 4 недели. Просечните вредности на pH на урината по 4 недели кај STZ и ENA групата изнесуваа 6.11 ± 0.36 (STZ), односно 6.13 ± 0.34 (ENA), што е сигнификантно ($p<0.05$) пониско во однос на контролната група (6.71 ± 0.30). На крајот од испитувањето, кај STZ групата pH на урината уште повеќе се намали и изнесуваше 5.99 ± 0.41, додека кај ENA групата, вредностите на pH на урината беа скоро нормализирани и изнесуваа 6.57 ± 0.37. Ацидификацијата на урината несомено укажува на зголемена екскреција на киселини во состојба на дијабет, која што е најверојатно резултат на пореметениот метаболизам и гломеруларната хемодинамика на дијабетичните стаорци, а последователно на тоа и на зголемената продукција и елиминација на киселини. Слични резултати се добиени и во други експериментални студии во кои е покажано дека стрептозоцинот преку индукцијата на дијабет ја зголемува ацидификацијата на урината на стаорците (14). Од друга страна и во нашата студија се потвр-



Сл. 2. Вредности на pH на урината кај стаорците во текот на испитувањето



Сл. 3. Вредноста на албумини во урина кај стаорците во текот на испитувањето (mg/24h)

дија поволните тераписки ефекти на АКЕ инхибиторите во однос на гломеруларната хемодинамика, со оглед на тоа што третманот со еналаприл резултираше со постепено нормализирање на pH на урината на испитуваните стаорци, која предходно беше пореметена од дејството на стрептозоцин.

Албуминурија

Микроалбуминуријата претставува високо специфичен показател на бубрежната функција и е значаен параметар за рано откривање на дијабетична нефропатија.

Еднократната администрација на стрептозоцин индуцира тешка албуминурија кај сите испитувани стаорци. После 4 недели, просечните вредности на албумини во урина кај STZ и ENA стаорците беа за 4-5 пати повисоки во однос на базалните вредности и контролната група (0.518 ± 0.122 mg/24 h) и изнесуваа: 2.273 ± 0.836 mg/24 h (STZ), односно 2.347 ± 0.626 mg/24 h (ENA). На крајот од испитувањето, кај STZ групата просечните вредности на албумини во урина за 24 часа уште повеќе се зголемија и изнесуваа 3.023 ± 0.837 mg/24 h. Спротивно на тоа, во групата која примаше еналаприл (ENA), иако албуминуријата беше се уште присутна, истата бележеше тренд на опаѓање и беше за речиси преполовена во однос на претходните вредости регистрирани после 4 недели од администрацијата на стрептозоцин (1.447 ± 0.460 mg/24) (Сл. 3) што претставува високо сигнификантна ($p<0.01$) разлика во однос на STZ групата.

Добиените резултати во однос на албуминуријата го потврдуваат значењето на овој параметар во детекцијата на дијабетичната нефропатија индуцирана со стрептозоцин, како и терапските ефекти на еналаприл. Микроалбуминурија претставува независен предиктор на подоцнежната прогресија на нефропатијата и ризик за кардиоваскуларен морбидитет и морталитет (15). Причината за појава микроалбуминурија кај дијабетичната нефропатија е зголемената пропустливост на базалната мембрана, како резултат на намалувањето на количината на протеингликанот кој е составен дел на базалната мембрана. Микроалбуминуријата во почетокот е повремена, потоа трајна. Со напредување на болеста, поради гломеруларната склероза, може да дојде до додатно влошување на бубрежната функција и до појава на изразита протеинурија и хронична бубрежна инсуфициенција.

Уринарна екскреција на NAG (N-Acetyl-b-D-glucosaminidase):

Квантифицирањето на уринарната екскреција на NAG претставува високо специфичен маркер за детекција на ренални оштетувања. Токму поради тоа и во нашата студија истиот го користевме за докажување и потврдување на функционалните бубрежни оштетувања индуцирани од администрацијата на стрептозоцин, а воедно и за процена на тераписките ефекти на еналаприл.

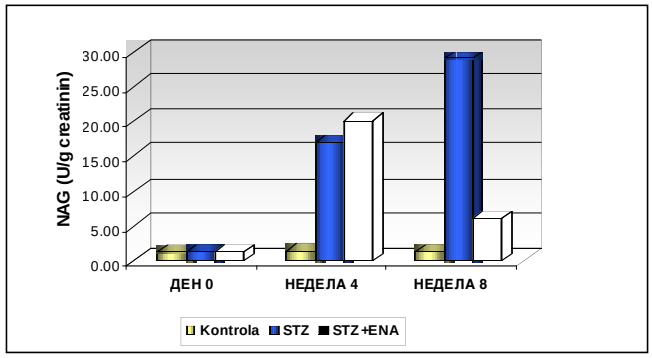
Администрацијата на стрептозоцин предизвика изразито зголемување на вредностите на NAG во урина после 4 недели, при што просечните вредности во STZ групата изнесуваа 17.13 ± 7.14 U/g/креатинин, односно 20.12 ± 8.61 U/g/креатинин кај ENA-групата. По 8 недели од администрацијата на Streptozocin, кај STZ групата вредностите на NAG беа уште повисоки и изнесуваа 29.01 ± 16.34 U/g/креатинин. За разлика од тоа, кај ENA групата беше регистрирано сигнификантно ($p<0.01$) намалување на вредностите на NAG (6.05 ± 2.3 U/g/креатинин), иако истите беа се уште повисоки во однос на базалните вредности и контролната група (Сл. 4).

Процентуално изразено, во групата животни кои беа третирани само со стрептозоцин, на крајот од испитувањето вредностите на NAG во урина во од-

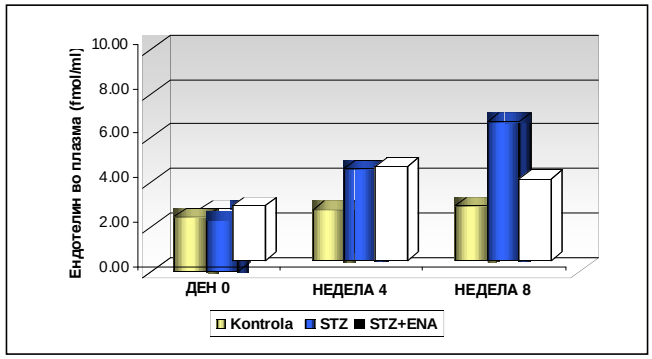
нос на базалните вредности беа зголемени за повеќе од 20 пати, а во групата која покрај Streptozocin примаше и еналаприл ова зголемување изнесуваше приближно 3.5 пати, што претставува високо сигнификантна разлика во однос на STZ групата.

Намалувањето на нивото на NAG во урина може да биде резултат на ефектите на еналаприл во поглед на намалувањето на интрагломеруларниот притисок (16) и на благото зголемување на пермеабилитетот на гломеруларната базална мембрана (17).

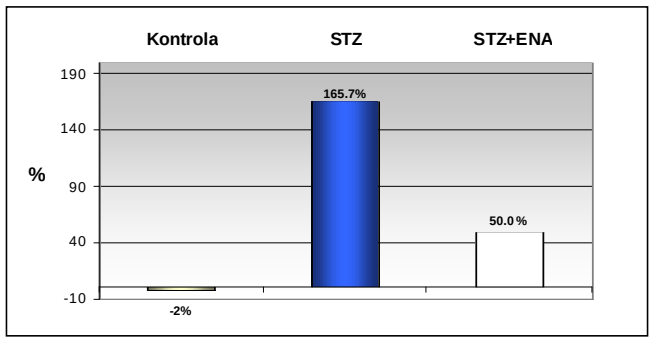
Сите овие функционални бубрежни параметри и специфични тестови за процена на бубрежни оштетувања покажуваат дека администрацијата на стрептозоцин предизвика дијабет, со изразити симптоми и знаци за дијабетична нефропатија вклучувајќи изразита албуминурија, зголемено ниво на уринарен NAG, зголемени серумски вредности на уреа, пропратени со зголемена и ацидифирана диуреза, како и лоша општа состојба на експерименталните животни. Истовремено, добиените резултати во однос на третманот со еналаприл несомнено поакжуваат и потврдуваат дека АКЕ инхибиторите можат да бидат ефикасна медикаментозна опција во подобрувањето на симптомите и знаците на дијабетичната нефропатија, односно да влијаат на прогресијата на нефропатичната дисфункција експериментално индуцирана со стрептозоцин. Ренопротективните ефекти на овие лекови не се должи само на намалувањето на системскиот крвен притисок туку и на намалувањето на интрагломеруларниот притисок, како и влијанието на другите локални вазоактивни медијатори кои шти имаат улога во развојот на дијабетичната нефропатија. Локалните ефекти на АКЕ инхибиторите се смета дека се остваруваат преку нивното влијание врз создадениот ренин и ангиотензинот II и тоа пред се во крвните садови, бубрезите, мозокот и другите ткива (18,19). Покажано е дека со блокадата на локалниот ренин-ангиотензински систем може да се намали продукцијата на проинмфламаторните и просклеротичните цитокини кои може да имаат улога во прогресијата на дијабетичните микроваскуларни и тубулоинтерстицијални заболувања. Во последно време се повеќе се смета дека пореметувањето на модуларната функција на ендотелиумот, а пред се зголемената синтеза на ендотелин-1, можат да бидат едни од иницијалните и клучни фактор за развојот на дијабетичните васкуларни компликации (1). Во неколку студии е покажано дека АКЕ инхибиторите можат поволно да делуваат на дијабетичната нефропатија



Сл. 4. Вредности на NAG во урина лај стаорците во текот на испитувањето (U/g/креатинин)



Сл. 5 Концентрации на ендотелин 1 во плазма кај стаорците во текот на испитувањето (fmol/ml)



Сл. 6. Процентуално зголемување на вредностите на ендотелин-1 на крајот од испитувањето во однос на базалните вредности

и преку намалување на ткивното и плазматско ниво на ендотелин-1 (20,21).

Токму поради тоа, нашата главна цел во оваа студија беше да се процени улогата на ендотелин-1 во развојот и прогресијата на дијабетична нефропатија, преку одредување на неговите плазматски концентрации.

Плазматски концентрации на ендотелин-1

Еднократната интраперитонеална администрација на стрептозоцин предизвика зголемување на плазматските концентрации на ендотелин-1 по 4 недели кај двете испитувани групи, при што про-

сечните вредности кај STZ групата изнесуваа 4.12 ± 0.67 fmol/ml, а кај ENA групата 4.24 ± 0.87fmol/ml, што е сигнификатно повисоко во однос на контролната група (2.31 ± 0.40 fmol/ml). На крајот од испитувањето, кај STZ групата просечните плазматските концентрации на ендотелин-1 уште повеќе се зголемија и изнесуваа 6.27 ± 1.42 fmol/ml. Спротивно на тоа, кај ENA групата просечните плазматски вредности на ендотелин-1 беа во опаѓање и изнесуваа 3.69 ± 0.69 fmol/ml (Сл. 5).

Компаративната статистичка анализа на добиените резултати помеѓу двете групи на животни, како и во однос на базалните вредности и вредностите на овие параметри кај контролната група, покажува сигнификантно пониски ($p<0.05$) ниво на плазматски ендотелин-1 кај ENA-групата во однос на STZ-групата. Процентуално, на крајот од испитувањето, плазматските концентрации на ендотелин-1 кај SZT-групата во однос на базалните вредности беа зголемени за 165.7%, додека кај ENA-групата ова зголемување беше сигнификантно помало и изнесуваше 50.0% ($p<0.05$) (Сл. 6)

Ваквите резултати несомнено покажуваат дека ендотелин-1 може да има значајна улога во развојот и прогресијата на дијабетичната нефропатија индуцирана со стрептозоцин. За ендотелин-1 е познато дека предизвикува констрикција на гломеруларните и интерлобуларните артерии, како и констрикција на аферентните и ефферентните артериоли (22) како и мезангијална клеточна пролиферација, што резултира со намалување на реналниот крвен волумен и гломеруларната филтрација и намалување на уринарната екскреција на натриум (23).

Од друга страна, резултатите за ефектите на еналаприл врз плазматските концентрации на ендотелин-1 и неговите поволните ефекти врз симптомите на дијабетичната нефропатија потврдуваат дека намалувањето на продукцијата на ендотелин-1 може да биде еден од неколкуте механизми преку кои АКЕ инхибиторите ги остваруваат своите ефекти кај дијабетичната нефропатија.

Слични резултати за влијанието на АКЕ инхибиторите на плазматските и ткивните концентрации на ендотелин-1 се добиени и во неколку други експериментални студии. Во овие студии превентивната примена на АКЕ инхибиторите исто така резултирала со сигнификантно намалување на микроалбуминуријата, подобрување на бубрежната функција (во однос на вредностите на NAG, серумскиот креатинин), како и сигнификантно подобрување на реналната морфологија (во однос на гломеруларната и тубуларната базална мембрана, мезангиалниот матрикс, големината на гломерулите) (24,25, 26,27,28).

Исто така и голем број на клинички студии покажале дека употребата на АКЕ инхибитори кај хипертензивните пациенти со дијабет, го редуцираат нивото на албуминурија како и прогресијата на бурежното оштетување во поголем степен во однос на другите антихипертензивни лекови кои го намалуваат крвниот притисок (29,30).

Иако механимот преку кој АКЕ инхибиторите ги намалуваат плазмтските концентрации на ендотелин-1 не е потполно познат, се верува дека истиот најверојатно се остварува преку намалување на ангиотензин II, за кој пак во In vivo (20) и In vitro (21) услови е покажано дека ја стимулира продукцијата и секрецијата на ендотелин-1.

Заклучок

Добиените резултати од оваа студија потврдуваат дека ендотелин-1 може да има значајна улога во развојот и прогресијата на дијабетичната нефропатија, со оглед на тоа што плазматските концентрации на ендотелин-1 значајно се зголемуваат кај стаорците со дијабет и дијабетична нефропатија експериментално индуцирани со стрептозоцин. АКЕ инхибиторите, односно еналаприл, со своето ренопротективно дејство можат да ја ублажат и да ја успорат прогресијата на дијабетичната нефропатија, а еден од механизмите преку кој го остваруваат ова свое дејство е нивниот ефект во намалувањето на плазматските концентрации на моќниот вазоконстриктор ендотелин-1.

Литература:

1. F. Cosentino, M. Eto, P. De Paolis, B. van der Loo, et al., *Circulation,* **107**(7), 1017-23 (2003).
2. D.S. Celermajer, *Am Coll Cardio.,* **30**(2), 325-33 (1997).
3. D.Steinberg, *Circulation.*, **76**(3), 508-14 (1987).
4. J.R.Sowers, *Arch Intern Med.*, **23**;158(6), 617-21 (1998).
5. U.A. Teuscher, et al., *Journal of Hypertension,* **16**, 1279-1284 (1998).
6. R. J. Irving, J.P. Noon, G.C. Watt, D.J. Webb, B. R. Walker, *QJM,* **94**(6), 321-6 (2001)..
7. K. Kalogeropoulou, G. Mortzos, I. Migdalis, C. Velentzas, *Angiology,* **53**(3), 279-85 (2002).
8. T. Masaki, *J Cardiavasc Pharmacal,* **35,** 3-5 (2000).
9. A. Inoue, M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**(8), 2863-7 (1989).

10. E. Horak, S.M. Hopfer, F.W. Jr Sunderman, *Clin Chem*., **27**(7), 1180-5 (1981).
11. A.K. Banes, S. Shaw, J. Jenkins, H. Redd et al., *Am J Physiol Renal Physiol.*, **286**(4), F653-9 (2004).
12. J. Klisic, V. Nief, L. Reyes, P.M. Ambuhl, *Nephron Physiol.*, **102**(2), p27-35 (2006).
13. M.M. Anwar, A.R. Meki, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, **135**(4), 539-47 (2003).
14. F. Zaladek-Gil, M.F. Cavanal, G. Nascimento-Gomes, M.C. Silva-Rocha, M. Nutti-de-Almeida, *Braz J Med Biol Res*., **32**(1) 107-113 (1999).
15. S.F. Dinneen, H.C. Gerstein, *Arch Intern Med.*, **157**(13), 1413-8 (1997).
16. Y. Fujiwara, E. Kitamura, S. Ochi, et al., *Contrib Nephrol.*, **95**,12-21 (1991).
17. T.B. Weigmann, K.G. Herron, A.M. Chonko, M.L. MacDoigall, W.V. Moore, *Diabetes*, **41** 62-67 (1992).
18. Y. Doi, K.Atarashi, R. Franco-Saenz. P. Mulrow, *Clin Exp Hypert A.*, **5**(7-8), 1119-26 (1983).
19. J.D. Swales, A. Abramovici, F. Beck, R.F. Bing, M. Loudon, H. Thurston, *J Hypertension*, **1**(1), 17-22 (1983).
20. P. Moreau, L.V. d'Uscio, S. Shaw, et al., *Circulation*, **2**,96(5), 1593-7 (1997).
21. T. Emori, Y. Hirata, K. Ohta, M. Shichiri, F. Marumo, *Biochem Biophys Res Commun*., **14**;160(1), 93-100 (1989).
22. M.S. Simonson, S. Wann, P. Mene, G.R. Dubyak et al., *Journal of Clinical Investigation*, **83,** 708-712 (1989).
23. W.L. Miller, M.M. Redifield, Jr.J.C. Burnett, *Journal of Clinical Investigation* **83,** 317-320 (1989).
24. B. Kalender, M. Ozturk, M. Tuncdemir, O. Uysal, et al., *Acta Histochem.*, **104**(2), 123-30 (2002).
25. E. Villa, A. Rabano, L.M. Ruilope, R. Garcia-Robles, *Am J Hypertens.*, **10**(2), 202-8 (1997).
26. H. Gronbaek, I. Vogel, R. Osterby, I. Lancranjan, et al., *Kidney Int.*, **53**(1), 173-80 (1998).
27. C. Hill, A. Logan, C. Smith, H. Gronbeack, A. Flyvbjerg, *Diabetologia.*, **44**(4), 495-500 (2001).
28. B. Fabris, R. Candido, M. Carraro, F. Fior, et al., *R.Diabetes.*, **50**(11), 2619-24 (2001).
29. P. Jacobsen, S. Andersen, B.R. Jensen, H.H. Parving, *J Am Soc Nephrol.*, **14**(4), 992-9 (2003).
30. M. Mauer, B. Zinman, R. Gardiner, K.N. Drummond, et al., *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, **3**(4), 262-9 (2002).

Summary

Role of endoethelin-1 in development of neprhopathy induced with streptozocin

Jasmina Trojachanec[1], Dimche Zafirov[1], Maja Slaninka-Miceska[1], Nikola Labachevski[1], Elena Kostova[1], Kalina Georgievska[1], Petar Miloschevski[1], Stojmir Petrov[1]

[1]Department of Preclinical and Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty; "Ss Cyril and Methodius", Skopje, R. Macedonia.

Key words: endothelin-1, streptozocin, enalapril, diabetic nephropathy, rats

Diabetic nephropathy is one of the chronic microvascular diabetic complications with multifactorial etiopathogenesis that has still not been completely elucidated. Having in mind that increased values of endoethelin-1 have been found in patients with diabetes, and especially in those with diabetic nephropathy, it is assumed that endoethelin-1 may play an important role in development of diabetic nephropathy.

The main aim of our study was to detect changes in plasma level of endoethelin-1 after experimentally induced diabetes and diabetic nephropathy with streptozocin in rats. The effects of ACE inhibitors are well known and thus, we wanted to analyze the influence of enalapril (ACE inhibitor) on plasma concentrations of endoethelin-1 as well as its effects in the treatment of diabetic nephropathy. Single i.p. administration of streptozocin (STZ) caused a significant increase of endoethelin-1 plasma concentrations associated with distinct signs and symptoms of diabetic nephropathy (microalbuminuria, increased urine N-acetyl-D-glucosamidase, increased serum concentrations of urea and creatinine, polyuria). Four-week treatment with endoethelin-1 resulted in significant reduction of endoethelin-1 plasma concentrations and improved sings and symptoms of diabetic nephropathy. The results obtained have confirmed that endoethelin-1 may play an important role in development and progression of diabetic nephropathy and ACE inhibitors, that is enalapril, may alleviate and delay the progression of diabetic nephropathy.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **52**, (1,2) 73-80 (2006)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 582.784.1:547.972.2

Стручен труд

Идентификација и определување на флавоноиди во *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L., Apiaceae)

Флурим Небија[1], Светлана Кулеванова[2*], Марина Стефова[3]

[1]*Медицински факултет, Одсек фармација, Универзитет во Приштина, Косово*
[2]*Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија*
[3]*Природо-математички факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија*

Примен октомври 2006, прифатен јуни 2006

Апстракт

Испитувани се флавоноидни компоненти во примероци од *Eryngii herba, Eryngium campestre* L. (Apiaceae) собрани од три различни локалитети во Косово. Воспоставени се TLC и HPLC методи за идентификација, и методи за квантифицирање на содржина на вкупни флавоноиди (спектрофотометриски метод) и содржина на вкупни флавоноли (HPLC метод). Во екстракти добиени после хидролиза на хетерозидните форми, утврдено е присуство на неколку флавоноли од кои се идентификувани кварцетин и кемферол. Квантитативна анализа покажа дека доминантен агликон е кемферол. Содржината на вкупните флавоноиди се движи во граници од 0,12-0,14%, а на вкупните флавоноли од 0,04-0,13 %, определени со спектрофотометриски и со HPLC метод, соодветно.

Клучни зборови: *Eryngium campestre,* флавоноиди, идентификација, определување, HPLC.

Вовед

Eryngium campestre L. (Apiaceae) е повеќегодишно растение, распространето во Европа, особено во областа на Медитеранот (1). Од растението се користат хербата и коренот, главно во народна медицина за третман на различни заболувања во уринарниот тракт, за регулирање на нарушена функција на простатата, при воспаленија на горниот респираторен тракт и други состојби (2). Според наодите во поновата фармакогностичка литература, на *E. campestre* му се препишуваат: диуретично, спазмолитично, нефролитично и аналгетично дејство. Се препорачува за употреба при воспаленија на урогениталниот тракт, при цистити, уретрити, тешко уринирање, бубрежни и жолчни колики, хематурија, простатитис, воспаленија на жолчните патишта и друго (3).

Големата примена во народната медицина како и определените резултати од испитувањата на биолошката и фармаколошката активност на видовите од родот *Eryngium,* ги прават претставниците од овој род особено интересни за проучување на хемискиот состав и утврдувањето на потенцијално активните компоненти, одговорни за определени ефекти. Во поглед на вакви испитувања посебно се интересни низа податоци што се однесуваат на проучувањето на сапонинските и низа други соединенија. Така, во различни претставници од родот *Eryngium* е утврдено присуство на тритерпенски сапонини (4-9), кумарински деривати (10), пирано-кумарини (11), различни ацетилени (фалкаринол, фалкаринон и сл.) (12, 13), шеќерни алкохоли (14, 15), различни стероли (β-ситостерол, α-хелестерол, брасикастерол, кампестрол, стигмастерол, клеростерол, авенастерол) (15) и друго.

Во однос на фенолните соединенија, флавоноидните компоненти се подетално проучувани во претставници од родот *Eryngium*. Податоците покажуваат дека видот *E. planum* содржи кемферол и

* svku@ff.ukim.edu.mk

негови хетерозиди (16, 17), видот *E. ilicifolium* делтоин (18), *E. maritinum* хетерозиди на кемферол, изокверцетин и астрагалин (17), а *E. creticum* делтоин и кверцетин (15). Податоците за флавоноидните компоненти во видот *E. campestre* се доста оскудни и се однесуваат на утврдено присуство на хетерозиди на кемферол, изорамнетин, лутеолин и кверцетин (19, 20).

Целта на овој труд е воспоставување на методи за идентификација и определување на флавоноиди во примерициии од *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L.).

Експериментален дел

Растителен материјал

Во испитувањето беа вклучени примероци од сув надземен дел *(Eryngii herba)* собрани од растенија во цвет, преку лето, на три локалитети во Косово, во околината на Приштина (лок. 1), Подуево (лок. 2) и Липљан (лок. 3). Примероците од хербата се соодветно обележени со: H_1, H_2 и H_3 за примероците што се собрани во 2002 година и со H_4, H_5 и H_6 за примероците од истите локалитити што се собрани во 2003 година.

Испитување на флавоноиди

Хроматографија на тенок слој(TLC)

Подготовка на растворот за испитување. - Иситнетата дрога (5 g) претходно се третира три пати со по 50 mL петролетер за да се отстрани хлоропластот и баластните материи, во траење од 15 min. Потоа на дрогата се додаваат 5 mL 2M HCl (хидролиза на хетерозидите) и 50 mL вода и се загрева на водена бања два часа. По ладење се филтрира и филтратот се префрла во одделителна инка во која се вршат три екстракции со по 20 ml етер. Етерските фракции се спојуваат и се испираат три пати со по 50 ml дестилирана вода, за да се отстрани заостанатата HCl. Потоа етерскиот раствор се испарува до суво и на сувиот остаток се додава 1-2 mL метанол. Метанолниот раствор се користи за испитување флавоноиди со хроматографија на тенок слој.

Раствор за споредување. - По 0,1 mg стандардни супстанци од флавоноидите кемферол, кверцетин и лутеолин се растворааат во 2 mL метанол.

Стационарна фаза: Kieselgel GF 254 готова стаклена плоча.

Мобилна фаза. – Користени се мобилни фази за кои авторите од порано имаат сознанија за добра сепаративна моќ на флавоноидни комоненти (21):

1. толуен : етанол : мравска киселина = 58:33:9 *(V/V)* (S_1)
2. хлороформ : метанол = 93:7 *(V/V)* (S_2)
3. бензол : метанол : оцетна киселина = 45:3:2 *(V/V)* (S_3)
4. бензол : диоксан : оцетна киселина = 90:25:4 *(V/V)* (S_4)

Детекција. - UV светлина (254 и 366 nm), 5% раствор $AlCl_3$ во метанол на дневна и под UV светлина (21).

Спектрофотометриско определување на вкупни флавоноиди

Определувањето на вкупните флавоноиди е изведено со спектрофотометриски метод. Користена е вообичаената постапка која вклучува хидролиза на гликозидите, екстракција на вкупните флавоноидни агликони во етилацетат и комплексирање со $AlCl_3$ (22). Калибрацијата е направена со стандарден раствор на лутеолин и кверцетин, а мерењето на апсорбанцата е направено на λ = 425 nm.

Постапка: 1 g сомелена дрога се става во ерленмаер во кој се додава 15 mL ацетон, 0,5 mL HCl 25 % и 0,5 mL раствор на уротропин (1 % воден раствор). Ерленмаерот со содржината во него се става да врие на водена бања со повратно ладило во период од 40 min на температура од 60 ^{0}C. По истекот на 40-те минути, ерленмаерот се тргнува од воденатa бања, растворот се лади и филтрира преку малку памук во одделителна инка. Остатокот со филтер хартија се враќа во ерленмаерот во кој се додава нова порција реагенси односно, 10 mL ацетон, 0,5 mL (25 %) HCl и 0,5 mL (1%) раствор на уротропин и одново се става на водена бања со повратно ладило, но овојпат 20 min. По ладењето се филтрира во истата одделителна инка, во која се додава 25 mL вода и се екстрахира 3 пати со по 15 mL етилацетат. Вака добиените етилацетатни фракции се собираат заедно во одделителната инка и се "перат" два пати со по 30 mL вода. Вака добиениот етилацетатен екстракт се суши со 1 g безводен Na_2SO_4 30 min и се филтрира во одмерна тиквичка од 50 mL и се дополнува со етилацетат до пропишаниот волумен.

HPLC анализа на флавоноиди

Стандардни супстанци. - Стандардите од флавоноидите што беа користени во испитувањата се: кемферол (3,5,7,4'-OH флавон); кверцетин (3,5,7,3',4' -OH флавон) и мирицетин (3,5,7,3',4',5'-OH флавон) (Extrasynthese, Лион, Франција).

Реагенси. - Растворувачите користени како мобилни фази беа составени од: водна фаза закиселена со фосфорна киселина, органски растворувач метанол (CH_3OH) и ацетонитрил (CN_3CN), со чистота за HPLC (HPLC grade) од производителите Sigma-Aldrich и Rathburn. Сите реагенси и хемикалии користени во работата беа со аналитички степен на чистота. Користени се: хлороформ, метанол, етилацетат, безводен натриум сулфат (Алкалоид, Скопје).

Апаратура. - Методот за разделување и определување на флавоноли со примена на високоефикасна течна хроматографија беше разработен со течен хроматограф од производителот Varian, опремен со тернарна пумпа модел 9012 и ултравиолетов детектор со низа од диоди (UV diode-array detector) модел 9065 Polychrom. За следење на елуирањето и за обработка на хроматограмите беше користен софтверскиот пакет Varian Star 4.5 како и неговата понова верзија Star LC Wokstation 5.0. Пробите беа внесувани во колоната преку инјектор од производителот Rheodyne модел 7125 со резервоар за проба со волумен од 20 μL. За добивање на репродуцибилни резултати колоната беше термостатирана во загревач на колоната (CH-30) и температурен контролер (TS-45) од производителот Eppendorf.

Подготовки на пробите за анализа. - 1 g од сомелената дрога се обработува на потполно ист начин како што се постапува и при подготовката на пробите за определување на вкупни флавоноиди со спектрофотометриски метод. Добиениот етилацетатен раствор (екстракт) се упарува до суво. На сувиот остаток му се додава 2 mL метанол и овој метанолен екстракт се испитува со HPLC методата за идентификација и квантификација на флавоноидните агликони.

За *идентификација* беа употребени:

- високоефикасната течна хроматографија со UV-детектор со низа од диоди, со *стационарна фаза:* C18 реверзно фазна колона со должина 25 cm, внатрешен дијаметар 0,46 cm и големина на честичките од 5 μm од производителот Varian.

- мобилната фаза беше составена од водена фаза (дестилирана вода или дестилирана вода закиселена со оцетна или мравска киселина) и метанол и/или ацетонитрил. Идентификацијата беше вршена со споредба на UV-спектрите и времињата на задржување на компонентите од анализираните екстракти со оние на стандардните супстанци.

За *кванитификација беа употребени:*

- високоефикасна течна хроматографија со UV-детектор со низа од диоди за квантитативна анализа на поединечни флавони, флавоноли и/или флаванони, при што како мерка за нивна застапеност беше користена површината под пиковите на соодветните супстанции. За таа цел беше развиен метод за елуирање со градиентно менување на составот на мобилната фаза, кој детално е прикажан во делот *Резултати и дискусија.*

Резултати и дискусија

Идентификација на флавоноидите во Eryngii herba

TLC анализа

Резултатите од испитувањата на флавоноидите со хроматографија на тенок слој (TLC анализа) покажуваат присуството на 3 флавоноиди, кои прелиминарно со компаративна анализа со соодветни стандардни супстанции се идентификувани како: кемферол, кверцетин и лутеолин (Табела 1.).

2. HPLC анализа

За идентификација на флавоноидните компоненти во екстракти од *Eryngium campestre* воведена е HPLC метода со реверзно фазна стационарна фаза (C18). Со воспоставената метода извршено е определување на ретенционите времиња на избраните стандардни супстанци на флавоноиди чие присуство се очекува во растителниот материјал. Генерално земено, очекуваниот редослед на елуирање од реверзно фазната колона е следниот: пополарни компоненти (фенолни киселини и фенолни и флавоноидни хетерозиди), потоа флавонски агликони зависно од бројот на OH^- групи, а во понатамошниот тек од сепарирањето евентуално присутни флавоноиди со OCH_3-групи, бидејќи зголемувањето на нивниот број во однос на OH-групите резултира во поголемо време на задржување. Во случајот на екс-

Табела 1. Резултати од TLC анализа на екстракти од херба од *E. campestre*

	Rf вредност во системот S_1	*Rf* вредност во системот S_2	*Rf* вредност во системот S_3	*Rf* вредност во системот S_4
Кемферол F_1	0.69 0.67	0.63 0.64	0.61 0.61	0.26 0.24
Кверцетин F_2	0.48 0.50	0.44 0.43	0.52 0.54	0.16 0.18
Лутеолин F_3	0.45 0.46	0.33 0.36	0.48 0.45	0.15 0.15

F_1, F_2 ,F_3 - aglikoni prisutni vo ekstraktite od herbata; S_1- S_4 mobilni fazi (S_1- toluen: EtOAc:HCOOH 58:33:9.v/v); S_2-$CHCl_3$: MeOH(93:7.v/v); S_3-C_6H_6:MeOH: HoAc(45:3:2.v/v); S_4- C_6H_6:DioX:HoAc (90:25:4)

тракти од *Eryngium campestre* добиени со претходна хидролиза на гликозидите очекувано беше присуството на флавоноли и заради тоа смесата од стандарди за споредба беше составена од мирицетин, кверцетин и кемферол. Експерименталните услови се поставени во согласност со очекувањето на флавонолни агликони, но не и гликозиди во анализираниот екстракт. Заради тоа, на почетокот мобилната фаза содржи значаен удел на органскиот растворувач-ацетонитрил, а температурата на колоната се одржува на 30°C, за да се добијат репродуцибилни времиња на задржување на испитуваните компоненти. Методот за менување на составот на мобилната фаза е даден во Табела 2.

Времињата на задржување на мирицетин, кверцетин и кемферол добиени со елуирање со оваа метода се: 4,55; 7,26 и 12,70 min, соодветно, што значи дека времетраењето на една HPLC анализа е 20-30 минути. На Сл. 1.1. се дадени хроматограмите од смесата од стандарди и од екстракт од *Eryngium campestre* на бранова должина од 254 nm. Очигледно е присуството на кверцетин и кемферол кое е потврдено и со нивните UV-спектри (Сл. 1.2.), додека не е детектиран мирицетин. Со внимателно проучување на UV-спектрите на пикот од кемферол се забележува еден мал пик веднаш до изразениот пик од кемферол со UV спектар скоро идентичен со оној на кемферол (Сл. 1.2.). Статистичката обработка на UV спектрите од пикот на кемферол и пикот веднаш до него покажа дека и тој може, во натамошната анализа, да се смета за кемферол.

Со HPLC анализа на екстракти од херба од *E. campestre*, извршена е идентификација на флавоноидните компоненти. При тоа е утврдено присуство на кемферол како доминантна флавоноидна компонента во сите испитувани екстракти, добиени по хидролиза на хетерозидните форми, а во помала мера присуство и на кверцетин.

Табела 2. Метод за градиентно елуирање за идентификација на флавонолни агликони

t/min	*W*(H_2O; pH=3, H_3PO_4)/%	*w*(CH_3CN)/%
0-10	65	35
20-40	35	65
проток: 1,0 mL/min		
температура: 30 °C		

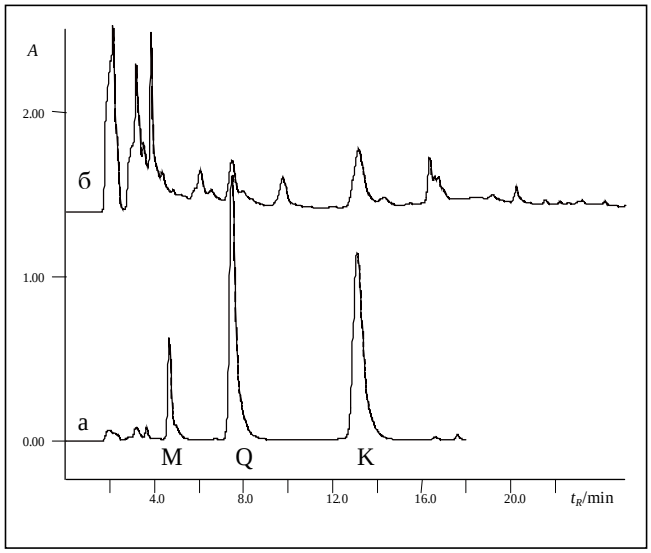
Квантитативно одредување на вкупни флавоноиди

1. Спектрофотометриски метод

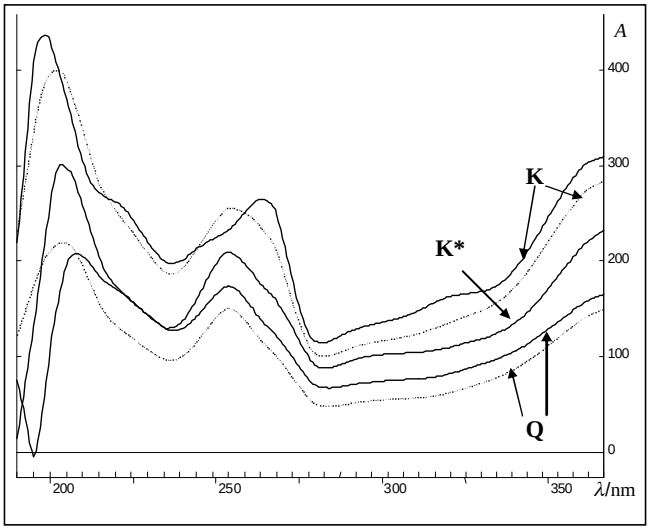
Определувањето на вкупните флавоноиди е извршено со спектрофотометриски метод, користејќи $AlCl_3$ како комплексирачки реагенс. Резултатите од определувањето на вкупни флавоноиди во примероци од херба на *E. campestre* се дадени во Табела 3. Во сите испитувани примероци содржината на вкупни флавоноиди пресметана како кверцетин се движи во количини пониски од 0,5% (0,12-0,14%).

2. HPLC метод

За квантитативно определување на идентификуваните флавоноли во екстракти од *Eryngii herba* приготвени со претходна хидролиза на гликозидите е употребен методот што е искористен и за квалитативната анализа. Всушност, за потребите на квантитативната анализа извршена е модификација на предходно воспоставениот и валидиран метод за определување на кверцетин во растителни екстракти добиени со вклучена хидролиза на хетерозидните форми (23). Изборот на оптимална бра-



Сл. 1.1. Хроматограми: а. смеса од стандарди (M-мирицетин; Q-кверцетин и K-кемферол, и б. екстракт од *E. campestre* (на бранова должина од 254 nm).

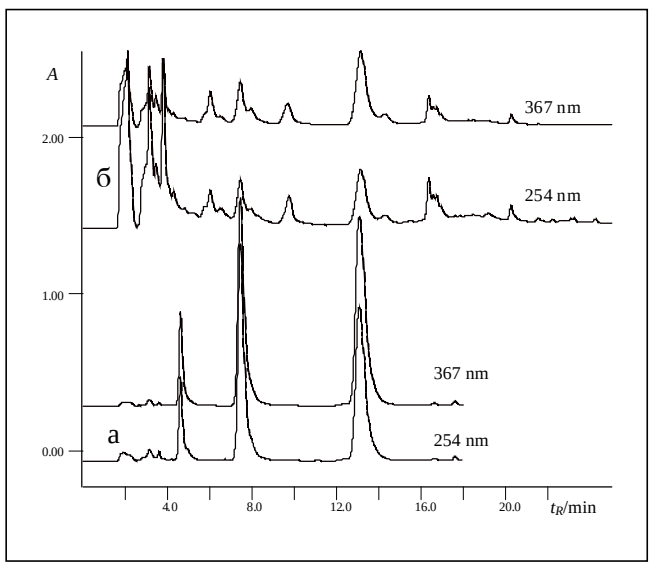


Сл. 1.2. Ултравиолетови спектри на пиковите од кверцетин, кемферол и пикот до кемферол (K*) претставени со полни линии, споредени со спектрите на соодветните стандарди, испрекинати линии.

Table 3. Резултати од определување на вкупни флвоноиди во херба од *E. campestre (w/%)*

	H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6
w/%	C1=0,125 C2=0,128 C3=0,120 X=0,124	C1=0,134 C2=0,131 C3=0,140 X=0,135	C1=0,124 C2=0,138 C3=0,120 X=0,127	C1=0,145 C2=0,105 C3=0,133 X=0,128	C1=0,120 C2=0,160 C3=0,105 X=0,128	C1=0,130 C2=0,128 C3=0,170 X=0,143
Sd	0,004	0,005	0,009	0,029	0,040	0,033
CV	3,23	3,71	7,09	22,66	31,25	23,08

H1-H6 - primeroci od herba; Sd - standardna devijacija; CV - koeficient na varijacija



Сл. 2. Хроматограми од: а. смеса од стандарди и б. екстракт од *E. campestre* на 254 и 367 nm

нова должина за следење на елуирањето на компонентите од колоната е многу значаен во поглед на осетливоста и селективноста при квантитативното определување на бараните компоненти од примерокот. Во овој случај, изборот е 254 nm, како највообичаена, и 367 nm, каде флавонолите имаат апсорпционен максимум. Елуирањето на компонентите од екстракт од *Eryngii herba* следено на 254 и 367 nm е прикажано на Сл. 2. каде е очигледна подобрата резолуција на пиковите од кверцетин и кемферол на 367 nm, во споредба со онаа на 254 nm. Ова се должи на поголемиот моларен апсорпционен коефициент на кемферолот на 367 nm како и на помалата, и дури незначителна, апсорпција на другите компоненти кои не се од интерес при анализата на флавоноидните компоненти.

Како што беше кажано при идентификацијата, пикот од кемферол има многу поголема површина во споредба со оној од кверцетин. Во кванти-

тативната анализа се можни неколку пристапи: определување на содржината на секој од флавонолите, посебно, определување на содржина на вкупни флавоноли пресметани како кверцетин или определување на вкупни флавоноли пресметани како кемферол.

Бидејќи во проценката на квалитетот на растителните суровини поголемо значење има определување на вкупната содржина на компоненти од интерес, во овој случај флавонолски компоненти, направен е обид да се квантификува вкупната застапеност на двата флавоноли и да се изрази преку кемферол. За споредба вкупните флавоноли се изразени и преку молекулската маса на кверцетин, а направена е и проценка на грешката што би се направила доколку вкупните флавоноли се изразат како кверцетин.

За да се реализира квантитативната анализа направена е калибрација со надворешни стандарди од кверцетин и кемферол во подрачјето на концентрации од 0,11 mg/mL, или изразено во маса на кверцетин, односно кемферол, инјектирана во колоната 220 μg (резервоар за примерокот 20μL).

Линеарна зависност на површината под пикот од масата на кверцетин, односно кемферол, беше забележана во целото испитувано концентрационо подрачје.

Равенките на правите добиени за 254 nm и 367 nm, заедно со соодветните вредности за коефициентите на корелација (R^2) се следните:

254 nm:	$A = 8{,}93\cdot10^6\cdot m$(кверцетин) + $6{,}13\cdot10^4$,	$R^2 = 0{,}9975$
	$A = 4{,}53\cdot10^6\cdot m$(кемферол) + $3{,}61\cdot10^4$,	$R^2 = 0{,}9990$
367 nm:	$A = 8{,}73\cdot10^6\cdot m$(кверцетин) + $9{,}88\cdot10^4$,	$R^2 = 0{,}9975$
	$A = 5{,}98\cdot10_6\cdot m$(кемферол) + $7{,}08\cdot10^4$,	$R^2 = 0{,}9982$

каде A = површина под пикот на кверцетин и кемферол на соодветната бранова должина.

Повисоката вредност за наклонот на калибрационата права добиена за 367 nm за кемферол, заедно со споменатата подобра резолуција на оваа бранова должина, доведува до заклучок дека 367 nm е оптималната бранова должина за детекција при определување на кемферол. За кверцетинот, како што може да се забележи од коефициентите на правец кои се блиски, овој заклучок, исто така важи, но пред сè заради подобрата резолуција од други присутни компоненти, кои слабо или воопшто не апсорбираат во ова подрачје на повисоки бранови должини.

Резултатите од определувањето на кемферол и кверцетин во екстрактите од *Eryngium campestre* од различни локалитети приготвени со хидролиза, како што беше опишано во Експерименталниот дел, на двете бранови должини се дадени во Табела 4. Како што може да се види од табелата доминантен флавонол во екстрактите од *Eryngium campestre* приготвени со хидролиза е кемферолот чиј масен удел се движи од 0,029-0,103 %, додека кверцетинот е застапен од 0,001-0,019 %. Овие резултати ни сугерираат дека би можело присуството на вкупни флавоноли во оваа дрога да се пресмета и само преку кемферолот и на тој начин да се поедностави аналитичката процедура. Така, масениот удел на вкупните флавоноли изразени преку кемферол се движи од 0,0390,135 %.

Грешката што при ваквиот начин на изразување на вкупните флавоноли би се направила се движи од 9,14-19,61 %, или просечно 12,52 %. Ако аналогно, се пресметаат вкупните флавоноли преку кверцетин, грешката е значително поголема (18,11-25,47 %, просечно 23,10 %) и е негативна т.е. се добиваат значително пониски резултати. Сето ова се должи на поголемиот апсорпционен коефициент на 367 nm на кверцетин во однос на кемферол што се гледа и од поголемиот коефициент на правец на калибрационата крива на кверцетин. Според тоа, може да се смета дека содржината на вкупни флавоноли во дроги каде што е доминантно присуството на кемферол може да се изрази само преку кемферолот. Притоа, значи, се користи калибрација со стандардни раствори од кемферол и добиените вредности за вкупните флавоноли се добра проценка за нивната реална застапеност во испитуваните дроги.

Од резултатите што се прикажани во Табела 4. може да се види дека содржината на вкупните флавоноиди (кемферол+кверцетин) во хидролизати од дрогата *Eryngii herba*, определена со HPLC методот (0,04-0,13%) е пониска од вредностите што се добиени со спектрофотометрискиот метод (0,12-0,14%). Ова може да се објасни со фактот дека во

Table 4. Резултати од определувањето на застапеноста на кверцетин и кемферол во екстракти од *Eryngii herba* (на 254 и 367 nm)

	Масен удел			% (вкуп. флавоноли) пресметано		Релативна грешка	
Примерок	% K	%Q	%(K+Q)	преку K	преку Q	% грешка K	% грешка Q
H_1 (Приштина)	0,037	0,001	0,038	0,042	0,029	12,98	-22,68
	0,056	0,002	0,058	0,064	0,044	9,45	-25,20
H_2 (Приштина)	0,044	0,003	0,046	0,052	0,036	12,40	-23,13
	0,063	0,006	0,069	0,076	0,052	10,57	-24,47
H_3 (Липљан)	0,061	0,005	0,066	0,073	0,050	10,45	-24,54
	0,076	0,006	0,083	0,090	0,062	9,14	-25,47
H_4 (Липљан)	0,029	0,004	0,033	0,039	0,027	19,61	-18,11
	0,041	0,007	0,048	0,056	0,039	16,41	-20,41
H_5 (Подујево)	0,103	0,019	0,122	0,135	0,092	10,85	-24,35
	0,049	0,008	0,056	0,065	0,044	14,49	-21,75
H_6 (Подујево)	0,066	0,007	0,073	0,081	0,055	10,69	-24,40
	0,049	0,006	0,055	0,063	0,043	13,18	-22,64

случајот кога се користи HPLC метод, во пресметка се земаат само површините на пиковите на двата агликона: кверцетин и кемферол. Кога вкупните флавоноиди се определуваат со спектрофотометрискиот метод, тогаш сите флавоноиди што се присутни во хидролизатот, а што имаат способност да го комплексираат Al^{3+} јонот, реагираат со него и влијаат на вредноста на абсорбанцата на кверцетинот. Оттука, оправдано може да се очекува определената содржина на вкупни флавоноиди да биде повисока.

Литература

1. В. Дервенци, *Природни лековити и ароматични сировини, второ издание*, Маринг, Скопје, 1997.
2. Стојанов Н., Китанов Б. (1960), Диви полезни растенија в Бугарија. Издавателство на Булгарската академија на науките; Софија, 1960
3. И. Асенов, С. Николов, *Фармакогнозија*, Медицина и фискултура, Софија, 1988.
4. K. Hiller, E. Friedrich, *Isolating antimycotically active saponin mixtures from umbelifers.* Ca 85, 83220^a , 1975.
5. K. Hiller, M. Keipert, S. Pfeifer, *Pharmazie* **27**(5), 341-3 CA 77, 111507e. 1972.
6. K. Hiller, K.Q.C. Nguyen, P. Franke, *Pharmazie*, **33**(1), 78-80 CA 89, 39372k, 1978.
7. K. Hiller,V.Th. Nguyen, G. Lehman, E. Grundemann, *Pharmazie*, **29**(2), 148-9 (Ger)-Ca 81, 74885m, 1974.
8. K. Hiller, V.M. Mach, P. Franke, *Pharmazie*, **31**(1), 53 (Ger)-CA 84, 161754y, 1976.
9. K. Hiller K., K.Q.C. Nguyen, P. Franke, R. Hintsche, *Pharmazie*, **31**(13), 891-3(Ger)-CA 86, 68400m, 1976.
10. M.H.A. El-Gamal, F.K. Ei-Bay, B.A.H. Ei-Tawill, K.Z. Gadalla, *J. Chem*., **18**(4), 767-72, 1978.
11. C.A.J. Erdelmeier, O. Sticher, *Planta Medica* (No.5) 407-409 CA 104, 85399a, 1985.
12. D. Drake, J. Lam, *Phytochemistry*, **11**(8), 2651-2 CA 77, 111504b, 1972.
13. J. Lam, L.P. Christensen, T. Thomasen, *Phytocemistry*, **31**(8), 2881-2 CA 117, 167715h, 1992.
14. Iv. Assenov, R. Gevrenova, *Farmatsija* – Sofia, **41**(5-6), 26-8, 1991.
15. S. Al-Khail, *Alexandria J. Pharm. Sci.*, 873-5 CA 121, 251251u, 1994.
16. K. Hiller, B. Pohl, P. Franke, *Pharmazie*, **36**(6) 451-2 CA 95, 111731v, 1981.
17. L. Stecka-Paszkiewez, *Z. Chem*., **23**(8), 294-5, 1983.
18. M. Pinar, M. P. Galan, *J. Nat. Prod*., **48**(5), 853-4 (1985).
19. T. Karting, J. Wolf, *Planta Med*., **59**(3), 285 CA 119, 156307s, 1993.
20. T. Kartnig, J. Wolf, *Planta medica*, **59** (3) 285, 1993.
21. С. Кулеванова, Докторска дисертација, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, 1997.
22. European Pharmacopoea (V) 5th edition, Councle of Europe, Strazbourg, 2004.
23. Stefova M., S. Kulevanova, T. Stafilov, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*., **24**, 2283-2292 (2001).

Summary

Identification and determination of flavonoids in *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L., Apiaceae)

Flurim Nebija[1], Svetlana Kulevanova[2], Marina Stefova[3]

[1]Medical faculty, Section Pharmacy, University in Prishtina, Kosovo
[2]Faculty of Pharmacy, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia
[3]Faculty of Science, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia

Key words: *Eryngium campestre,* flavonoids, identification, determiniation, HPLC.

Research on the flavonoids in the plant drug Eryngii herba, Eryngium campestre L. (Apiaceae), collected from three different localities from Kosovo, have been done in this work. TLC and HPLC methods were established for identification purposes and spectrophotometric and HPLC methods for quantification of flavonoids were made as well. In the plant extracts obtained after hydrolyse of flavonglucosides, few different flavonols has been recognised but only quercetin and kaempferol have been identified. According quantitative analyse, the most abundant flavonol was kaempferol. The content of total flavonoids was from 0.12-0.14 % and for total flavonols from 0.04-0.13 %, determined by spectrophotometric and HPLC methods, respectively.

УПАТСТВО ЗА АВТОРИТЕ

Македонскиот фармацевтски билтен е официјално гласило на Македонското фармацевтско друштво. Во списанието се објавуваат оригинални научни трудови, куси соопштенија, ревијални трудови и стручни трудови од сите фармацевтски дисциплини и сродни подрачја на работа кои се од интерес за фармацијата (фармацевтска и медицинска хемија, имунологија со имунохемија, молекуларна биологија, фармацевтски анализи, контрола на лекови, фармацевтска технологија, фармакоинформатика, биофармација, фармакологија, применета ботаника, фармакогнозија, токсикологија, клиничка фармација, храна и исхрана, физичка фармација, органски синтези, социјална фармација, историја на фармација и др.).

Во Македонскиот фармацевтски билтен се објавуваат и други прилози (пораки и соопштенија, извештаи и календари на научни и на стручни манифестации во земјата и во странство, прегледи на книги). Составен дел на Билтенот се и разни рубрики.

Оригиналните научни трудови ги содржат резултатите на сопствени, дотогаш необјавени научни истражувања кои претставуваат заокружена целина, а даваат придонес кон развојот на соодветната научна област. Бројот на страниците (заедно со сликите и со табелите) не треба да биде поголем од 15.

Кусите соопштенија содржат резултати од научни истражувања презентирани во помал обем, чиј број на страници не треба да биде поголем од пет (дозволени се една табела и една слика).

Прегледите се пишуваат на покана од Уредувачкиот одбор, а претставуваат поопширен приказ на истражувањата и сознанијата на повеќе автори во определена научна област, за која компентноста на авторот на прегледот е потврдена преку неговите објавени истражувања.

Стручните трудови известуваат за корисни резултати кои овозможуваат податоците од оригиналните научни истражувања да бидат применети во практичната работа. Стручните трудови можат да се темелат и на обработка на теоретски податоци. Бројот на страниците (заедно со сликите и со табелите) не треба да биде поголем од 10.

Оригиналните научни трудови, кусите соопштенија и прегледите треба да бидат напишани на англиски јазик, додека стручните трудови и сите останати прилози можат да бидат напишани и на македонски јазик.

Прифаќањето на трудовите за печатење во Билтенот ги обврзува авторите истите резултати да не ги објавуваат во друго списание.

Подготовка на ракопис:

Ракописите треба да се достават во три примероци испечатени на компјутерски печатач, еднострано со проред од 1,5 со маргина од 3,0 cm од секоја страна, на хартија со формат А4 на адреса на главниот уредник:

Проф. д-р Светлана Кулеванова
Фармацевтски факултет,
Водњанска 17, П. фах 36, 1000 Скопје,
Република Македонија

Страниците и прилозите треба да бидат нумерирани.

При подготвување на ракописот за печатење треба да се води сметка тој да биде максимално концизен, без непотребни повторувања.

При пишување на ракописот задолжителна е употреба на следните единици за: должина (m, cm, mm, μm, nm, Å); маса (kg, g, mg, μg, ng, pg); волумен (l, ml, μl); време (s, min, h, d); температура (°C, K); радијација (Bq, Ci, dpm, Gy, rad): концентрација (M, mol/l, N, mg/ml, %, %(v/v), %(w/v), ppm).

Имињата на супстанциите треба да се во согласност со препораките и правилата дадени од IUPAC или, ако такви не постојат, според практиката на Chemical Abstracts.

Табелите и сликите (фотографии, дијаграми и скици), како и структурните формули треба да бидат дадени секоја на одделен лист (во текстот да е обележано нивното место). Табелите и сликите се нумерираат со арапски бројки (на пр. Табела 1., Сл.1).

Ракописот треба да содржи: наслов, апстракт, клучни зборови, вовед, експериментален дел, резултати и дискусија, заклучок, благодарност (по потреба), литература и резиме.

На **насловната страница** треба да стои насловот на ракописот. Во посебни редови треба да стои полно име и презиме на авторите, назив и адреса на институцијата на авторите. Кога авторите потекнуваат од повеќе различни институции треба да се означи потеклото на секој автор со $^{1, 2, 3}$.... на крајот од неговото име. Со ѕвездичка треба да биде означено името на авторот за коресподенција. Во долниот лев агол од насловната страница се наведува неговата e-mail адреса, телефонскиот број и број на факс.

Апстрактот треба да биде до 250 збора (научни и стручни трудови), односно до 100 збора (куси соопштенија), а треба да ги содржи целта на работата, методологијата и позначајните резултати. Во продолжение треба да бидат застапени три до шест клучни збора распоредени според редоследот на важност.

Во **воведниот дел** треба накусо да се наведат само најважните податоци од поранешните истражувања поврзани со обработуваната проблематика и да се објасни целта и важноста на работата.

Експерименталниот дел треба да биде издвоен и да содржи податоци за употребуваните материјали и опис на применетите методи на начин што ќе овозможи репродуцирање на постапката, но без детално опишување на веќе познатото.

Трудовите што се однесуваат на теоретски истражувања, наместо експериментален дел треба да имаат соодветно поглавје со поднаслови во кое ќе бидат изнесени подробности неопходни за проверка на презентираните резултати.

Резултатите и дискусијата треба да бидат дадени во едно поглавје. Дискусијата треба да содржи анализа на резултатите и на заклучоците што притоа можат да се извлечат.

Заклучокот што произлегува од изложените резултати и дискусија се издвојува во посебно поглавје.

Литературата се наведува во посебно поглавје, при што библиографските единици се нумерираат по оној ред по кој се појавуваат во текстот. Ако во текстот се спомнуваат автори, се наведуваат само презимињата на авторите (ако ги има еден или два), а во случај на повеќе автори се пишува, на пример, Vetter et al. (1).

Статии од научни списанија се цитираат на овој начин:

1. P. Premov and D. Dulanov, Maced. Pharm. Bull., **20**, 2-10 (2000).

Кратенките на списанијата се наведуваат според Chemical Abstracts.

Книги се цитираат на овој начин:

2. A. Robert, M. Sporn, Progress in Organic Chemistry, 3rd ed., Butterworths Scientific Publications, London, 1998, pp 125-154.

Книги со уредник:

3. J. Cook, in The retinoids, P. Cornwell, Ed., Academic Press, Orlando, 1996, pp 25-29.

Трудовите напишани на англиски јазик на крајот треба да содржат **резиме** на македонски јазик. Резимето треба да содржи наслов, полно име и презиме на авторот/авторите, назив на институцијата на авторот/авторите, клучни зборови и текстот на апстрактот. Стручните трудови напишани на македонски јазик на крајот треба да содржат резиме напишано на англиски јазик во кое треба да се вклучени истите податоци.

Примените ракописи Уредувачкиот одбор ги испраќа на рецензирање. Рецензираните трудови, заедно со евентуалните забелешки и мислења на Уредувачкиот одбор, се доставуваат до авторите. Тие се должни најдоцна во рок од 30 дена да ги извршат неопходните корекции и финалната верзија на ракописот да ја достават до Уредувачкиот одбор во печатена форма и задолжително и на PC форматирана дискета **(Word; Times New Roman, Mac C Times, Macedonian Times** и големина на букви **11).**

Авторите добиваат 20 бесплатни сепарати од секој труд објавен во Билтенот.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Macedonian Pharmaceutical Bulletin is an official publication of the Macedonian Pharmaceutical Association. The journal publishes original scientific papers, short communications, reviews and professional papers from all fields of pharmacyand corresponding scientific fields of interest for pharmacy (pharmaceutical and medicinal chemistry, immunology and imunochemistry, molecular biology, pharmaceutical analyses, drug quality control, pharmaceutical technology, pharmacoinformatics, biopharmacy, pharmacology, applied botany, pharmacognosy, toxicology, clinical pharmacy, food and nutrition, physical pharmacy, organical synthesis, social pharmacy, history of pharmacy etc.).

The Macedonian Pharmaceutical Bulletin, also, publishes and other contributions (recommendations and announcements, reports of meetings, important events and dates, book reviews, various rubrics).

Original scientific papers should contain own unpublished results of completed original scientific research. The number of pages (including tables and figures) should not exceed 15.

Short communications also should contain completed but briefly presented results of original scientific research. The number of pages should not exceed 5 (including one table and one figure).

Reviews are written at the invitation of the Editorial Board. They should be surveys of the investigations and knowledge of several authors in a given research area, the competency of the authors of the reviews being assured by their own published results.

Professional papers report on useful practical results which are not original but help the results of the original scientific research to be adopted into practical use. Professional papers might be based on the elaborating of theoretical data. The number of pages should not exceed 10 (including tables and figures).

Original scientific papers, short communications and reviews should be written in

English, while professional papers and all other contributions may be submitted in Macedonian.

Acceptance for publication in the Bulletin obliges the authors not to publish the same results elsewhere.

Preparation of manuscripts:

Manuscripts should be submitted in triplicate, typed (1 ½spaced) on A4 paper with margins of 3.0 cm on each side. It is recommended the manuscript be sent on the Editor-in-Chief address's:

Prof. dr. Svetlana Kulevanova
Faculty of Pharmacy
Vodnjanska 17, POB 36
1000 Skopje
Republic of Macedonia

The pages and appendices should be numbered.

The papers should be written in the shortest possible way and without unnecessary repetition.

Obligatorily, only the follow quantities and units must be used: length (m, cm, mm, μm, nm, Å); weight (kg, g mg, μg, ng, pg); volume (l, ml, μl); time (s, min, h, d); temperature (^oC, K); radiation (Bq, Ci, dpm, Gy, rad); concentration (M, mol/l, N, mg/ml, %, %(v/v), %(w/v), ppm).

The names of substances should be in accordance with the IUPAC recommendations and rules or Chemical Abstracts practice.

Figures (photographs, diagrams and sketches) and structural formulae should each be given on a separate sheet (the place to which they belong in the text should be indicated). The tables and the figures should be numbered in Arabic numerals (e.g. Table 1, Fig. 1).

Manuscript should contain: title, abstract, key words, introduction, experimental, results and discussion, conclusion, acknowledgment (if desired) references and summary.

Papers should be preceded by a title page comprising: the title, the complete name(s) of the authors, and the author's affiliations (institution and address). When the authors affiliated from various different institutions the origin of the each author should be indicated with 1,2,3... at the end of his name. The correspodence author should be indicated with * and his e-mail address, telephone and fax number to be supplied in the bottom left part of the title page.

Each paper must begin with an Abstract which should not exceed more than 250 (original scientific and professional papers) or 100 (short communications) words. The abstract should include the aim of the research, methods and the most important results. A list of 3 to 6 key words arranged in the order according to their importance should follow the abstract.

In the introduction only the most important previous results related to the problem in hand should be briefly reviewed and the aim and the importance of the research should be stated.

The experimental section should be written as a separate section and should contain a description of the materials used and methods employed in form which makes the results reproducible, but without detailed description of already known methods.

Manuscripts which are related to theoretical studies, instead of experimental, should contain a sub-heading and the theoretical background where the necessary details for verifying the results obtained should be stated.

It is often advantageous to combine Results and Discussion in one section. The discussion should contain an analysis of the results and the conclusions that can be drawn.

Conclusion which is in consequence from the presented results and discussion should be given in the separate section.

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. References should be numbered in the order in which they appear in the text and listed in numerical order in the reference list.

The surname of one or two authors may be given in the text, whereas in the case of more than two authors they should be quoted as, for example *Vetter et al.* (1).

Papers from scientific journals should be cited as follows:

1. P. Premov and D. Dulanov, *Maced. Pharm. Bull.* **20**, 2-10 (2000).

The names of journals should be abbreviated as in Chemical Abstracts.

Books should be cited as follows:

2. A. Robert, M. Sporn, *Progress in Organic Chemistry*, 3rd ed., Butterworths Scientific Publications, London, 1998, pp 125-154.

Books with editor:

3. J. Cook, in *The retinoids,* P. Cornwell, Ed., Academic Press, Orlando, 1996, pp 25-29.

Manuscripts written in English should contain a summary in Macedonian at the end of the paper. The summary should contain: title, author(s) full-name(s), surname(s), author's affiliations (institution and address), key words and abstract. Professional papers written in Macedonian should contain a summary in English in which the same data should be included.

Papers received by the Editorial Board are sent to referees. The suggestions of the referees and Editorial Board are sent to the author(s) for further action. The corrected text should be returned to the Editorial Board as soon as possible but in not more than 30 days in a hard copy form and obligatorily on the PC formatted disk (**Word; font Times New Roman, Mac C Times, Macedonian Times** and size **11**).

Twenty reprints of each paper are supplied free of charge to the author(s).

JAKA·80

НОВ КВАЛИТЕТ НА ПРОИЗВОДСТВО

ЗА НАШЕ ДОБРО
Made in Macedonia

www.jaka80.com.mk

Synetra®

CLOPIDOGREL

во превенција од атеротромбоза

- Исхемичен мозочен удар
- Транзиторна исхемична атака

- Миокарден инфаркт
- Ангина пекторис
  (стабилна, нестабилна)

- Периферна артериска болест

АЛКАЛОИД
СКОПЈЕ

Здравјето пред сè

www.alkaloid.com.mk

ПОДОБАР ТЕК
за секоја капка

Пакување
Кутија со 30 филм-обложени таблети по 75 mg

Dr Leo е резултат на долгогодишни истражувања во најсовремените лаборатории во Австрија контролиран со **Агилент** технологија за контрола на стабилноста на витамините и минералите во течна форма

Состав:

	дневна доза (=15мл)	15мл во %	RDA
Витамин А	1666.5 И.Е.	83	63%
Шеќер	6.0гр		
Витамин Ц	50мг	83	83%
Витамин Е	5мг	77	50%
Витамин Б1	0.6мг	100	43%
Витамин Б2	0.7мг	100	44%
Ниацин	7мг	100	39%
Пантотенска киселина	4мг	100	67%
Биотин	15мцг	100	
Витамин Б6	0.5мг	100	25%
Фолна киселина	100мцг	50	50%
Витамин Б12	1мцг	100	100%
Витамин Д3	120 И.Е.	60	60%
Витамин К	15мцг	75	
Селен	20мцг	100	
Цинк	5мг	167	33%
Манган	1.5мг	100	
Хром	40мцг	100	
Молибден	50мцг	100	
Јод	60мцг	60	40%
Железо	2мг	25	

ПРЕПОРАЧАНА УПОТРЕБА:

Пакување: Шише од 250ml сируп

Деца на возраст од 1 до 7 години: 1 капаче за дозирање 1х дневно, приближно 15 ml неразредено или разредено со вода

Деца на возраст од 7 до 14 години: 1 капаче за дозирање 2 х дневно, приближно15 ml неразредено или разредено со вода

Контраиндикации: При појава на хиперсензитивност на било која од состојките во препаратот

Чувајте на темно и ладно место. Препорачаната дневна доза не смее да се надминува. Чувајте подалеку од дофат на деца. Додатоците во исхраната не треба да бидат замена за разновидна и балансирана исхрана.

Одобрено од Министерство за здравство на Р.Македонија, Дирекција за храна , решение бр. 36-1/2007.

Користена литература:

*1 von Schenck U, Bender- Gotze C,Koletzko B(1997) Persistance of neurological damage induced by dietary vitamin b12 deficiency in infancy. Arch Dis Child 77:137-139

*2 Zimmermann(2007)The adverse effects of mild to moderate iodine deficiency during pregnancy and childhood: a review.thyroid 17:829-835

*3„Extermes in vitamin K status of bone are related to bone ultrasound properties in children with juvenile idiopatic arthritis" M.J.H. van Summeren, C. Vermeer, R.H.H. Engelbert, L.J. Schurgers, T. Takken, K. Fischer, W . Kuis
Source :Clinical and Experimental Rheumatology Volume 26, Issue 3, Pages484-491

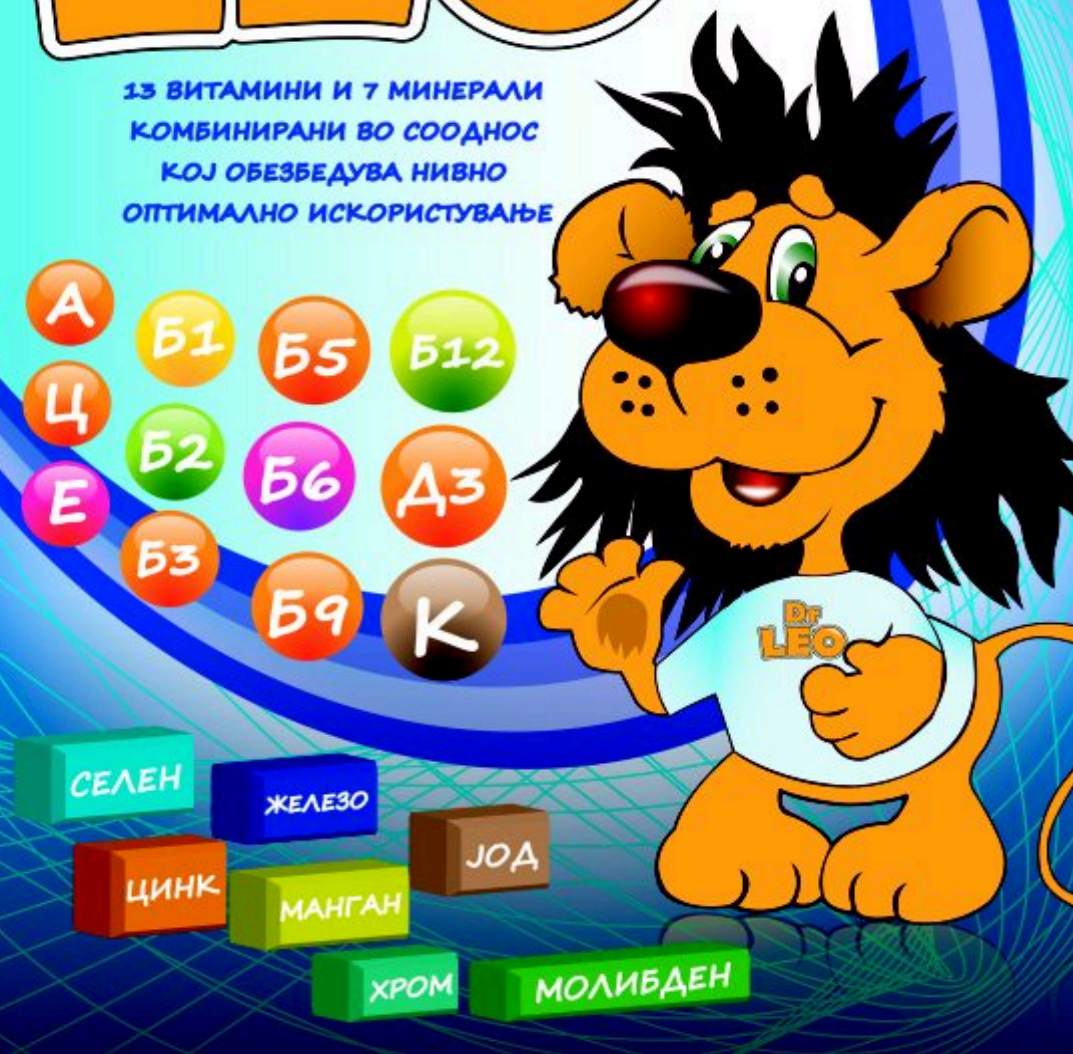
Произведува
ГЕОПРОМ
САВА КОВАЧЕВИЌ 17/2 бр.2
1000 Скопје, Македонија
T: +389 22 774 101 Ф: +389 22 700 292
www.geoprom.com.mk
email: geoprom@geoprom.com.mk

Geopharm

Dr® LEO

СИРУП ЗА ДЕЦА СО ИДЕАЛЕН БАЛАНС НА ВИТАМИНИ И МИНЕРАЛИ

13 ВИТАМИНИ И 7 МИНЕРАЛИ КОМБИНИРАНИ ВО СООДНОС КОЈ ОБЕЗБЕДУВА НИВНО ОПТИМАЛНО ИСКОРИСТУВАЊЕ



Dr Leo е резултат на долгогодишни истражувања во најсовремените лаборатории во Австрија контролиран со **Агилент** технологија за контрола на стабилноста на витамините и минералите во течна форма

Состав:

	дневна доза (=15мл)	15мл во %	RDA
Витамин А	1666.5 И.Е.	83	63%
Шеќер	6.0гр		
Витамин Ц	50мг	83	83%
Витамин Е	5мг	77	50%
Витамин Б1	0.6мг	100	43%
Витамин Б2	0.7мг	100	44%
Ниацин	7мг	100	39%
Пантотенска киселина	4мг	100	67%
Биотин	15мцг	100	
Витамин Б6	0.5мг	100	25%
Фолна киселина	100мцг	50	50%
Витамин Б12	1мцг	100	100%
Витамин Д3	120 И.Е.	60	60%
Витамин К	15мцг	75	
Селен	20мцг	100	
Цинк	5мг	167	33%
Манган	1.5мг	100	
Хром	40мцг	100	
Молибден	50мцг	100	
Јод	60мцг	60	40%
Железо	2мг	25	

ПРЕПОРАЧАНА УПОТРЕБА:

Пакување: Шише од 250ml сируп

Деца на возраст од 1 до 7 години: 1 капаче за дозирање 1х дневно, приближно 15 ml неразредено или разредено со вода

Деца на возраст од 7 до 14 години: 1 капаче за дозирање 2 х дневно, приближно15 ml неразредено или разредено со вода

Контраиндикации: При појава на хиперсензитивност на било која од состојките во препаратот

Чувајте на темно и ладно место. Препорачаната дневна доза не смее да се надминува. Чувајте подалеку од дофат на деца. Додатоците во исхраната не треба да бидат замена за разновидна и балансирана исхрана.

Одобрено од Министерство за здравство на Р.Македонија, Дирекција за храна , решение бр. 36-1/2007.

Користена литература:

*1 von Schenck U, Bender- Gotze C,Koletzko B(1997) Persistance of neurological damage induced by dietary vitamin b12 deficiency in infancy. Arch Dis Child 77:137-139

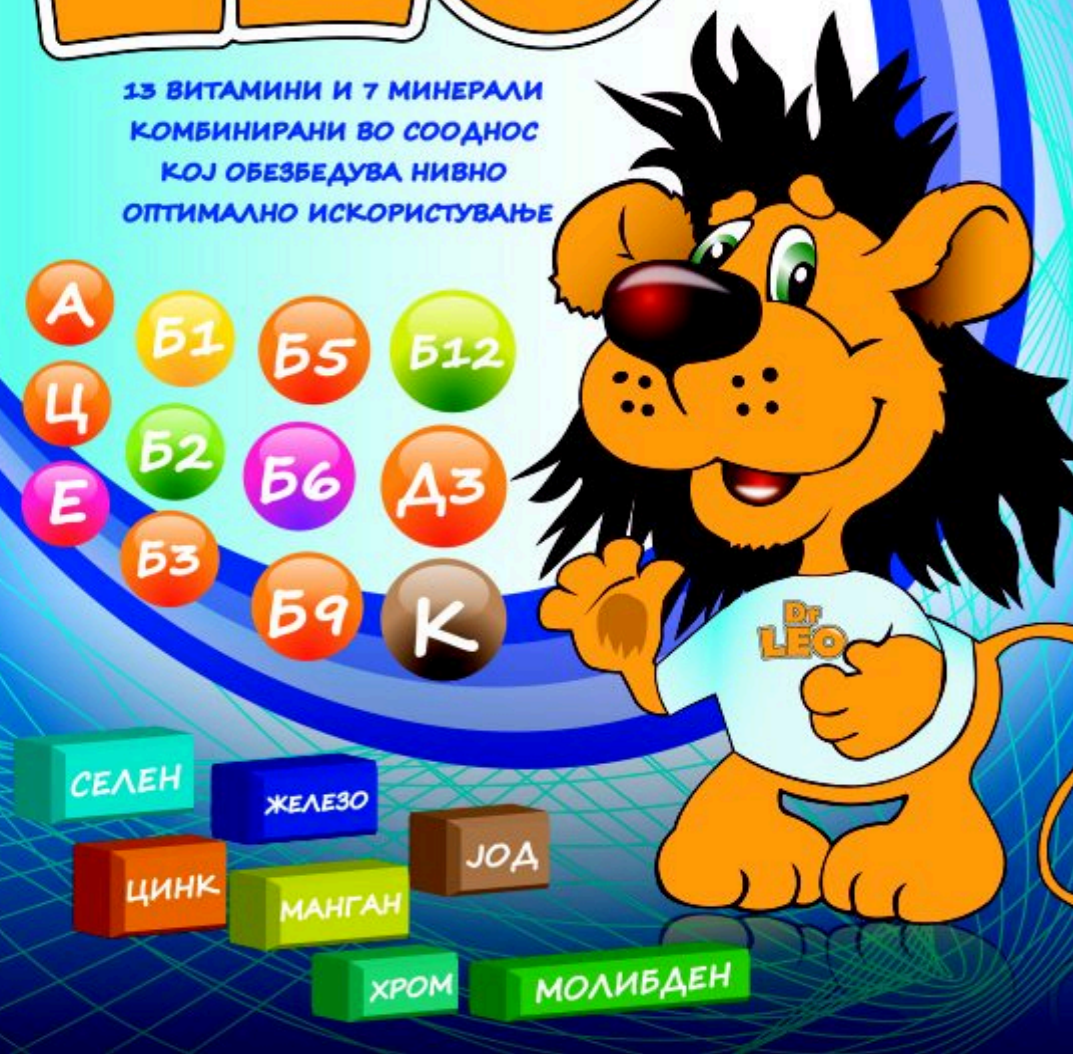
*2 Zimmermann(2007)The adverse effects of mild to moderate iodine deficiency during pregnancy and childhood: a review.thyroid 17:829-835

*3„Extermes in vitamin K status of bone are related to bone ultrasound properties in children with juvenile idiopatic arthritis" M.J.H. van Summeren, C. Vermeer, R.H.H. Engelbert, L.J. Schurgers, T. Takken, K. Fischer, W . Kuis
Source :Clinical and Experimental Rheumatology Volume 26, Issue 3, Pages484-491

Произведува
ГЕОПРОМ
САВА КОВАЧЕВИЌ 17/2 бр.2
1000 Скопје, Македонија
T: +389 22 774 101 Ф: +389 22 700 292
www.geoprom.com.mk
email: geoprom@geoprom.com.mk

Geopharm

Dr® LEO

СИРУП ЗА ДЕЦА СО ИДЕАЛЕН БАЛАНС НА ВИТАМИНИ И МИНЕРАЛИ

13 ВИТАМИНИ И 7 МИНЕРАЛИ КОМБИНИРАНИ ВО СООДНОС КОЈ ОБЕЗБЕДУВА НИВНО ОПТИМАЛНО ИСКОРИСТУВАЊЕ